



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Scienze Veterinarie  
Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**STUDIO DEL COMPORTAMENTO MATERNO NEL CANE**

*Candidato:* Silvia Raviglione

*Relatore:* Dott. Angelo Gazzano

*ANNO ACCADEMICO 2013-2014*

Dedicata a Ketty, il mio cane meraviglioso

## **Indice:**

<b>Riassunto:</b>	pag.1
<b>Capitolo 1: Comportamento materno</b>	pag.3
-1-1: Modifiche fisiologiche ed endocrinologiche durante il parto e nell' immediato periodo post-partum	pag.3
-1-2: Fasi del parto nella cagna	pag.8
-1-3: Ruolo degli ormoni nel comportamento materno	pag.10
-1-4: Controllo neurale del comportamento materno	pag.16
-1-5: Comportamento pre-parto nelle diverse specie animali	pag.23
-1-6: Comportamento materno nel periodo post-partum nelle diverse specie animali	pag.24
-1-7: Comportamento materno nel periodo post-partum nel cane	pag.36
-1-8: Differenze del comportamento materno in femmine primipare e pluripare	pag.41
-1-9: Comportamento materno in relazione alle dimensioni della cucciolata	pag.45
-1-10: Epigenetica del comportamento materno	pag.47
<b>Capitolo 2: Comportamento del cucciolo</b>	pag.67
-2-1: Sviluppo neurologico neonatale	pag.67
-2-2: Periodi sensibili del cucciolo	pag.69
-2-3: Influenza di esperienze precoci sul comportamento del cucciolo	pag.87

<b>Capitolo 3: Soggetti, materiali e metodi</b>	pag.101
-3-1: Scopo del progetto	pag.101
-3-2: Soggetti	pag.101
-3-3: Materiali e metodi	pag.105
-3-4: Risultati	pag.112
<b>Capitolo 4: Discussione</b>	pag.138
<b>Capitolo 5: Conclusioni</b>	pag.158
<b>Bibliografia:</b>	pag.160
<b>Ringraziamenti:</b>	Pag.199

## **RIASSUNTO:**

### **STUDIO DEL COMPORTAMENTO MATERNO NEL CANE**

L'interesse di questa ricerca è stato quello di studiare, analizzare e quantificare le cure materne che 10 femmine di diverse razze canine forniscono ai loro cuccioli, nonché il comportamento dei cuccioli nei confronti della propria madre, durante i primi 21 giorni di vita.

A tale scopo, le dieci cucciolate prese in esame sono state videoriprese nel periodo neonatale e di transizione, e per l'analisi dei comportamenti è stato utilizzato l'etogramma di Rheingold H.L. (1963). I risultati sono stati analizzati attraverso l'uso di una statistica di tipo parametrica e non parametrica, prendendo in considerazione tre giorni in particolare (giorno 1- giorno 10- giorno 19) allo scopo di ottenere un andamento dei comportamenti materni durante le prime tre settimane di vita dei cuccioli. I risultati ottenuti indicano che in generale, la maggior parte delle differenze nei comportamenti materni tra cucciolate riguardano la terza settimana post-partum, facendo riscontrare una relazione temporale. Nel confronto tra cucciolate emergono delle differenze in alcuni comportamenti della madre che sembrerebbero indicare cure materne più intense nelle cucciolate meno numerose e nelle madri primipare e interessanti differenze di razza.

Le cure materne hanno un effetto significativo sullo sviluppo comportamentale dei cuccioli e tale studio mette in luce l'importanza dell'approfondimento di questo tema all'interno della specie canina.

## **ABSTRACT:**

### **STUDY OF MATERNAL BEHAVIOR IN DOGS**

The interest of this research was to study, analyze and quantify the maternal care that 10 dams of different dog breeds provided to their offspring, as well as the behavior of the pups towards their mother, during the first 21 days of life.

For this purpose, the ten litters examined were videotaped in the neonatal and transitional period, and for the analysis of behavior it has been used the ethogram of Rheingold H.L. (1963). The results were analyzed using parametric and non-parametric

statistics, applying the following test to three specific days (day 1, day 10 and day 19) to obtain a trend of maternal behaviors during the first three weeks of life of the pups.

The results showed that, generally, most of the differences in maternal behavior between litters concerned the third postpartum week, showing “time” as a key factor. While comparing the litters differences emerged in some dams’ behaviors which would seem to indicate that maternal care is more intense in small litters and in primiparous dams, with interesting differences among breeds.

Maternal care has a significant effect on the behavioral development of the offspring and this study reveals the relevance of the investigation of this issue within the canine species.

## Capitolo 1: Comportamento materno:

### **-1-1: Modifiche fisiologiche ed endocrinologiche durante il parto e nell'immediato periodo post-partum:**

Ross (1970), riferisce che non sembra esistere un meccanismo endocrino chiaramente differenziato che controlli l'inizio del travaglio nelle diverse specie animali. È stata ipotizzata la funzione della caduta del livello di progesterone e dell'aumento del volume uterino, tuttavia nessuno di questi fattori sembra sufficiente per chiarire l'inizio del travaglio, che avviene come se fosse correlato ad un periodo intrinseco di vita della placenta. Quando il parto è iniziato, l'ossitocina ha con molta probabilità notevole importanza nell'accentuare le contrazioni uterine, ma tale ormone non è indispensabile per l'inizio delle doglie. Infatti, il parto può verificarsi normalmente anche in pazienti ed in animali con deficiente funzione neuroipofisaria e completa mancanza di ossitocina. D'altro lato, il miometrio diviene progressivamente sensibile all'ossitocina quando si avvicina il termine della gravidanza e la liberazione della stessa può talvolta indurre contrazioni premature. Tale ormone è secreto negli stadi avanzati del travaglio e può facilitare la contrazione dell'utero e l'espulsione del feto.

Altri studi condotti su ratti hanno evidenziato che effettivamente l'aumento dei livelli di ossitocina nel periodo periparto agiscono stimolando le contrazioni uterine e facilitando l'espulsione del feto (Higuchi *et al.*, 1985; Challis e Lye, 1994; Numan e Insel, 2003).

Anche nella scrofa, è stato evidenziato che il rilascio di ossitocina è importante per determinare le contrazioni dell'utero ed una rapida nascita dei suinetti (Forsling *et al.*, 1979; Taverne *et al.*, 1979; Lawrence *et al.*, 1997; Algiers e Uvnas-Moberg, 2007).

Catt (1975), riferisce che anche altri fattori endocrini possano essere implicati nell'inizio del travaglio, come i corticosteroidi e la formazione locale di angiotensina tramite l'azione della renina uterina. Non si hanno comunque prove convincenti per nessuna di queste due ipotesi; è inoltre da considerare che i livelli dell'angiotensina 2 nel liquido amniotico rimangono invariati nel corso delle iniziali fasi del parto. In questo periodo aumentano anche i valori plasmatici delle prostaglandine che tuttavia non sembrano correlate in maniera causale con l'inizio del travaglio.

Il parto è il processo fisiologico di espulsione di feto e placenta dall'utero. Durante la gravidanza, l'utero progressivamente si allarga e si stira a causa del crescere del feto e raggiunge la dimensione massima appena prima del parto. Anche la mammella continua

ad ingrossarsi ed alcuni giorni prima del parto comincia a secernere il colostro; a questo si aggiungono altri segnali premonitori che possono variare tra le specie: rilasciamento dei legamenti sacro-ischiatici dovuto all' azione della relaxina, ingrossamento della vulva e scarica di muco, irrequietezza ecc. Nel determinare il parto intervengono importanti cambiamenti ormonali. Il progesterone gioca un ruolo chiave nel mantenere la quiescenza del miometrio ed una cervice strettamente contratta. Un aspetto importante riguarda ciò che innesca il processo del parto. Alla base ci sono i processi di maturazione del feto che riguardano soprattutto la corticale del surrene, con ipotalamo ed adenoipofisi che giocano importanti ruoli di supporto. Il cortisolo fetale attiverebbe degli enzimi placentari che spostano la sintesi steroidea dal progesterone agli estrogeni; questo processo avviene in tempi differenti prima del parto nelle specie domestiche: 25-30 giorni nelle vacche, 7-10 giorni nelle scrofe, 2-3 giorni nelle pecore. In concomitanza con il calo dei livelli di progesterone, l' aumento dei livelli di estrogeni comincia ad influenzare la muscolatura uterina che diviene più eccitabile grazie soprattutto alla concomitante induzione della secrezione di prostaglandine, in particolare PGF 2 alfa da parte degli estrogeni. Alla fine l' utero è convertito da organo quiescente ad organo contrattile e, soprattutto, la cervice si rilascia e si apre per permettere al feto di essere partorito. Le prostaglandine PGF 2 alfa rappresentano il vero motore per l' inizio del parto. Il ruolo dell' ossitocina nel dare inizio al parto è invece incerto; gli estrogeni inducono la formazione nel miometrio di recettori per l' ossitocina ma notevoli quantità di ossitocina sarebbero rilasciate solo al momento dell' ingresso del feto nel canale del parto, attraverso il cosiddetto riflesso neuroendocrino di Ferguson. L' ossitocina probabilmente funziona in modo complementare alle PGF 2 alfa nel promuovere la contrazione uterina una volta che il processo del parto ha avuto inizio (Casella e Taglietti, 1996).

Swanson e Sawchenko (1983), riferiscono che il nucleo sopraottico contiene neuroni magnocellulari per l'ossitocina che si proiettano al lobo neurale dell'ipofisi; una funzione dell'ossitocina rilasciata dalla neuroipofisi è di stimolare le contrazioni uterine associate al parto .

In alcuni animali come vacca, pecora, cagna e gatta, la sintesi ed il rilascio di PGF 2 alfa dà il via alla regressione del corpo luteo che comincia 24-36 ore prima del parto, con la completa rimozione del progesterone 12-24 ore prima del parto. Sebbene la rimozione del progesterone in queste specie sia essenziale per il parto, va sottolineato che non è la rimozione del progesterone che dà l' avvio al parto; è il rilascio di PGF 2 alfa che comporta sia la luteolisi che le contrazioni del miometrio. Nella cavalla come nei

primati il parto avviene anche se le concentrazioni di progesterone rimangono elevate perché evidentemente le prostaglandine prendono comunque il sopravvento sull'effetto inibitorio del progesterone sull'attività del miometrio. Per gli animali che dipendono dalla produzione placentare di progesterone per mantenere la gravidanza, non è possibile sopprimere questa funzione che continua insieme alle altre della placenta che sono necessarie per supportare il feto durante il tempo del parto. Un ormone importante per la preparazione del parto è la relaxina. La relaxina fa rilasciare i legamenti ed i muscoli associati che circondano il canale pelvico, il che permette al feto di espandere il canale in tutto il suo potenziale. Il *softening* muscolare indotto dalla relaxina può essere molto evidente nella cavalla e nella vacca nell'approssimarsi al parto. Nella vacca e nella scrofa, è il corpo luteo la sorgente della relaxina. In entrambe queste due specie il rilascio pre-parto di PGF 2 alfa provoca luteolisi con concomitante diminuzione della produzione di progesterone e rilascio di relaxina preformata. In altre specie domestiche come gatte, cagne e cavalle, la sorgente di relaxina è la placenta e la sua produzione comincia nella prima parte della gestazione aumentando con l'approssimarsi al parto. Può darsi che in queste specie la relaxina agisca in sinergismo con il progesterone per il mantenimento della gravidanza (Casella e Taglietti, 1996).

Il primo stadio del parto coinvolge la presentazione del feto all'apertura interna della cervice. Questo probabilmente avviene a causa dell'aumentata attività del miometrio dovuta al rilascio di PGF 2 alfa: Quando la cervice si apre e il feto passa nel canale pelvico, le contrazioni del miometrio divengono meno importanti per partorire il feto e la contrazione dei muscoli addominali materni diviene la forza motrice principale nel processo del parto. Il secondo stadio del parto è il vero processo di espulsione del feto. Il terzo stadio del parto coinvolge l'espulsione delle membrane fetali; in animali che partoriscono più cuccioli, come cagna, gatta e scrofa, le membrane placentari sono espulse spesso insieme o immediatamente dopo l'apparire di ciascun feto. Nelle specie con un solo feto la placenta può essere espulsa immediatamente o entro alcune ore. Il maggiore rilascio di PGF 2 alfa si avrebbe proprio nell'immediato periodo dopo il parto per l'espulsione di membrane fetali e per la riduzione delle dimensioni uterine mediante contrazione del miometrio (Casella e Taglietti, 1996)

### **Lattazione: mammogenesi, lattogenesi ed eiezione del latte:**

Nelle donne lo sviluppo delle ghiandole mammarie esige l'azione diretta degli estrogeni, progesterone e ormoni ipofisari come pure la presenza di livelli basali di tiroxina, cortisolo ed insulina. Gli estrogeni inducono lo sviluppo dei dotti galattofori mentre il

progesterone stimola la formazione di lobuli e alveoli. Negli animali lo sviluppo ottimale della ghiandola mammaria richiede anche la presenza dell' ormone della crescita e della prolattina. Nella donna, il normale sviluppo della mammella è iniziato dagli estrogeni, progesterone e ormone della crescita. Nel corso della gravidanza gli elevati livelli di estrogeni e progesterone provocano l' accrescimento alveolare, in sinergia con l' azione stimolante esercitata dalla somatomammotropina corionica umana: quest' ultima in altre specie è lattogena, mentre nella femmina umana non provoca l' espulsione di latte durante il periodo gravidico (Catt, 1975).

In altre specie, la prolattina è un protide ben definito dell' ipofisi anteriore ed è di solito tenuta sotto il controllo inibitorio dell' ipotalamo. Avvenuto il parto, i livelli di prolattina aumentano in modo considerevole e si dà così l' avvio alla lattazione (Catt, 1975).

Estrogeni e progesterone appaiono indispensabili per la mammogenesi; gli estrogeni determinano l' aumento dei recettori per il progesterone e per la prolattina. La prolattina induce in particolare lo sviluppo delle strutture lobulo alveolari; esplica l' azione tramite un fattore di crescita: la synlactina. Il GH stimola invece un fattore di crescita per le cellule epiteliali. L' ormone lattogeno placentare (PL) non risulta indispensabile, poiché non presente in tutte le specie animali; contribuisce alla mammogenesi in fase di gestazione tramite l' azione di somatomedine. L' EGF è un fattore di crescita per l' epidermide ed ha un' azione paracrina; l' FGF è un fattore di crescita dei fibroblasti, ed ha anch' esso un' azione paracrina. Altri ormoni inoltre esplicano un ruolo permissivo sulla crescita e differenziazione tissutale garantendo uno sviluppo mammario ottimale anche se la loro presenza non sarebbe essenziale in vivo: insulina, corticosteroidi, ormoni tiroidei e paratormone (Casella e Taglietti, 1996).

L' inizio della lattogenesi è controllato principalmente da ormoni dell' adenoipofisi (PRL e GH) e della placenta (PL in vacche, pecore e capre). Nella maggior parte delle femmine all' avvicinarsi del parto i livelli di progesterone e PL calano. Questo declino è seguito da un aumento di PRL, estrogeni, PGF 2 alfa, ossitocina e corticosteroidi. Il progesterone limita infatti la secrezione di PRL dall' ipofisi e così la secrezione del latte. La PRL sembra essere importante per il completamento dello sviluppo mammario e l' inizio della secrezione latte; tra l' altro sarebbe necessaria per dare il via alla sintesi delle caseine. La poppata o la mungitura (ma anche altri fattori come temperatura, stagione, fotoperiodo, stress ecc.), stimolano la secrezione di PRL: gli stimoli sensoriali arrivano all' ipotalamo bloccando la sintesi di dopamina, il maggiore inibitore della sintesi di PRL, mentre i neuroni del nucleo paraventricolare sono stimolati a produrre il VIP (*vasoactive intestinal peptide*), uno stimolatore del rilascio di prolattina. Un breve

picco di secrezione di prolattina si ha immediatamente dopo l' inizio della rimozione del latte; i picchi si hanno di solito dopo 30 minuti dallo stimolo iniziale. Il rilascio di prolattina si riduce con il progredire della lattazione. Anche il GH stimola l' accrescimento mammario con meccanismo per ora non conosciuto, agendo comunque tramite le somatomedine. Meno chiaro il ruolo dell' ormone lattogeno placentare. Grazie alla sua similitudine strutturale con PRL e GH agirebbe da ormone di riserva per cui interverrebbe, sia nella mammogenesi che nella lattogenesi, quando i livelli di PRL sono bassi agendo anch' esso attraverso le somatomedine (Casella e Taglietti, 1996).

L' eiezione del latte avviene mediante un meccanismo riflesso, ed è un processo attivo ed inconscio. Il riflesso di eiezione del latte è comunemente definito “*Milk let- down*” (Broom e Fraser, 2007).

Il riflesso si manifesta attraverso un improvviso aumento della pressione del latte dopo stimolazione, che usualmente include quella delle terminazioni sensitive nervose nel capezzolo; l' intero corso del riflesso è un arco neuroendocrino che inizia con una stimolazione della mammella e passa per via periferica ed attraverso il sistema nervoso centrale, all' ipotalamo e all' ipofisi posteriore, dove l' arco si continua con la produzione di ossitocina. L' ossitocina transita attraverso il circolo ematico fino alla mammella, dove si verifica un improvviso aumento nella pressione del latte; con lo stabilizzarsi di questa pressione, il prelievo passivo di latte attraverso la suzione dell' animale è facilitato. Sembra che l' aumento dell' ossitocina nel plasma sia associato ad una sensazione di benessere nella femmina di mammifero (Broom e Fraser, 2007).

Benché uno dei principali stimoli al *milk let down* sia legato ad una stimolazione fisica locale vigorosa della ghiandola mammaria, ci possono essere altri fattori, quali ad esempio odori, suoni, stimoli visivi, che contribuiscono a ciò; allo stesso modo, rumori forti o altri stimoli che disturbano l' animale, possono causare l' entrata in circolo di adrenalina (epinefrina) che agendo direttamente sulla ghiandola mammaria, inibisce l' eiezione di latte (Broom e Fraser, 2007).

Harrys (1958), riferisce che la stimolazione apportata dal comportamento di *suckling* da parte dei giovani mammiferi induce la secrezione da parte della ghiandola pituitaria dell' ormone responsabile del mantenimento della lattazione.

Un certo numero di esperimenti indicano che gli effetti della stimolazione indotta dal *suckling* causa la secrezione di ossitocina dalla ghiandola pituitaria posteriore che determina l' eiezione di latte dalla ghiandola mammaria e induce la produzione di prolattina dall' ipofisi anteriore, che stimola la produzione di latte nella ghiandola mammaria (Meites e Turner, 1948; Rosenblatt e Lehrman, 1963; Chanova, 2009;

Macbeth, 2010).

Il colostro è prodotto già negli ultimi giorni di gestazione e nei primi 2-3 giorni dopo il parto. Il suo valore calorico è doppio del latte. L'ingestione di colostro è importante per il benessere del neonato; oltre a nutrire, il colostro ha una importante funzione che concerne la temporanea protezione passiva contro agenti infettivi. Le immunoglobuline (soprattutto IgA ma anche IgM e IgG) sono molto concentrate nel colostro e attraverso di questo il neonato può ricevere l'immunità passiva contro i patogeni con i quali la madre è venuta in contatto. I neonati di tutti gli animali domestici devono assumere anticorpi tramite l'ingestione di colostro al contrario di quanto avviene in altre specie come l'uomo (Casella e Taglietti, 1996).

E' stato evidenziato che durante le prime ore, il colostro può essere disponibile continuamente (Lewis e Hurnik, 1986; Algers e Uvnas-Moberg, 2007).

Il latte viene prodotto in seguito ed è una soluzione acquosa di minerali, carboidrati, globuli lipidici in emulsione e una miscela di proteine in dispersione colloidale. La produzione del latte tende ad aumentare nelle prime 3-4 settimane di lattazione e poi comincia lentamente a diminuire fino alla fine della lattazione (Casella e Taglietti, 1996).

## **-1-2: Fasi del parto nella cagna:**

Il parto è diviso in 4 fasi come in molti altri mammiferi multipari (Beaver, 2003; Beaver, 2009).

### **Fase contrazione:**

Quando la nascita di ciascun cucciolo è imminente, la cagna mostrerà una serie di comportamenti che possono durare da 1 a 10 minuti; questi sono i segnali manifesti della prima fase del parto, quella di contrazione (Beaver, 2003).

L'iperattività della cagna si riduce e questa spende più tempo seduta o stesa su di un fianco nel qual caso con la schiena premuta contro qualcosa di solido (Bleicher, 1962; Beaver, 2009).

La frequenza respiratoria aumenta da 100 a 175 respiri per minuto per periodi che vanno da pochi secondi a più di un minuto. Questo incremento della frequenza respiratoria si alterna a periodi di tempo in cui è presente un ritmo normale di 16-20 respiri per minuto e a periodi con una frequenza intermedia di 40-60 respiri per minuto (Bleicher, 1962; Beaver, 2009).

Questo è probabilmente correlato ai tempi delle contrazione uterine attive. In alcuni

animali queste contrazioni aiutano a posizionare il feto per il parto. Durante questa fase la cervice si dilata per il primo cucciolo. La fase delle contrazione può essere molto breve o arrivare a 36 ore in una cagna particolarmente nervosa (Freak, 1962), ma in genere dura tra le 6 e le 12 ore (Hoskins, 2001; Beaver, 2009)

### **Fase di espulsione:**

In questa fase la cagna può tremare, avere fremiti agli arti posteriori, e con poche forti contrazioni uterine spinge il cucciolo attraverso il canale del parto. Esteriormente appare un rigonfiamento appena sopra la vulva quando il feto sta per uscire; la membrana corionallantoidea inizierà ad essere espulsa dalla vulva e spesso si rompe per rilasciare il suo contenuto acquoso (Beaver, 2003; Beaver, 2009).

La fase di espulsione di solito dura pochi secondi, ma se prolungata, la cagna può iniziare a rimuovere le membrane fetali prima che il cucciolo sia completamente fuoriuscito (Bleicher, 1962; Beaver, 2009).

### **Parto:**

Le contrazioni uterine e uno sforzo dei muscoli addominali si espletano nell' espulsione del cucciolo; questa è la terza fase del parto. L' attenzione della madre volge immediatamente a leccare via i fluidi fetali dal cucciolo, da sé stessa e dai materiali presenti nel nido (Hart, 1979; Beaver, 2009).

Facendo così pulisce il cucciolo, rimuove le membrane amniotiche rimanenti e stimola i primi respiri nel neonato. La cagna morderà il cordone ombelicale e mangerà le membrane fetali. Alcuni autori combinano la fase di espulsione e parto in un' unica fase, quella dell' espulsione del feto (Freak, 1962; Hart, 1979; Beaver, 2009).

### **Fase placentare:**

La fase placentare è caratterizzata dall' espulsione della placenta; le cagne tendono ad ingerirla dopo parto. Questo comportamento di placentofagia comporta due grossi benefici alla cagna: il primo, la placenta è sorgente di proteine per la madre in quanto consuma una grande quantità di energia durante il parto (Bleicher, 1962; Beaver, 2009) e non sarà in grado di cacciare per diversi giorni; la seconda, quella di rimuovere i tessuti dal nido così che non diventino un attrattiva per potenziali predatori (Beaver, 2009).

### **-1-3: Ruolo degli ormoni nel comportamento materno:**

Rosenblatt (1967), dimostrò che esiste un livello base di responsività materna che è direttamente attivato dalle stimolazioni offerte dai piccoli e indipendente dalla mediazione ormonale; infatti, analizzando il periodo di latenza dell' inizio del comportamento materno in femmine di ratto primipare che mostravano un normale ciclo estrale, ovariectomizzate o private dell' ipofisi non riscontrò marcate differenze; analizzando però l' intensità delle cure materne in queste tre categorie di femmine notò che le femmine intere avevano un pattern di comportamento più efficace ed in particolare recuperavano i cuccioli più velocemente, costruivano meglio il nido e trascorrevano più tempo con i piccoli. Quindi secondo Rosenblatt le variazioni endocrine delle femmine con un normale ciclo estrale non sono fondamentali per lo sviluppo del comportamento materno indotto dalla sensibilizzazione, ma lo sono per l' incremento della sua intensità.

Alcuni studi hanno dimostrato che il comportamento materno sia influenzato dalla concentrazione degli ormoni sessuali e dalle loro reciproche proporzioni. Nelle pecore ad esempio, il progesterone aumenta gradualmente durante la gravidanza per poi scendere rapidamente alla nascita; l' estradiolo e la prolattina invece aumentano rapidamente in prossimità del parto, per poi ridursi al momento della nascita (Broom e Fraser, 2007; Poindron e Levy, 1990).

L' avvio alla costruzione del nido nella scrofa in natura è associato ad un declino del progesterone nel periodo peri-parto da circa 50 a 20 nmol/l ed a un aumento invece della prolattina (Ash e Heap, 1975; Taverne *et al.*, 1978; Widowsky e Curtis, 1989; Meunier-Salaun *et al.*, 1991; Castren *et al.*, 1993a; Algers e Uvnas-Moberg, 2007).

Anche l' attività di *grooming* è sotto il controllo di un ormone, la prolattina, che regola molti altri comportamenti materni (Edwards e Broom, 1982; Broom e Freaser, 2007).

Carlson (2001), riferisce invece attraverso studi sul comportamento materno nei roditori, che gli ormoni non sono essenziali nell' attivazione del comportamento materno (pur essendo invece indispensabili per la lattazione); tuttavia, molti aspetti del comportamento materno risultano facilitati dagli ormoni. Ad esempio, il comportamento di costruzione del nido è facilitato dal progesterone, l' ormone principale della gravidanza; come dimostrato da alcuni studi (Lisk, Pretlow e Friedman, 1969; Carlson, 2001), l' impianto sottocutaneo di una pillola di progesterone in femmine di topo non gravide, induce il comportamento di costruzione del nido.

La risposta materna di una femmina di roditore alla prole sembra innescata dagli ormoni

presenti durante la gravidanza: appena prima del parto il livello di estradiolo comincia ad aumentare, quindi quello di progesterone si abbassa bruscamente, con un successivo rapido incremento della prolattina (Moltz *et al.*, 1970; Bridges, 1984; Bridges, 1990; Carlson, 2001).

Rosenblatt e colleghi (1981) e Kendrick e colleghi (1997), riferiscono invece che a differenza dei roditori, modifiche nella concentrazione in circolo di progesterone ed estradiolo durante l'ultima fase della gravidanza nelle pecore, non appare essere sufficiente di per sé a stimolare l'immediata accettazione materna dell'agnello. E' inoltre improbabile che anche la prolattina giochi un ruolo maggiore nell'indurre il comportamento materno nelle pecore perché le sue concentrazioni sono più alte alla fine della gravidanza quando le risposte materne non sono mostrate (Poindron e Le Neindre, 1980; Kendrick *et al.*, 1997).

Lucas e colleghi (1998), hanno rilevato che topi con mutazioni mirate contro il gene dei recettori per la prolattina, mostrano carenze del comportamento materno, il che sostiene l'importanza della prolattina in tale comportamento in questa specie. Nello specifico, topi geneticamente privi del recettore della prolattina manifestano un ridotto comportamento di recupero dei piccoli se questi si allontanano dal nido, e nella costruzione del nido stesso (Lucas *et al.*, 1998; Marazziti *et al.*, 2008).

La prolattina è un neuropeptide implicato nel comportamento materno, costituita da 198 aminoacidi e sintetizzata primariamente nell'ipofisi anteriore; è presente in tutti i vertebrati ed è stata associata a lungo con vari aspetti di comportamento materno negli uccelli (Numan e Insel, 2003).

La prolattina è un importante componente dell'insorgenza ormono-mediata di comportamento materno nei ratti (Numan e Insel, 2003).

Molti studi supportano l'ipotesi che gli effetti della prolattina si esplicino a livello centrale; Bridges e colleghi (1990), mostrarono che anche dosi basse di prolattina erano efficaci quando date a livello centrale ed osservarono inoltre una accelerazione dose dipendente nell'insorgenza del comportamento materno; se sottoposte a dosi molto elevate, le femmine mostravano un comportamento materno completo già dopo pochi giorni.

Voci e Carlson (1973), riportano che impianti di cristalli di prolattina in prossimità dell'MPOA aumenta il comportamento di recupero dei piccoli e di costruzione del nido nelle femmine di topo.

Nei conigli (*Oryctolagus cunicoli*), la riduzione farmacologica di prolattina in tarda gravidanza riduce il comportamento materno (Gonzales-Mariscal *et al.*, 2000).

Nelle pecore, una singola iniezione centrale di prolattina non facilita la responsività materna; questo risultato conduce alla conclusione che la prolattina non è importante nel comportamento materno delle pecore (Levy *et al.*, 1996)

Anche l'ossitocina facilita l'insorgenza di comportamenti materni: è stato infatti dimostrato che l'iniezione di ossitocina nei ventricoli laterali di femmine di ratto nullipare o ovariectomizzate induceva la comparsa di comportamenti materni (Pedersen e Prange, 1979; Marazziti *et al.*, 2008).

Tali comportamenti risultavano invece inibiti dalla somministrazione di un antagonista o da lesioni ipotalamiche a carico delle cellule produttrici di ossitocina. La somministrazione di antagonisti dell'ossitocina tuttavia non è in grado di inibire comportamenti materni una volta che questi si sono instaurati (Skutella *et al.*, 1993; Marazziti *et al.*, 2008).

L'ossitocina è un neuropeptide che nei mammiferi è sintetizzata principalmente in due nuclei dell'ipotalamo, il nucleo paraventricolare e il nucleo sopraottico ed è trasportata attraverso grandi assoni neurosecretori all'ipofisi posteriore, ed è conosciuta per assolvere a due importanti funzioni nei mammiferi: l'eiezione di latte durante il *nursing* e perché determina le contrazioni uterine durante il parto (Numan e Insel, 2003).

Oltre a queste due funzioni, risulta essere anche molto importante per l'integrazione centrale della motivazione materna e/o comportamento materno (Numan e Insel, 2003).

Pederson e Prange (1979), sono stati i primi ad ipotizzare che l'ossitocina agisse sul cervello nel facilitare il comportamento materno in ratte vergini; nei loro studi questi due autori descrivono una rapida insorgenza di comportamento materno (definito come *retrieving, grouping, licking e crouching over pups*) nella maggior parte delle femmine dopo due ore dall'iniezione del peptide nel ventricolo laterale; la maggior parte delle femmine che mostrava un comportamento materno completo in risposta all'ossitocina si trovava in estro, proestro o fase iniziale dell'estro, mentre delle femmine in diestro solo una su dodici aveva mostrato comportamento materno; questo suggerisce che l'esposizione ad un elevato livello di estrogeni è importante per l'ossitocina nell'indurre un comportamento materno completo.

Wamboldt e Insel (1987), riscontrarono invece che l'ossitocina ha effetti solo in femmine anosmiche; femmine con lesioni dell'epitelio olfattivo indotte da solfato di zinco, mostravano una rapida insorgenza di comportamento materno dopo somministrazione di ossitocina, ma femmine non lesionate, non rispondevano a questo peptide.

Una serie di studi successivi condotti da Fahrbach e colleghi (1985b), riportano invece

che una riduzione della neurotrasmissione dell' ossitocina determina una profonda e consistente riduzione del comportamento materno.

Altri studi condotti hanno dimostrato come lesioni a carico del PVN al 15 giorno di gravidanza inibiscano l' insorgenza del comportamento materno al parto, ma simili lesioni non hanno effetti sul comportamento materno se effettuate tre giorni dopo il parto, quando il comportamento materno si è stabilito. Il PVN è la fonte dell' ossitocina libica; dunque, la proiezione dell' ossitocina dal PVN ai siti centrali si può concludere essere implicata nell' insorgenza, ma non nel mantenimento, del comportamento materno nei ratti (Fahrbach *et al.*, 1985b; Insel e Harbaugh, 1989; Numan e Insel, 2003). Champagne e colleghi (2001), hanno riportato che il legame dell' ossitocina ai recettori nel MPOA, setto laterale, CNA, PVN, e BST, è più alto nelle femmine che esibiscono maggiore comportamento di *licking* e *grooming* e che la somministrazione di un antagonista dell' ossitocina elimina le differenze nel comportamento di *licking* e *grooming*.

Nelle pecore invece, la somministrazione di antagonisti dell' ossitocina non hanno mostrato successo nel prevenire il comportamento materno nella suddetta specie (Kendrick, 2000; Numan e Insel, 2003); una ragione di ciò può essere che gli antagonisti che sono potenti e selettivi nei ratti, appaiono inefficaci sul cervello della pecora, probabilmente perchè i recettori dell' ossitocina non sono adeguatamente mappati nel cervello della pecora (Broad *et al.*, 1999). Questo in relazione al fatto che i recettori dell' ossitocina nel cervello hanno una elevata plasticità con profonde differenze di specie per quanto concerne la loro regolazione e distribuzione (Numan e Insel, 2003).

Inoltre il BST, frequentemente identificato come una porzione di estensione dell' amigdala (Alheid e Heimer, 1988), è insieme al nucleo centrale dell' amigdala, un importante sito per comportamenti ansiosi correlati nei ratti (Davis *et al.*, 1994) e l' iniezione di ossitocina nel nucleo centrale ha effetti ansiolitici; gli effetti dell' ossitocina sull' ansia possono essere mediati da una riduzione dell' attività del CRF (*corticotropin releasing hormone*).

Le variazioni fisiologiche degli steroidi sessuali che si verificano durante la gravidanza inducono al momento o poco prima dell' espletamento del parto, un incremento dei recettori dell' ossitocina in due regioni del sistema limbico, il nucleo della stria terminale e il nucleo ventromediale dell' ipotalamo, determinando l' insorgenza della "maternità" (Caldwell *et al.*, 1994; Marazziti *et al.*, 2008)

Questi risultati suggeriscono un possibile ruolo dell' ossitocina nell' indurre il passaggio

dall' esitamento, all' approccio nei confronti dei piccoli. Probabilmente la funzione dell' ossitocina si estrinseca a livello della VTA (area tegumentale ventrale), dell' MPOA (area preottica mediale) e del bulbo olfattivo dato che l' iniezione in tali aree di antagonisti specifici del neuropeptide inibisce lo sviluppo del comportamento materno (Pedersen *et al.*, 1994; Marazziti *et al.*, 2008).

Nelle femmine di ratto l' inizio dell' accudimento dei piccoli è favorito da lesioni che riducono la processazione degli stimoli olfattivi (Fleming e Rosenblatt, 1974; Marazziti *et al.*, 2008)

L' ossitocina rilasciata a livello centrale al momento del parto (Landgraf *et al.*, 1992; Marazziti *et al.*, 2008) sembra ridurre il *firing* delle cellule mitrali e granulari del bulbo olfattivo determinando pertanto un' inibizione all' integrazione degli stimoli olfattivi e facilitando così i comportamenti di approccio.

Studi condotti su pecore hanno dimostrato come la stimolazione cervico vaginale (VCS) induce comportamenti materni in pecore non gravide sottoposte a steroidi gonadici (Keverne *et al.*, 1983; Marazziti *et al.*, 2008) ed è in grado di determinare l' accettazione di un agnello estraneo anche due o tre giorni dopo la formazione del legame di attaccamento al proprio agnello (Kendrick *et al.*, 1991; Marazziti *et al.*, 2008 ). L' anestesia epidurale inibisce gli effetti della VCS suggerendo l' esistenza di un feedback a livello centrale (Lèvy *et al.*, 1996; Marazziti *et al.*, 2008).

La VCS e la nascita stimolano potentemente il rilascio di ossitocina nel SNC della pecora (Kendrick *et al.*, 1988; Marazziti *et al.*, 2008) favorendo la comparsa del comportamento materno. La VCS non solo è importante perché promuove il comportamento materno nella pecora, ma appare giocare un ruolo importante anche nel promuovere il riconoscimento olfattivo che sottintende alla formazione del legame selettivo tra la madre ed il neonato (Numan e Insel, 2003).

Studi effettuati su pecore hanno dimostrato che gli oppioidi potenziano gli effetti della stimolazione vaginocervicale nel promuovere la responsività materna all' agnello (Numan e Insel, 2003).

La prolattina non è il solo ormone lattogeno ; difatti gli ormoni lattogeni sono prodotti anche dalla placenta, ed alcune evidenze empiriche ne indicano la capacità di stimolare il comportamento materno (Carlson, 2001).

Ormoni lattogeni come l' ormone lattogeno placentare nei ratti, mima gli effetti della prolattina sul comportamento materno quando infuso nell' MPOA (Bridges *et al.*, 1997; Numan e Insel, 2003).

Bridges (1984), ha analizzato il liquor cerebrospinale (LCS) di ratti in gravidanza liberi

di muoversi, rilevando la presenza di ormoni lattogeni placentari dopo il 12° giorno di gestazione; il fatto che questi ormoni siano presenti nel LCS indica che vengono trasportati nel cervello e che quindi sono potenzialmente in grado di influenzare il comportamento.

Maestripieri e Zehr (1998), riferiscono che per un lungo periodo di tempo la risposta materna nei primati non umani è stata considerata non influenzata da fattori endocrini ma interamente dipendente dall'esperienza e dalla cognizione. Studi condotti da questi due autori su femmine di *Rhesus macacus* che vivono in gruppo hanno invece dimostrato che queste femmine hanno presentato un incremento del loro tasso di interazione con i piccoli in corrispondenza di un aumento di livelli plasmatici di estradiolo e progesterone nelle ultime settimane di gravidanza. Femmine *Rhesus* ovariectomizzate trattate con estrogeni presentano un incremento del tasso di interazione con i cuccioli; questa è la prima evidenza che gli ormoni steroidei influenzano la risposta materna nei primati non umani. D'altro canto, tutte le femmine ovariectomizzate non trattate e le femmine non gravide hanno comunque interagito con i piccoli, il che indica che gli estrogeni possono sì migliorare la capacità di risposta ai neonati, ma né gli ormoni ovarici né quelli della gravidanza sono comunque necessari per l'espressione del comportamento di interazione con i cuccioli nelle femmine di primate non umano.

Anche le beta endorfine e i loro recettori, hanno riscontrato particolare interesse negli studi sul comportamento materno perché è stato evidenziato che questo peptide media il comportamento affiliativo come il *grooming* in primati non umani (Fabrenys *et al.*, 1982; Keverne *et al.*, 1989; Numan e Insel, 2003).

L'aggressività materna è una forma distinta di aggressività che si riscontra in femmine in lattazione, ed è stata evidenziata essere più imponente nei ratti durante le prime due settimane di lattazione (Erskine *et al.*, 1978; Nephew e Bridges, 2008); Ha inizio subito dopo il parto, con picco al 5-9° giorno di lattazione per poi ridursi gradatamente nei giorni successivi (Erskine *et al.*, 1978; Mayer *et al.*, 1987; Nephew e Bridges, 2008).

E' dunque un comportamento altamente espresso durante l'allattamento e serve a proteggere i piccoli in via di sviluppo da intrusi che potrebbero danneggiare la prole (Nephew *et al.*, 2009).

Considerando che i fattori endocrini durante il parto e la lattazione, sono essenziali per l'evidenziarsi della aggressività materna nelle femmine di ratto (Erskine *et al.*, 1980b), l'ipofisiectomia effettuata il quinto giorno del post-partum non riesce a modificare tale comportamento aggressivo, il che può indicare che l'espressione dell'aggressività

materna può non essere regolata dagli ormoni della ghiandola pituitaria durante l' allattamento (Erskine *et al.*, 1980a; Nephew e Bridges, 2008).

Diversi studi suggeriscono che i neuroormoni che possono essere coinvolti nella modulazione dell' aggressività materna includono l' ossitocina, il CRF (*corticosterone releasing factor*) e AVP. Essendo l' ossitocina coinvolta nel controllo dell' aggressività materna, lesioni al nucleo paraventricolare dell' ipotalamo (PVN) determinano una riduzione dell' ossitocina stessa ed aumentano l' aggressività materna (Giovenardi *et al.*, 1997,1998; Nephew e Bridges, 2008).

Il sistema vasopressinergico può egualmente mediare l' aggressività materna, oltre che il comportamento materno e l' attività di *grooming* in ratti femmine in lattazione (Nephew e Bridges, 2008).

Sembra che l' AVP (arginina-vasopressina) sia in effetti implicata nella modulazione del comportamento di aggressività materna; difatti, somministrando un antagonista dell' AVP a ratte femmine in allattamento, si ha una stimolazione dell' aggressività nei confronti di intrusi a partire dalla seconda metà della lattazione, mentre anche l' AVP stesso sembra avere minori effetti durante le fasi più precoci di allattamento.

Madri pluripare manifestano un comportamento aggressivo nei confronti di estranei in maniera maggiore rispetto che madri primipare (Nephew *et al.*, 2009).

Per quanto concerne il CRF, gli effetti che questo esercita sull' aggressività materna sono legate alle sue proprietà ansiogene; agisce determinando una riduzione della paura e dell' ansia mediando l' espressione dell' aggressività materna (Gammie *et al.*, 2004; Nephew e Bridges, 2008).

#### **-1-4: Controllo neurale del comportamento materno:**

L' area preottica mediale, la regione proencefalica che gioca il ruolo più importante nel comportamento sessuale maschile, sembra esercitare un ruolo simile in quello materno. L' APM invia assoni al tronco cerebrale inferiore e al mesencefalo (Carlson, 2001).

Dobolvyi e colleghi (2014), riportano che l' area preottica è un centro ben consolidato per il controllo del comportamento materno; è necessaria la presenza di un' area preottica mediale integra (MPOA) per ottenere la risposta materna, in quanto una lesione a carico di questa zona abolisce tale risposta. Anche se i cambiamenti ormonali nel periodo peri-parto contribuiscono all' avvio della sensibilità materna, è necessario che la madre sia esposta alla presenza della sua prole per averne il mantenimento; i neuroni sono attivati in diverse parti dell' MPOA in risposta all' esposizione del

cucciolo. Risultati certi sul percorso che media gli effetti della suzione al MPOA suggeriscono che i neuroni contenenti il TIP39 (tuberoinfundibulare peptid 39) nel talamo posteriore sono candidati per la trasmissione delle *suckling information* al MPOA; anche se il meccanismo molecolare attraverso il quale questi input alterano i neuroni dell' MPOA per sostenere il mantenimento della risposta materna non è ancora noto, l' ipotesi di una espressione genica alterata è una probabile candidata.

Numan (1974), ha rilevato che le lesioni dell' APM influenzano negativamente sia il comportamento di costruzione del nido nei roditori, sia quello di cura della prole; le madri semplicemente ignorano i loro piccoli. Tuttavia il comportamento sessuale femminile non risente affatto di queste lesioni.

Numan (1990), ha esaminato gli effetti a lungo termine, o effetti cronici, di connessioni laterali dell' MPOA/vBST separate chirurgicamente, sul comportamento materno; le femmine di ratto subivano il taglio delle zone suddette 2 settimane prima dell' accoppiamento e, dopo la nascita dei piccoli, il loro comportamento materno veniva studiato per 2 settimane (quindi il test di valutazione del comportamento materno veniva studiato all' incirca 5 settimane dopo il taglio). In queste femmine, il comportamento di *retrieving* risultava abolito, la costruzione dei nidi era inferiore, ma il comportamento di *nursing* risultava mantenuto; dunque le femmine erano comunque capaci di allattare e i loro piccoli guadagnavano peso giornalmente. Questo risultato indica che gli effetti di un taglio all' MPOA laterale sulla responsività materna è che questo distrugge il comportamento di *retrieving*. Dunque, il recupero di un comportamento di *nursing* normale era il risultato di qualche tipo di riorganizzazione neurale entro i circuiti dell' MPOA/vBST che erano rimasti intatti dopo il taglio (Numan, 1990; Numan e Insel, 2003).

Jacobson e colleghi (1980) e Terkel e colleghi (1979), inizialmente proposero che le connessioni dorso-laterali dell' MPOA possono essere particolarmente importanti per le componenti attive del comportamento materno, cioè quelle componenti (*retrieving* e *nest building*) attivamente iniziate dalla femmina; in accordo a queste ricerche, il *nursing* si presenta perché è primariamente iniziato dai cuccioli ed è dunque visto come una risposta materna passiva.

Lee e colleghi (2000), hanno riscontrato invece attraverso i loro studi che lesioni elettriche a carico dell' MPOA eliminano il comportamento di *retrieving*, *nest building* e *nursing* nelle femmine sottoposte a tali procedure,

Numan e Numan (1997), hanno dimostrato che i neuroni dell' APM, attivati dalla messa in atto del comportamento materno, inviano assoni in due regioni mesencefaliche: l'

area tegmentale ventrale e il campo retrorubrale. Il campo retrorubrale del mesencefalo invia assoni in diverse regioni della formazione reticolare del tronco cerebrale, che possono essere coinvolte nell'espressione del comportamento materno. Se si recidono le connessioni tra l'APM ed il tronco cerebrale, si abolisce il comportamento materno.

L'area preottica mediale sembra essere il luogo in cui l'estradiolo influenza il comportamento materno. L'APM contiene recettori per gli estrogeni. Studi hanno rilevato che la concentrazione di recettori per gli estrogeni nell'APM aumenta durante la gravidanza, e sembra riflettere l'effetto di innesco prodotto dalla stimolazione ormonale sequenziale che caratterizza la gestazione. Anche la prolattina sembra influenzare il comportamento materno, agendo sui neuroni dell'APM (Carlson, 2001).

Numan e colleghi (1977), hanno riscontrato che impianti di estradiolo nell'MPOA facilitano l'insorgenza del comportamento materno (*retrieving, nursing, nest building*) in femmine di ratto ovariectomizzate ed isterectomizzate al sedicesimo giorno di gravidanza, mentre impianti di estradiolo in altre regioni del cervello (come VMN e corpi mammillari) o sottocutanei, o impianti di colesterolo nell'MPOA sono inefficaci (Numan *et al.*, 1977; Numan e Insel, 2003).

Altri studi hanno evidenziato la regione MPOA/vBST dove gli ormoni lattogeni (prolattina e lattogeno placentare) agiscono a stimolare l'insorgenza del comportamento materno (Numan e Insel, 2003); Bridgers e colleghi (1990), hanno mostrato che una iniezione bilaterale di prolattina nell'MPOA facilita l'insorgenza di comportamento materno in femmine di ratto vergini che sono state trattate con un sequenziale ormone steroideo.

Nei roditori e nelle pecore, l'induzione del comportamento materno è associato all'aumento dell'espressione genica di c-fos in un certo numero di regioni quali la corticale, il sistema ipotalamico, il sistema limbico ed il tronco encefalico (Calamandrei e Keverne, 1994; Numan e Numan, 1994; Luckman, 1995; Numan e Numan, 1995; Da Costa *et al.*, 1997; Kendrick *et al.*, 1997).

Sebbene questi esperimenti suggeriscano che l'induzione/esibizione del comportamento materno può coinvolgere una vasta gamma di circuiti neurali nel cervello, è stato spesso difficile determinare quanto incidono le modifiche nell'espressione genica di c-fos nell'indurre il comportamento materno, rispetto a stimoli olfattivi provenienti dalla prole (Da Costa *et al.*, 1997; Kendrick *et al.*, 1997).

E' certo che le regioni neurali del proencefalo mostrano una *selective Fos activation* in risposta alla presentazione dei cuccioli e questo suggerisce un loro coinvolgimento positivo nel comportamento materno (Numan e Insel, 2003) in accordo con precedenti

studi condotti da Sheehan e colleghi (2000).

Strutture neurali, come il bulbo olfattivo principale, subiscono profondi cambiamenti quando esposti agli odori della prole al momento del parto; questi cambiamenti nel circuito sinaptico contribuiscono tanto alla risposta materna a questi odori, quanto alla loro memorizzazione, e agli effetti di esperienza materna a lungo termine (Levy *et al.*, 2004).

Una posizione influente sulle basi sensoriali del comportamento materno nei ratti è stata presa da Beach e Jaynes (1956c), quando essi svilupparono il concetto di controllo multisensoriale. In accordo con questa visione, sebbene molti stimoli legati al neonato possano influenzare le risposte materne nei ratti, non è essenziale una singola modalità sensoriale per ottenere un'adeguata performance di comportamento materno.

Beach e Jaynes (1956c), trovarono che l'eliminazione chirurgica della vista, dell'olfatto o della sensibilità tattile del muso o della regione periorale, non previene la risposta. In aggiunta dell'eliminazione di almeno due o tre di queste modalità sensoriali, sebbene causino deficit nel comportamento di recupero, non aboliscono tale comportamento.

La visione di un controllo multisensoriale è stata ulteriormente supportata in studi di Herrenkohl e Rosenberg (1972). In questi studi ratti femmine primipare sono state rese cieche, sorde o rese anosmiche durante la gravidanza ed è stato riscontrato che il loro successivo comportamento materno (recupero e allattamento) rimaneva intatto nel periodo post-parto.

Successive ricerche hanno confermato i dati sulla vista e l'udito, nessuno dei quali è essenziale per il comportamento materno dei ratti (Ihnat *et al.*, 1995; Kolunie *et al.*, 1994; Numan e Insel, 2003).

Ci sono due maggiori strutture chemosensoriali nelle cavità nasali dei roditori: la prima i neuroni sensoriali olfattivi che si proiettano centralmente al bulbo olfattivo principale, ed i neuroni sensoriali vomeronasali che si proiettano al bulbo olfattivo accessorio. Due ricerche hanno confermato i precedenti lavori che indicano che nessuno di questi sistemi sensoriali è essenziale per il comportamento materno nei ratti: il primo studio è stato effettuato andando ad apportare danni periferici ai neuroni sensoriali olfattivi primari con una infusione intranasale di solfato di zinco che non ha eliminato il comportamento materno nel post-parto nei ratti (Benuck e Rowe, 1975; Jirik-Babb *et al.*, 1984; Kolunie e Stern, 1995; Numan e Insel, 2003); il secondo studio ha previsto il taglio dei nervi vomeronasali o la rimozione dell'organo vomeronasale ed è stato evidenziato che questi non interferiscono nel comportamento materno post parto nei ratti (Fleming *et al.*, 1992; Jirik Babb *et al.*, 1984; Kolunie e Stern, 1995; Numan e Insel, 2003).

Qualche polemica è stata sollevata quando sono stati valutati gli effetti della bulbectomia sul comportamento materno dei ratti; in conferma ai lavori di Beach e Jaynes (1956b) e Herrenkohl e Rosenberg (1972), Fleming e Rosenblatt (1947b) hanno riportato che femmine di ratto primipare che sono state bulbectomizzate durante la gravidanza hanno mostrato un comportamento normale durante il primo periodo post parto.

In contrasto Benuck e Rowe (1975) e Kolunie e Stern (1995), hanno riportato moderati deficit nel comportamento materno di ratte primipare che sono state bulbectomizzate prima del parto. Un deficit maggiore è stato riscontrato nel comportamento al momento del parto: non tutti i cuccioli venivano puliti dalle loro membrane e dalla placenta, e entro qualche ora dopo il parto era presente un elevato tasso di mortalità dei cuccioli di femmine bulbectomizzate. Vale la pena notare tuttavia che in entrambi questi studi la maggior parte dei cuccioli era con il tempo riportata al nido, allattata e portata fino allo svezzamento. Dunque la bulbectomia non elimina il comportamento materno in toto.

I bulbi olfattivi fanno parte del sistema nervoso centrale ed i loro neuroni ricevono input afferenti da diversi nuclei del sistema nervoso centrale e da più lontani come il tronco cerebrale (Shipley e Ennis, 1996; Numan e Insel, 2000).

Hatton e colleghi (1989), hanno dimostrato che il nucleo sopraottico dell'ipotalamo riceve inputs glutamatergici sia dai bulbi olfattivi efferenti accessorio e principale (Smithson *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1995; Numan e Insel, 2003).

Il nucleo sopraottico contiene neuroni magnocellulari per l'ossitocina che si proiettano al lobo neurale dell'ipofisi; una funzione dell'ossitocina rilasciata dalla neuroipofisi è di stimolare le contrazioni uterine associate al parto (Swanson e Sawchenko, 1983; Numan e Insel, 2003).

Quindi, una possibilità è che un danno sia al bulbo olfattivo principale che accessorio interferisca con il rilascio di ossitocina durante il parto. Come le femmine annusano e leccano parzialmente i cuccioli espulsi durante il parto, input olfattivi possono promuovere il rilascio di ossitocina che a sua volta si esplica nell'espulsione del cucciolo (Hatton e Yang, 1990; Numan e Insel, 2003).

Può la visione multisensoriale di comportamento materno di Beach e Jaynes (1956c) proposta sulla base dei dati ottenuti sui ratti, essere estesa ad altre specie di roditori? La risposta è no, almeno quando consideriamo il coinvolgimento dell'olfatto nel comportamento materno di topi. La bulbectomia olfattiva effettuata sia durante la gravidanza o nel periodo post-partum, elimina i comportamenti di cure alla prole nei topi (Gandelman *et al.*, 1971a; Gandelman *et al.*, 1971b; Numan e Insel, 2003).

Per quanto riguarda la pecora invece, diverse ricerche hanno enfatizzato l'importanza dell'olfatto nel comportamento materno; il primo punto degno di nota è che al parto ci sono importanti cambiamenti mediati dall'olfatto nella preferenza della pecora per i fluidi amniotici (Levy *et al.*, 1983; Numan e Insel, 2003).

Sia l'avversione che la preferenza per i fluidi amniotici sono mediate dal sistema olfattivo principale; Levy e colleghi (1983), hanno mostrato che pecore che ricevevano un trattamento intranasale con solfato di zinco non mostravano né avversione né attrazione per i fluidi amniotici; questo risultato suggerisce che la presenza di fluidi amniotici sul cucciolo neonato può essere uno stimolo olfattivo generalmente positivo che consente alla pecora partoriente di rispondere al suo agnello. Ci sono alcune evidenze a favore di questa visione, come da parte di Levy e Poindron, (1987) e Levy *et al.*, (1995b).

Anche se uno spostamento in favore della preferenza olfattiva verso i fluidi amniotici gioca un ruolo facilitatore per quanto riguarda la responsività materna, una tale attrazione non è essenziale per il manifestarsi del comportamento materno (Numan e Insel, 2003).

Per quanto concerne il ruolo del sistema somatosensoriale e degli input tattili sul controllo del comportamento materno nei roditori, Stern (1996a), sostiene che gran parte delle madri di mammifero spendono molto tempo nel contatto fisico, ci si potrebbe aspettare che gli input sensoriali somatici giochino un ruolo importante nella regolazione della responsività materna.

Nonostante Beach e Jaynes (1956c), riportino che l'eliminazione chirurgica della sensibilità tattile del muso e della regione periorale non previene il manifestarsi delle risposte nel post-partum nei ratti, essi non hanno indicato il tempo intercorso tra la resezione del nervo trigemino e ed i loro test, né hanno verificato che la loro procedura di deafferentazione attua una mancanza di sensibilità somatica periorale. Pertanto, è certamente possibile che la rigenerazione periferica delle connessioni del nervo trigemino alla regione periorale, con un concomitante ripristino delle funzioni, esiti nei loro risultati negativi.

Kenyon e colleghi (1981,1983), riferiscono che una sezione della branca infraorbitale del nervo trigemino può eliminare il comportamento di *retrieval* nelle ratte che allattano; la femmina si avvicina ai cuccioli che si sono allontanati e li annusa ma probabilmente a causa di un deficit nel feedback sensoriale tattile, non li recupera.

Questi risultati di Kenyon e colleghi (1981,1983), concludono che sebbene la sensibilità tattile periorale sia importante per il recupero, non è indispensabile; questa conclusione

è in accordo con la visione di un controllo multisensoriale del comportamento materno di Beach e Jaynes (1956c).

Stern e Johnson (1989) e Stern e Kolunie (1989,1991), riportano che l' input tattile dalla regione periorale può avere effetti più generali sulla responsività materna operando su più alti livelli del sistema nervoso centrale; in particolare, essi hanno riferito che le femmine che nel post -partum non recuperano i loro cuccioli perché per esempio hanno subito una sezione del nervo infraorbitale, probabilmente in aggiunta non allatteranno i loro cuccioli, anche quando questi vengono rimessi nel nido con la madre.

Giovenardi e colleghi (1997,1998), Lonstein e Stern (1998), Nephew e Bridges (2008), riferiscono attraverso studi condotti circa il comportamento di aggressività materna presente in femmine di ratto in lattazione, che le importanti aree neurali coinvolte nel controllo dell' aggressività materna includono i nuclei laterali e periaqueduttale grigio ventrolaterale caudale ed il nucleo paraventricolare, dal momento che lesioni nel post-partum di queste zone facilitano il manifestarsi dell' aggressività materna.

Al contrario, lesioni a carico del setto mediale e ventrale dell' ipotalamo riducono l' aggressività materna (Flannelly *et al.*, 1986; Hansen, 1989; Nephew e Bridges, (2008).

Il ruolo del nucleo paraventricolare dell' ipotalamo è interessante perché lesioni a carico di questa struttura interferiscono inoltre con l' insorgenza del comportamento materno, ma non nel suo mantenimento se questo si è già stabilito; nello specifico, se le lesioni al PVN sono effettuate durante la gravidanza nelle ratte, l' insorgenza del comportamento materno al momento del parto è gravemente compromessa (Insel e Harbaugh, 1989; Numan e Insel, 2003).

AHN, VMN e PMd si proiettano solidamente al nucleo periaqueduttale grigio (PAG) nel mesencefalo, una regione che è criticamente coinvolta nella regolazione di diverse reazioni somatiche e autonome legate alla paura, all' ansia, alla risposta scappa-fuggi e nell' aggressività difensiva (Bandler e Shipley, 1994; Behbehani, 1995; Numan e Insel, 2003).

Inoltre, studi condotti da Lonstein e Stern (1997a), hanno mostrato che la porzione ventrolaterale del nucleo periaqueduttale grigio caudale (cPAGvl) nel mesencefalo è coinvolta nel regolare l' insorgenza di una postura di *nursing* "quiescent-crouch" (accovacciata-di riposo), mentre non è essenziale per la regolazione di altri aspetti del comportamento materno; hanno riportato inoltre che la stimolazione indotta dal *suckling* dei cuccioli, che è un importante stimolo nell' elicitazione e mantenimento di una postura di cufosi, è anche un potente stimolo per l' induzione dell' espressione di cfos nel cPAGvl. Lesioni elettriche specificatamente rivolte al cPAG, risultano invece in una

eliminazione della postura cifosica, mentre non eliminano gli aspetti attivi e volontari del comportamento materno, come il *retrieving*, *licking* e *nest building*; inoltre, il tempo totale dedicato al *nursing* non è comunque diminuito in relazione a queste lesioni, perché il decrescere della tenuta di una postura cifosica è compensato da un aumento di altri tipi di *nursing* (*nursing* in posizione supina, prona ecc.).

### **-1-5: Comportamento pre-parto nelle diverse specie animali:**

In alcune specie possono verificarsi cambiamenti comportamentali particolari nell'immediato periodo pre-parto, ad esempio cagne e gatte ricercano un posto tranquillo e frequentemente, se vivono in un ambiente casalingo, si rifugiano sotto i mobili (Casella e Taglietti, 1996).

All'aperto alcune cagne possono scavare grosse buche come fanno i lupi, probabilmente eredità ancestrale dei cani che scavavano i propri nidi (Beaver, 2009).

Al termine di una gravidanza normale la cagna ricerca dunque un posto tranquillo in cui siano presenti materiali appropriati per la costruzione del "nido"; la femmina è irrequieta e smuove continuamente i materiali utilizzati per la costruzione del nido (Beaver, 2009).

Tra le 12 e le 24 ore prima del travaglio si alzerà e si rimetterà giù. Chiederà di andare dentro e fuori in caso di una cagna casalinga, e mostrerà una maggiore amichevolezza verso persone familiari, ma anche una maggiore aggressività nei confronti di sconosciuti, il che è probabilmente un comportamento ereditario di quando dovevano proteggere il nido (Bleicher, 1962; Beaver, 2009).

Le pecore prossime al parto sviluppano un prematuro istinto materno con un accresciuto interesse per gli agnelli di altre con specifiche (Casella e Taglietti, 1996).

Molti animali che sono normalmente unità di un gregge o di una mandria, cercano un certo grado di separazione dal resto del gruppo al momento del parto; questo arrangiamento permette una immediata associazione tra la madre ed il suo neonato (Broom e Fraser, 2007).

Le femmine di roditore, all'avvicinarsi del parto costruiscono il nido che ospiterà i loro piccoli utilizzando materiali diversi trovati nelle vicinanze del luogo scelto per la creazione del nido stesso ed in alcuni casi prelevando anche peli dal proprio corpo (Rosenblatt e Lehrman, 1963).

La forma della struttura del nido dipende dal materiale disponibile per la sua costruzione. In laboratorio in genere si forniscono striscie di carta agli animali oppure

pezzi di corda o di spago (Carlson, 2001).

La scrofa in condizioni naturali, un giorno o due prima dell' inizio del parto, si separa dal resto del gruppo e cerca un luogo adatto per partorire, riparato da vento e pioggia, con un terreno ben drenato e la possibilità di scavare una buca poco profonda (Grundlach, 1968; Fradrich, 1974; Jense, 1986; Algers e Uvna-Moberg, 2007). L' avvio alla costruzione del nido è associato ad un declino del progesterone nel periodo periparto da circa 50 a 20 nmol/l ed a un aumento invece della prolattina (Ash e Heap, 1975; Taverne *et al.*, 1978; Widowsky e Curtis, 1989; Meunier-Salaun *et al.*, 1991; Castren *et al.*, 1993a; Algers e Uvna-Moberg, 2007). La costruzione del nido inizia durante le 24 ore che precedono il parto ed ha la massima intensità tra le 12 e le 6 ore prima dello stesso (Vestergaard e Hansen, 1984; Jensen, 1986; Algers e Uvna-Moberg, 2007).

La costruzione del nido nella scrofa è eseguita per fasi: nella prima, la scrofa scava una buca poco profonda che copre con rami e cespugli che dispone anche lungo i bordi del nido. La costruzione del nido termina con la scrofa che raccoglie materiale più morbido come ad esempio erba e la dispone all' interno del nido, cosicché esso risulti confortevole e possa provvedere alla termoregolazione e al riparo dei suinetti (Jensen, 1986; Jensen, 1993; Algers e Uvna-Moberg, 2007).

In condizioni di allevamento, la scrofa in prossimità del parto viene trasferita in una apposita cassa di gestazione e parto dove essa è tenuta individualmente e senza la possibilità di girarsi intorno; questa pratica permette una ridotta mortalità dei piccoli per schiacciamento da parte della madre (Algers e Uvna-Moberg, 2007).

### **-1-6: Comportamento materno nel periodo post-partum nelle diverse specie animali:**

Sebbene sia primati umani che non umani esibiscano spontaneamente cure materne, queste non si manifestano normalmente nelle altre specie di mammiferi dove le femmine usualmente devono essere sottoposte ad una gravidanza ed a un parto per l' induzione di una risposta materna immediata e di successo nei confronti della prole (Dixson, 1983; Kendrick *et al.*, 1997).

Ci sono diversi tipi di comportamento materno esibiti dai mammiferi, che sono dipendenti dall' habitat in cui vivono e dalle condizioni di sviluppo dei loro piccoli alla nascita (Reinghold, 1963; Rosenblatt *et al.*, 1985; Kendrick *et al.*, 1997; Numan, 1994; Numan e Insel, 2003).

Broom e Fraser (2007), riferiscono che l' immediato periodo post-partum è caratterizzato da due fasi fondamentali, quali l' espulsione della placenta e il "grooming" (toelettatura) del neonato.

Le membrane fetali sono espulse in genere senza sforzo eccessivo durante le prime ore che seguono la nascita del/dei cucciolo/i. È stato osservato che le cagne leccano vigorosamente il loro neonato, staccano il cordone ombelicale e usualmente consumano le membrane fetali e la placenta (Harrop, 1960; Bleicher, 1962; Scott e Fuller, 1965; Fuller e Fox, 1969; Dunban *et al.*, 1981).

Le vacche ingeriscono le membrane fetali dopo la loro espulsione (Placentofagia); non tutte le specie animali sono però placentofagiche: lo sono ad esempio le vacche, le scrofe, la cagna, mentre il comportamento di placentofagia non è presente nella cavalla (Hudson e Mullord, 1977; Broom e Fraser, 2007; Beaver, 2009).

Le vacche che hanno appena partorito possono in alcuni casi ingerire anche la lettiera contaminata dai fluidi fetali e placentari. Le specie che sono placentofagiche, in genere, mantengono il proprio neonato chiuso nel luogo di nascita per qualche giorno almeno; di contro, le specie non placentofagiche conducono via i giovani dal loro luogo di nascita molto precocemente (Hudson e Mullord, 1977; Broom e Fraser, 2007)

I vari pattern di comportamento sono da attribuirsi in parte alle caratteristiche del neonato di: non riuscire a muoversi dopo nascita, seguire la madre o esser tenuto nascosto. I gattini appena nati o i cuccioli di cane non sono in grado di muoversi dal luogo di nascita, mentre i piccoli di ungulati al pascolo sono più precoci e riescono a camminare già poco dopo la nascita. Ne risulta dunque che alcune specie danno alla luce cuccioli che hanno una rapida capacità di sviluppo, essendo già in grado di muoversi fin dall' immediato post-partum; altre invece mettono alla luce cuccioli che non hanno questa capacità e di conseguenza scelgono come luogo per partorire un posto coperto, tale da camuffare il piccolo da eventuali attacchi da parte di predatori. Sebbene la madre tenda a scegliere un luogo di nascita che offra rifugio e sicurezza ai cuccioli, questa può, o non può, rimanera chiusa tutto il tempo con i neonati (Hudson e Mullord, 1977; Kendrick *et al.* 1997; Broom e Fraser, 2007).

Le specie che restano all' interno del nido, alternano periodi di isolamento con periodi di contatto con la propria madre (Broom e Fraser, 2007). Il nido ha la funzione di isolare e proteggere i piccoli durante le assenze del genitore (Numan e Insel, 2003).

Le specie che invece sono in grado di camminare e di seguire la madre, come nel caso del puledro/cavalla, hanno contatti molto più frequenti con la madre stessa. Queste strategie di comportamento post- partum, servono come mezzo per cercare di ridurre al

minimo la predazione del neonato (Broom e Fraser, 2007).

Con la nascita dei cuccioli, si sviluppa immediatamente la vitale relazione tra la madre ed il neonato (Broom e Fraser, 2007).

Molti animali che sono normalmente unità di un gregge o di una mandria, cercano un certo grado di separazione dal resto del gruppo al momento del parto; questo arrangiamento permette una immediata associazione tra la madre ed il suo neonato. La coppia, nel suo relativo isolamento, si lega molto rapidamente ed in maniera efficiente (Broom e Fraser, 2007; Alexander, 1988).

Alexander (1988), riferisce che il forte interesse che la femmina di ungulato mostra nei confronti del proprio cucciolo è associato ad un concomitante ridotto interesse nei confronti di altri partner verso i quali si può verificare in alcuni casi anche un aumento di aggressività nei loro confronti.

Kendrick e colleghi (1997), riferiscono che negli ungulati si forma un legame individuale forte e selettivo tra la madre e la sua prole usualmente entro 1-2 ore dal parto e dopo che questo si è formato, essa mostrerà risposte forti ed aggressive ai piccoli estranei alla sua cucciolata che si avvicineranno per allattarsi; questo comportamento è legato al fatto che non solo la madre fornisce il latte ai suoi piccoli e ciò serve a garantire il perpetuarsi del suo materiale genetico, ma anche fornisce le basi per un legame affettivo duraturo tra lei stessa e la sua prole.

Molte femmine di mammifero inoltre producono specifiche vocalizzazioni nel post partum; durante il *grooming* sia la madre che la prole possono vocalizzare e questo è molto importante per lo sviluppo del legame madre-neonato (Broom e Fraser, 2007).

Ad esempio, i piccoli di topo, ratto e criceto emettono almeno due tipi diversi di richiamo ultrasonico, non percepibili dall' orecchio umano, ma ovviamente percepiti dalla madre (Carlson, 2001; Noirot, 1972; Hofer e Shair, 1993).

Tra le modalità sensoriali che suscitano comportamento materno nei roditori, alcune tra le più importanti sembrano essere la sensibilità somatica e l' olfatto. La madre difatti, già al termine della prima settimana diventa molto abile a discriminare i suoi piccoli da altri di altre cucciolate della stessa età, già solo attraverso gli stimoli olfattivi (Rosenblatt e Lehrman, 1963).

Levy e colleghi (2004), riportano che nei mammiferi, gli stimoli olfattori sono utilizzati in molti aspetti delle cure materne per garantire la coordinazione dell' interazione madre-neonato e conseguentemente il normale sviluppo della prole. Al momento del parto, si verifica un cambiamento nel valore edonistico degli odori infantili cosicché il cucciolo diventa uno stimolo molto potente e questo processo sensoriale gioca un ruolo

importante nel sistema motivazionale materno. L'odore dei neonati fornisce una base per il riconoscimento individuale da parte della madre ed alcune specie, tra cui gli ungulati, hanno sviluppato un meccanismo altamente specializzato per elaborare i segnali del neonato. Mentre non c'è una funzionalità specifica sia del sistema olfattorio principale che accessorio nello sviluppo del comportamento materno tra le specie, è stato evidenziato che solo il sistema olfattorio principale è implicato quando è richiesta una discriminazione del piccolo in base all'odore individuale di ciascun membro della prole.

La scrofa riconosce i suoi suinetti attraverso stimoli olfattori, ed essa può dimostrarsi spesso aggressiva nei confronti di suinetti estranei alla sua cucciolata (Fradrich, 1974; Algers e Uvnas-Moberg, 2007).

Attraverso studi svolti su ratti di laboratorio, è emerso come durante la prima settimana di vita il neonato abbia un ruolo nel complesso passivo nell'instaurarsi della *relationship* tra la madre ed il piccolo stesso; il cucciolo inizia a contribuire attivamente nell'instaurarsi di questo legame a partire dalla fine della seconda settimana di vita, quando essi iniziano ad avere una migliore capacità di termoregolazione, iniziano a muoversi e sviluppano rapidamente capacità percettive. Altri studi hanno dimostrato come, privando dei propri cuccioli una femmina di ratto subito dopo il parto, e riproponendoglieli per brevi sessioni nell'arco delle quattro settimane post partum, questa non sviluppi il normale ciclo di comportamento materno che altrimenti mostrerebbe (Rosenblatt e Lehrman, 1963).

Numan e Insel (2003) e Broom e Fraser (2007), hanno analizzato il concetto di *parental investment* e come questo aiuti a spiegare le strategie dopo l'accoppiamento ed il conflitto genitore-prole: "il *parental investment* è un investimento da parte di un genitore nei confronti della propria prole, che aumenta le chance di sopravvivenza e di riproduzione della prole stessa, a spese dell'abilità del genitore". Una pecora manifesta un alto *parental investment* nei confronti del proprio agnello, non solo nel portare avanti la gravidanza, ma anche elargendogli molte cure dopo la nascita. Il costo delle cure parentali aumenta con l'età del giovane, per esempio perché agnelli più grossi necessitano di una maggiore quantità di latte rispetto ad un agnello appena nato; quindi, il rapporto beneficio-costi si riduce come il giovane si accresce.

Come il processo di selezione naturale favorisce da un punto di vista riproduttivo gli animali più competenti, così agevola quelli che riescono a prendersi cura adeguatamente della prole, se ne ha bisogno; i piccoli di ratto e topo rientrano ad esempio in questa categoria, non potendo sopravvivere senza una madre che si prenda cura dei loro

bisogni. Difatti, alla nascita ratti e topi somigliano a feti, sono ciechi e riescono solo a contorcersi inutilmente, oltre al fatto che sono ancora poichilotermi (cioè a sangue freddo) poiché il loro cervello non è ancora sviluppato abbastanza per regolare la temperatura corporea (Carlson, 2001; Numan e Insel, 2003).

In circa il 90 % dei mammiferi, esiste un sistema di cure uniparentale, con cure nei confronti della prole eseguite solo da parte della madre (Kleiman e Malcolm, 1981; Numan e Insel, 2003). Nelle restanti specie di mammiferi, si trovano sia comportamenti di cure materne che paterne; al contrario della maggior parte dei mammiferi, le cure nei confronti della prole negli avicoli sono generalmente biparentali (Numan e Insel, 2003).

### **Comportamento di *grooming*, *licking* e *licking ano-genital* nelle diverse specie animali:**

Subito dopo il parto, la maggior parte delle femmine di mammifero lecca i propri cuccioli, fatta eccezione per i cammelli, i maiali e la famiglia delle foche. (Edwards e Broom, 1982; Broom e Freaser, 2007)

Nel maiale, spesso trascorrono molte ore tra la nascita del primo e quella dell'ultimo maialino della cucciolata, e la scrofa giace per tutto il tempo di durata del parto; il suo decubito laterale è una posizione ottimale per favorire il *nursing* da parte dei primi neonati, permettendo loro un facile accesso alla regione mammaria, ma tutto questo preclude il *grooming* in ognuna delle sue forme caratteristiche nelle altre specie animali (Broom e Fraser, 2007)

In altre specie, la neo mamma rimuove i fluidi amniotici che rivestono il neonato con un leccamento accurato del corpo del piccolo; il neonato, perde calore per conduzione mano a mano che lo spessore dei fluidi amniotici si riduce. Il *grooming* è diretto progressivamente dal dorso del neonato e dalla testa verso le parti più ventrali del corpo e agli arti. Queste attenzioni materne inoltre svegliano il neonato ed attirano la sua attenzione nei confronti della madre (Edwards e Broom, 1982; Broom e Freaser, 2007).

Il *grooming* rivolto sulla faccia del piccolo serve a rimuovere le membrane dalla stessa ed a prevenire il soffocamento (Trevathan, 1987).

In corso di *grooming* la madre inevitabilmente sparge considerevoli quantità della sua saliva sulla superficie corporea della prole; questa si asciuga velocemente, ma la saliva secca impartisce una identità ferormonale familiare al neonato. E' ormai chiaro che i ferormoni orali veicolati nella saliva sono importanti negli scambi sociali tra animali, ed in particolare tra il giovane e la madre nella situazione di riconoscimento. L'attività di *grooming* è sotto il controllo della prolattina, ormone che regola molti dei

comportamenti materni (Edwards e Broom, 1982; Broom e Fraser, 2007).

Nel caso in cui gli animali partoriscono più cuccioli, il comportamento materno di *grooming* può essere diretto maggiormente a quei cuccioli nati prima nella sequenza; questo comportamento risulta particolarmente evidente nelle pecore di razza Merino (Shillito *et al.*, 1983; Broom e Fraser, 2007).

Altri studi sui roditori hanno dimostrato come al momento del parto, anche la femmina di ratto cominci inizialmente a pulire e leccare l' area intorno alla sua vagina, per poi quando i piccoli iniziano ad emergere, agevolare le contrazioni uterine tirandoli fuori con i denti , quindi ingerisce la placenta ed il cordone ombelicale, elimina le membrane fetali che avvolgono come uno stretto involucro i piccoli, ed avvia l' attività di *grooming* sugli stessi (Carlson, 2001).

Rosenblatt e Lehrman (1963), riferiscono basandosi su studi fatti su ratti di laboratorio, che la femmina presenta in effetti una attività di *self licking* al momento del parto, rivolta alla regione genitale, in primo luogo all' orificio vaginale bagnato dai fluidi amniotici; L' attività di *self licking* si riduce poi drasticamente immediatamente dopo il parto, e la madre inizia a rivolgere l' attività di *grooming* e *licking* nei confronti dei suoi cuccioli.

Le femmine leccano i propri piccoli sia prima che durante l' allattamento; da alcuni studi sui ratti è emerso che la madre ruota i piccoli utilizzando le sue zampe anteriori, e inizia a leccarli a livello della regione addominale, in particolar modo nella zona anogenitale (*licking anogenital*) (Rosenblatt e Lehrman, 1963) .

Leccando questa area, viene stimolata l' urinazione e la defecazione da parte del cucciolo, i quali in un primo momento non sono in grado di assolvere a queste funzioni in maniera indipendente (Rosenblatt e Lehrman, 1963; Dunbar *et al.*,1981).

I cuccioli di ratto non sono difatti in grado di urinare e defecare in maniera indipendente per le prime 3 settimane di vita. L' assenza di *licking anogenital* da parte della madre comporterebbe la morte del cucciolo; il dodecyl propinato, un chemosegnale secreto dalle ghiandole prepuziali del neonato, così come tutte le altre secrezioni delle ghiandole prepuziali, gioca un ruolo molto importante nell' evocare il *licking anogenital* materno (MAGL) (Brohuet-Lahlou *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 2003).

Alleva e colleghi (1989), Cavigelli e colleghi (2010), riferiscono che femmine di topo apparentemente curano di più, e per periodo di tempo maggiore, cuccioli maschi piuttosto che cuccioli femmina; in particolare cucciolate di soli maschi ricevono una maggior cura nella costruzione del nido da parte della madre, più attività di *nursing* e *licking* rispetto a cucciolate miste o a cucciolate di sole femmine; questo “pregiudizio”

materno non sembra essere correlato a differenze di sviluppo dei cuccioli, dal momento in cui lo sviluppo corporeo e quello neurocomportamentale non sono influenzati dalla composizione di sesso della cucciolata.

Trevathan (1987), riferisce però che il *licking* non è diffuso tra tutti i mammiferi, e perciò non è assolutamente necessario per la sopravvivenza e lo sviluppo dei neonati.

### **Comportamento di *contact*, *nursing* e *suckling* nelle varie specie animali:**

Durante la prima settimana dopo il parto, la cagna resta per gran parte del tempo con i neonati, comportamento che aiuterà la prole a mantenere la propria temperatura corporea, essendo essi incapaci di farlo (Pal, 2005; Broom e Fraser, 2007).

Questo comportamento è presente anche nei roditori, in cui è necessario uno stretto contatto con la madre in quanto i piccoli alla nascita sono poichilotermici (cioè a sangue freddo), poiché il loro cervello non è ancora abbastanza sviluppato per regolare la temperatura corporea (Carlson, 2001).

Il *contact* viene definito come un contatto fisico di qualsiasi sorta tra la madre ed il cucciolo. Il contatto tra la madre ed il cucciolo occupa un posto centrale nelle attività materne; provvede difatti come già riferito in altri studi a fornire calore ai cuccioli che sono poichilotermici durante le prime settimane di vita (Jensen e Ederstrom, 1955; Rheingold, 1963).

Il *nursing* è una attività strettamente correlata al contatto; il contatto è difatti una condizione necessaria affinché l' allattamento avvenga. Il *nursing* viene definito come il momento in cui il cucciolo succhia effettivamente il latte, e non quando tiene solo in bocca il capezzolo. Il *suckling* è una attività complessa, ed è composta da un gran numero di componenti quali: la ricerca del capezzolo, mantenersi aggrappato ad esso, spingere con le zampe anteriori, tenere alzata la testa e posizionare gli arti posteriori in modo che il movimento della testa e degli arti anteriori continui.

Quando un cucciolo perde il capezzolo, la sua attività si incrementa notevolmente, spingendo e spintonando cercando di farsi posto tra gli altri cuccioli, fino a quando finalmente riesce ad avere nuovamente il capezzolo nella sua bocca ed a iniziare ad allattarsi (Reinghold, 1963).

Nowak (2006), riferisce che per un neonato, la localizzazione della regione mammaria e l' afferrare in bocca il capezzolo è di vitale importanza perché la madre è inizialmente l' unica risorsa di nutrimento e di fluidi.

Tutti i comportamenti di *nursing* e *suckling* sono diretti al trasferimento di latte dalla ghiandola mammaria della madre allo stomaco del neonato. La rimozione di latte dalla

ghiandola mammaria non è tuttavia un semplice prelievo meccanico, ma richiede anche un processo positivo di eiezione del latte nella madre. L' eiezione del latte avviene mediante un meccanismo riflesso, ed è un processo attivo ed inconscio. Il riflesso di eiezione del latte è comunemente definito "*Milk let- down*" (Broom e Fraser, 2007).

Il riflesso si manifesta attraverso un improvviso aumento della pressione del latte dopo stimolazione, che usualmente include quella delle terminazioni sensitive nervose nel capezzolo; l' intero corso del riflesso è un arco neuroendocrino che inizia con una stimolazione della mammella e passa per via periferica ed attraverso il sistema nervoso centrale, all' ipotalamo all' ipofisi posteriore, dove l' arco si continua con la produzione di ossitocina. L' ossitocina transita attraverso il circolo ematico fino alla mammella, dove si verifica un improvviso aumento nella pressione del latte; con lo stabilizzarsi di questa pressione, il prelievo passivo di latte attraverso la suzione dell' animale è facilitato. Sembra che l' aumento dell' ossitocina nel plasma sia associato ad una sensazione di benessere nella femmina di mammifero (Broom e Fraser, 2007).

Benché uno dei principali stimoli al *milk let down* sia legato ad una stimolazione fisica locale vigorosa della ghiandola mammaria, ci possono essere altri fattori, quali ad esempio odori, suoni, stimoli visivi, che contribuiscono a ciò; allo stesso modo, rumori forti o altri stimoli che disturbano l' animale, possono causare l' entrata in circolo di adrenalina (epinefrina) che agendo direttamente sulla ghiandola mammaria, inibisce l' eiezione di latte (Broom e Fraser, 2007; Korda e Brewinska, 1977).

Harrys (1958), riferisce che la stimolazione apportata dal comportamento di *suckling* da parte dei giovani mammiferi induce la secrezione da parte della ghiandola pituitaria dell' ormone responsabile del mantenimento della lattazione.

Un certo numero di esperimenti indicano che gli effetti della stimolazione indotta dal *suckling* causa la secrezione di ossitocina dalla ghiandola pituitaria posteriore che determina l' eiezione di latte dalla ghiandola mammaria e induce la produzione di prolattina dall' ipofisi anteriore, che stimola la produzione di latte nella ghiandola mammaria (Meites e Turner, 1948; Rosenblatt e Lehrman, 1963; Korda e Brewinska, 1977).

Se i giovani ratti vengono rimossi dalla loro madre diversi giorni dopo il parto, la secrezione di latte si arresta nell' arco di alcuni giorni ed i tubuli galattofori scompaiono poco dopo (Selye, 1934; Rosenblatt e Lehrman, 1963).

Nella scrofa, i suinetti possono iniziare l' attività di *nursing* avvicinandosi di propria volontà alla mammella della scrofa ed emettendo grugniti forti e profondi oppure, come è più comune durante la prima settimana del post-partum, la scrofa si corica, espone le

sue mammelle ed emette un tipico grugnito che attrae i suinetti alle sue mammelle (Algers e Jensen, 1985; Jensen *et al.*, 1991; Algers e Uvnaas-Moberg, 2007). Quando la lattazione è stabile, l'eiezione del latte ed il *suckling* avvengono ad intervalli regolari di 45-60 minuti quando tutti i suinetti della cucciolata succhiano allo stesso tempo (Barber *et al.*, 1955; Fraser, 1977).

Dopo che il latte è stato consumato, i suinetti riprendono a massaggiare a mammella della scrofa, una attività che può andare avanti per diversi minuti; più tempo è speso dalla prole a massaggiare la mammella, più latte viene prodotto dalla scrofa (Gill e Thomson, 1956; Algers e Uvnaas-Moberg, 2007).

Come regola generale, le posture durante l'allattamento sono tipicamente quelle di apertura, posizione eretta nelle specie monotocche (come bovino ed equino), posizione in decubito nelle specie poliotocche (come cane e gatto). La posizione adottata da una cagna o da una gatta è quella che consente un accesso confortevole ai capezzoli da parte di neonati relativamente immobili (Hartsock e Graves, 1976; Bromm e Fraser, 2007).

La scrofa invece si trova su di un fianco e nelle prime ore di vita dei piccoli, il colostro è continuamente a disposizione; il primo maialino nato può andare da un capezzolo ad un altro assumendo il colostro (Hartsock e Graves, 1976; Broom e Fraser, 2007).

In alcune specie animali, la madre al primo giorno di *nursing* può alimentare il neonato ad ogni ora del giorno e della notte; più avanti, l'attività di allattamento della prole da parte della madre può divenire meno frequente (Broom e Fraser, 2007).

Korhonen e colleghi (2000 a,b), riportano che il *nursing*, oltre ad alimentare il piccolo, serve anche per proteggerlo da certe malattie attraverso l'ingestione del colostro, che è prodotto nei primi giorni del post-partum e contiene anticorpi che compensano il sistema immunitario immaturo del neonato.

Rosenblatt e Lehrman (1963), e Schneirla (1961), riferiscono in base a studi effettuati sui ratti, che la relazione tra la madre ed il giovane per quanto concerne il *nursing-suckling* può essere divisa come nel gatto, in tre fasi di sviluppo: nella prima, definita fase neonatale, è la madre ad avvicinare i piccoli nel nido, li raccoglie, li lecca e li stimola all'attività mentre si struscia su di loro avvicinandogli la regione mammaria per favorire l'avvicinamento ai capezzoli da parte dei cuccioli. Con questa sorta di eccitamento il piccolo inizia a strusciare il muso nella pelliccia della madre finché non trova il capezzolo, e quindi vi si attacca. Questa fase dura fino al 12°-14° giorno dalla nascita. Durante la seconda fase il cucciolo inizia ad allontanarsi dal nido; durante queste escursioni, il piccolo incontra la madre ed in questa occasione può iniziare a nutrirsi, al di fuori del nido. Più i cuccioli migliorano la loro abilità locomotoria ed

aumenta la loro capacità di orientamento, più il momento dell' allattamento si sposta dal nido, al resto della gabbia. La durata della terza fase, ha una durata più variabile rispetto alle prime due: inizia intorno al 16° giorno e continua fino al momento dello svezzamento nella terza quarta settimana dopo il parto. Alla fine della terza settimana il *suckling* diminuisce nel momento in cui il cucciolo inizia a cibarsi con altre fonti di cibo; la disponibilità di cibo gioca dunque un ruolo determinante nella rapidità con cui lo svezzamento procede e si sviluppa un tipo di *feeling* indipendente.

### **Comportamento di *retrieving* nelle diverse specie:**

Sempre durante le prime settimana, la cagna è relativamente insistente sul fatto che i cuccioli restino nel luogo dove è avvenuto il parto; qualora un cucciolo tenti di uscire dalla cassa parto e si allontani da essa, la cagna lo richiamerà e lo riporterà al suo interno (Bleicher, 1962; Broom e Fraser, 2007).

Un simile atteggiamento è mostrato dalla femmina di roditore: questa raduna i suoi piccoli se si allontanano o vengono rimossi dal nido. Il modo con cui la femmina di roditore solleva i suoi piccoli è degno di nota; difatti, questa afferra con cautela l' animale dalla schiena, senza danneggiarlo con i denti estremamente affilati, quindi trasporta il piccolo nuovamente all' interno del nido con una caratteristica andatura impettita, tenendo la testa in alto (Carlson, 2001).

Rosenblatt e Lehrman (1963), riferiscono attraverso studi condotti sui ratti, che modificando l' eco habitat del nido, come ad esempio aumentando la temperatura o la luce, la femmina tende ad abbandonare il suo nido ed a trasferirsi in un nuovo nido, qualora le condizioni ecologiche del primo luogo la disturbino; i cuccioli vengono quindi trasferiti dal vecchio al nuovo nido dalla madre.

### **Comportamento di distacco nelle diverse specie:**

Rosenblatt e Schneirla (1961), riferiscono come in studi effettuati sui ratti, si sia evidenziato che nella terza fase di *nursing-suckling* i cuccioli seguono la madre mentre si muove nella gabbia, si infilano sotto di lei alla ricerca dei capezzoli e questa alcune volte rimanendo in stazione quadrupedale ferma li fa attaccare permettendogli di allattarsi solo per un breve periodo, altrimenti se ben predisposta può stendersi e permettergli un attacco al capezzolo ed una suzione di latte più prolungata. Al procedere dello svezzamento la madre evita sempre più frequentemente l' approccio dei cuccioli o allontanandosi da loro o abbassandosi completamente a terra in modo da occultare la regione mammaria; a questo punto il giovane rivolge le sue attenzioni verso altre fonti

di cibo nelle vicinanze.

Più lunghe e più intense sono le cure materne nei confronti della prole, migliori sono le possibilità di sopravvivenza dei cuccioli, e l'acquisizione di un loro corretto sviluppo fisiologico e psicologico non solo a breve termine ma anche a lungo termine, anche se ciò significa più tempo di risorse limitate per la madre (Falt e Wilsson, 1979; Poindron, 2005; Broom e Fraser, 2007); i benefici di rimanere con la propria madre dopo lo svezzamento sono stati dimostrati sperimentalmente. Cuccioli di cane che stanno con la madre dalla sesta alla decima settimana di vita, dimostrano un migliore sviluppo delle abilità motorie e sono più agili e si stressano meno se sottoposti ad isolamento (Falt e Wilsson, 1979; Broom e Fraser, 2007).

Nei roditori, il comportamento materno inizia a diminuire quando la prole diventa più attiva ed inizia a somigliare maggiormente ad un animale adulto; intorno al 16°-18° giorno dopo la nascita, la prole è già in grado di prendersi cura di sé stessa agevolmente e procurarsi il cibo necessario. A questo punto la madre smette di radunare i figli che lasciano il nido e finisce per allontanarsi da loro, se cercano di farsi allattare (Carlson, 2001).

#### **Comportamento di adozione di altri cuccioli nelle diverse specie animali:**

Qualche volta le gatte possono occuparsi dei gattini di un'altra madre o allevarli in comune (MacDonald, 1981).

Anche le femmine di topo o di ratto accettano tutti i piccoli che gli vengono offerti, se sono sufficientemente giovani (Carlson, 2001)

La femmina di ratto alleva qualsiasi piccolo si trovi all'interno del suo nido, manifestando un attaccamento generico, non selettivo, nei confronti dei neonati (Lèvy *et al.*, 1996; Marazziti *et al.*, 2008); difatti, sebbene siano capaci di discriminare i propri piccoli da quelli di un'altra madre, questa discriminazione non le inibisce nell'elargire cure parentali a cuccioli estranei (Beach e Jaynes, 1956b; Ostermeyer e Elwood, 1983; Rosenblatt e Lehrman, 1963; Numan e Insel, 2003).

Il comportamento materno nelle pecore è molto diverso da quello mostrato dai roditori, in quanto queste hanno un legame selettivo con i propri agnelli alla nascita e rifiutano qualsiasi tentativo di approccio da parte di agnelli estranei (Carter e Keverne, 2002; Numan e Insel, 2003).

#### **Comportamento materno in primati non umani:**

Studi effettuati su primati non umani, nello specifico scimmie *Rhesus*, hanno dimostrato

che il sistema affettivo materno può essere descritto più adeguatamente in termini di fasi sequenziali. Le fasi sono tre, e la delimitazione temporale di tutte e tre le fasi dipende da una notevole varietà di fattori quali l'ambiente fisico e sociale di vita dell'animale, la sua storia di vita, precedenti gravidanze ed esperienze con precedenti piccoli, fattori endocrinologici ecc. Le tre principali fasi materne sono: la prima, di attaccamento e protezione; la seconda, di ambivalenza; la terza, di separazione e rifiuto. Lo stadio di attaccamento e protezione è caratterizzato da risposte materne che sono quasi totalmente positive, che includono il *cradling* (cullare il cucciolo), *nursing*, *grooming*, frenare i tentativi di allontanarsi del piccolo e recuperarlo se esso si allontana (Harlow *et al.*, 1963).

Durante gli spostamenti ad esempio per la ricerca di cibo, la madre primate porta con sé il neonato sia sul suo ventre o sul suo dorso, a seconda dello stadio di sviluppo del piccolo (Numan e Insel, 2003).

Nel corso della fase di attaccamento e protezione la madre spesso tiene il cucciolo poggiato sul suo ventre o lo culla tra le sue braccia o gambe; la frequenza di questi due comportamenti, inizialmente alta, tende a ridursi progressivamente dopo il primo mese di vita e diventa relativamente infrequente a partire dal terzo mese. Indubbiamente in parte questo risultato è legato ad una maggiore mobilità del neonato, ma riflette anche una graduale cessazione della prima fase di cure materne. Il contatto con il capezzolo per alimentarsi è molto frequente durante la fase di attaccamento-protezione, mentre diviene relativamente infrequente a partire dal terzo mese di vita del cucciolo, pur continuando anche se sempre con minore frequenza per un considerevole periodo di tempo, anche in alcuni casi fino ai diciotto mesi post partum. Durante il terzo mese la madre può alcune volte richiamare il piccolo se questo si allontana, attraverso due particolari meccanismi di comunicazione, classificati come il "*silly grin response*" (sorriso sciocco) e "*affectional present*"; il primo meccanismo di comunicazione è stato notato meno rispetto al secondo, che è caratterizzato dall'assunzione di una postura che è a volte indistinguibile da quella presente nel modello sessuale femminile. La seconda fase, quella dell'ambivalenza, include sia risposte positive che negative da parte della madre nei confronti del cucciolo, che si mostrano più o meno in eguale frequenza. Tra le risposte negative si ha morsi, percosse, stringere e tirare il pelo e ostacolare i tentativi del piccolo di avere un contatto fisico con la madre. Anche la fase di ambivalenza si sviluppa gradatamente; ci sono diversi criteri che possono essere usati per valutare questa transizione, e tra questi l'atteggiamento minaccioso della femmina e la punizione materna. La punizione materna risulta inesistente durante i primi due mesi di

vita e si presenta raramente durante il terzo mese, mentre tende a subire un incremento durante il quarto-quinto mese dalla nascita, per poi subire un decremento dopo il quinto mese in relazione all' acquisizione della capacità da parte del neonato ad evitare la punizione. La terza fase, quella di separazione, come implica il nome, è caratterizzata dal termine graduale del contatto fisico tra la madre ed il cucciolo. In natura la madre può attivamente proteggere il piccolo in caso di emergenza anche dopo la separazione fisica da esso, il che suggerisce un ritardo temporale tra la quasi completa separazione fisica e la completa separazione psicologica dal piccolo. In natura, la separazione fisica tra la madre Rhesus ed il suo piccolo prende posto al momento in cui la madre partorisce un nuovo cucciolo, generalmente un anno dopo la nascita del precedente; nonostante ciò il piccolo allontanato viene osservato stare nelle vicinanze della madre per un periodo addizionale di tempo prima che la separazione psicologica diventi completa (Harlow *et al.*, 1963).

### **-1-7: Comportamento materno nel periodo post-partum nel cane:**

La cagna, durante le prime 12 ore di vita della prole raramente lascia soli i cuccioli, ed è estremamente protettiva nei loro confronti, specialmente nei riguardi di sconosciuti (Bleicher, 1962; Broom e Fraser, 2007).

Il fatto che il cucciolo abbia l' aspetto di una preda e lo stesso stato ormonale della madre, basterebbe ad innescare una risposta aggressiva, ma questo istinto aggressivo è inibito; essa può far maneggiare i suoi cuccioli da persone familiari, pur rimanendo nervosa fino a quando gli stessi non vengono rimessi al proprio posto (Jonson e Grace, 1987; Broom e Fraser, 2007).

I cuccioli che sono stati rimossi e maneggiati, sono leccati di più dalla cagna rispetto a quelli che non sono stati toccati (Mills *et al.*, 2005; Broom e Fraser, 2007).

Le cagne che allattano possono mostrare una ridotta risposta adrenocorticale allo stress di cani che non allattano; questa ridotta risposta allo stress è un' altra ragione per cui esse tendono a rimanere calme ed a provvedere ai propri piccoli in circostanze che altrimenti produrrebbero un comportamento stressato (Wilsson, 1984; Broom e Fraser, 2007).

Con la nascita dei cuccioli, si sviluppa immediatamente la vitale relazione tra la madre ed il neonato (Broom e Fraser, 2007).

Dunbar (1981), riferisce attraverso studi effettuati su cani di razza Beagle, che l' attrazione della madre verso stimoli olfattivi dei cuccioli appare uno dei fattori più

importanti nello stabilirsi e mantenersi del legame madre/figlio.

### **Comportamento di *grooming*, *licking* e *licking ano-genital* nel cane:**

Dunbar (1979), riferisce che le cagne trovano estremamente attraenti i fluidi amniotici e che questi giocano un ruolo vitale nel direzionare il comportamento della madre verso lo stabilirsi e svilupparsi del legame con la propria prole.

La neo mamma rimuove i fluidi amniotici che rivestono il neonato con un leccamento accurato del corpo del piccolo; il neonato, perde calore per conduzione mano a mano che lo spessore dei fluidi amniotici si riduce. Il *grooming* è diretto progressivamente dal dorso del neonato e dalla testa verso le parti più ventrali del corpo e agli arti. Queste attenzioni materne inoltre svegliano il neonato ed attirano la sua attenzione nei confronti della madre (Edwards e Broom, 1982; Broom e Freaser, 2007).

Le cagne leccano i propri cuccioli sia per pulirli, sia per stimolare le funzioni cardiovascolare e respiratoria (Casella e Taglietti, 1996; Nowak, 2006).

Il *licking* nella cagna è presente dal primo giorno di vita della prole, raggiunge il picco durante il 4-6° giorno, poi si riduce gradatamente fino a comparire non frequentemente a partire dal 42° giorno post partum. Il *licking* sembra avere diverse funzioni, conclusioni basate sui risultati che esso produce; in ordine di frequenza, le funzioni sono: stimolare l'urinazione e la defecazione del cucciolo, svegliarli e recuperare i piccoli.. Il *licking anogenital* è molto comune. Per regione anogenitale include l'area dell'ano, lo sbocco dell'uretra, la pancia e la zona posteriore del corpo del cucciolo. Nei primi giorni determina l'escrezione di urine e feci e la loro ingestione da parte della madre può non essere vista (la sua lingua è grande, i cuccioli sono piccoli ed anche le loro escreta probabilmente sono piccole) (Reinghold, 1963; Dunbar *et al.*, 1981).

Dunbar e colleghi (1981) e Ranson (1981), riferiscono che il *licking anogenital* nella cagna si riduce rapidamente a partire dal ventesimo giorno post-partum per poi scomparire intorno a trentesimo giorno dalla nascita dei piccoli. La riduzione dell'attività di *licking anogenital* da parte della madre coincide con l'acquisizione della capacità di urinare da soli dei cuccioli.

A partire dal settimo giorno, e sempre di più nei giorni successivi, le escreta possono essere qualche volta viste uscire dai cuccioli ed essere consumate dalla madre. Il *licking* diventa sempre più vigoroso; il corpo del cucciolo è spesso sollevato in aria mentre la madre lo lecca, ed i cuccioli spesso protestano, soprattutto se si stanno allattando. Oltre a leccare la regione perineale, la cagna a volte lecca anche le teste e le schiene dei piccoli per svegliarli; i piccoli diventano dunque molto attivi e si muovono verso di lei,

girano la loro testa verso la sua pancia si apprestano ad allattarsi. Più avanti, il *licking* sarà utilizzato dalla madre per richiamare i cuccioli. La regione perineale viene comunque leccata soprattutto nella prima settimana di vita maggiormente che la zona della testa e della schiena (Reinghold, 1963).

### **Comportamento di *contact, nursing e suckling* nel cane:**

Durante la prima settimana dopo il parto, la cagna resta per gran parte del tempo con i neonati, comportamento che aiuterà la prole a mantenere la propria temperatura corporea, essendo essi incapaci di farlo (Pal, 2005; Broom e Fraser, 2007).

Rheingold (1963), riferisce che il contatto tra la madre ed i cuccioli risulta massimo nei primi giorni di vita della prole; nelle prime due settimane, il contatto è ricercato soprattutto dalla madre, mentre quando i piccoli acquisiscono la vista e la capacità locomotoria, sono essi stessi che ricercano il contatto con la madre.

Dunbar e colleghi (1981), riferiscono attraverso studi condotti su cani di razza Beagle, che su 32 cuccioli testati, le madri hanno un primo contatto con i cuccioli di sesso maschile nel 59 % dei casi, mentre con quelli di sesso femminile nel 41% dei casi.

Dalla seconda settimana post-partum, la cagna resterà fuori dalla cassa parto per due o tre ore a volta, e dunque avremo una riduzione del *contact* con i suoi piccoli.. Quando si trova nella cassa parto, toeletta e allatta i suoi cuccioli frequentemente. Nella prima settimana i cuccioli spenderanno un massimo di 27.54 minuti per allattarsi (Pal, 2005; Broom e Fraser, 2007).

Sia la frequenza che la durata del *contact* tendono a ridursi drasticamente a partire dalla quarta settimana di vita dei piccoli (Pal, 2005).

Il *nursing* è una attività strettamente correlata al contatto; il contatto è difatti una condizione necessaria affinché l' allattamento avvenga. Il *nursing* viene definito come il momento in cui il cucciolo succhia effettivamente il latte, e non quando tiene solo in bocca il capezzolo. Il *suckling* è una attività complessa, ed è composta da un gran numero di componenti quali: la ricerca del capezzolo, mantenersi aggrappato ad esso, spingere con le zampe anteriori, tenere alzata la testa e posizionare gli arti posteriori in modo che il movimento della testa e degli arti anteriori continui.

Quando un cucciolo perde il capezzolo, la sua attività si incrementa notevolmente, spingendo e spintonando cercando di farsi posto tra gli altri cuccioli, fino a quando finalmente riesce ad avere nuovamente il capezzoli nella sua bocca ed a riniziare ad allattarsi (Reinghold, 1963).

Reinghold (1963), riferisce attraverso studi condotti su cagne ed i loro cuccioli, che il

*suckling* durante i primi tre giorni di vita dei piccoli, era osservato per quasi tutti e trenta i minuti di osservazione; la durata e la frequenza del *suckling* in qualche periodo di osservazione si riduceva con l' aumentare dell' età del cucciolo, fino a scomparire dal 45° giorno (7° settimana).

Pal (2005), riferisce invece che nei suoi studi il *nursing* è stato presente fino all' età di 11 settimane (75 giorni).

Rheighold (1963), riferisce che già al 20°giorno, i cuccioli di cane si dedicano al *nursing* vigorosamente per due, tre minuti a sessione; durante gli ultimi giorni di allattamento, i cuccioli succhiano il latte rapidamente per brevi periodi (il *suckling* per loro è divenuto più noioso). Il rumore di un cucciolo che sta poppando risveglia gli altri che stanno dormendo o meno, e tutti corrono ad unirsi al primo.

Come regola generale, le posture durante l' allattamento sono tipicamente quelle di apertura, posizione eretta nelle specie monotocche (come bovino ed equino), posizione in decubito nelle specie poliotocche (come cane e gatto). La posizione adottata da una cagna o da una gatta è quella che consente un accesso confortevole ai capezzoli da parte di neonati relativamente immobili (Hartsock e Graves, 1976; Bromm e Fraser, 2007).

Rheinghold (1963), riferisce che durante il *nursing* la cagna può in alcune occasioni modificare la propria postura in risposta alle spinte o al pianto dei cuccioli; essa può sdraiarsi, stendersi ulteriormente sul lato, o sollevare o estendere le zampe, permettendo ai cuccioli di trovare più facilmente i capezzoli.

### **Comportamento di *retrieving* nel cane:**

Sempre durante le prime settimana, la cagna è relativamente insistente sul fatto che i cuccioli restino nel luogo dove è avvenuto il parto; qualora un cucciolo tenti di uscire dalla cassa parto e si allontani da essa, la cagna lo richiamerà e lo riporterà al suo interno (Bleicher, 1962; Broom e Fraser, 2007).

### **Comportamento di distacco nel cane:**

Studi sul comportamento materno delle cagne hanno dimostrato che nel caso in cui alcuni neonati non si sviluppino in maniera corretta ed abbiamo quindi dei difetti quali ad esempio una bassa temperatura corporea, mancanza di movimenti, o per qualche altra ragione non nota, la cagna potrà arrivare a rifiutare quegli stessi cuccioli; questo rifiuto potrà essere espresso ignorando il cucciolo, tentando di spingerlo fuori dalla cassa parto, uccidendolo e seppellendolo al di fuori della stessa. Questo comportamento, che può sembrare sconvolgente, in natura è atto a minimizzare l' attrazione di predatori verso gli

altri giovani sani, e ad evitare l' eccessiva spesa di energie da parte della madre nei confronti di un cucciolo che probabilmente non ha chance di sopravvivenza a lungo termine (Fidler *et al.*, 1966; Broom e Fraser, 2007).

In condizioni normali, al momento in cui i cuccioli iniziano a crescere, la cagna inizia a spendere meno tempo con loro. In parte questo cambiamento graduale nel comportamento può essere causato sia da un cambiamento ormonale, sia da modifiche fisiche nella prole. Scambiando alcuni cuccioli della cagna con altri più giovani appartenenti ad un' altra cucciolata, si viene a verificare un grosso cambiamento nel suo comportamento: tutti gli indici di comportamento materno incrementano nuovamente, dal *nursing* al *grooming* dei cuccioli (Korda e Brewinska, 1977; Broom e Fraser, 2007).

Quando i cuccioli di cane hanno circa quattro settimane di vita, avvengono dei cambiamenti nell' interazione madre-cucciolo: la madre sta fuori dalla cassa parto sempre più spesso e per lungo tempo, ed è sempre meno probabile che risponda ai tentativi dei cuccioli di volersi allattare, tenendo frequentemente una stazione quadrupedale; essa può divenire anche più aggressiva nei confronti dei giovani, utilizzando un morso inibito, per ridurre i loro tentativi di poppare. Le sue azioni sono solitamente seguite da risposta di sottomissione da parte dei cuccioli, alla quale la madre risponde leccandoli (Korda e Brewinska, 1977; Broom e Fraser, 2007). I cuccioli possono comunque continuare ad allattarsi fino alle 10, 11 settimane, dedicando al *nursing* un tempo minimo di 2.22 minuti a sessione (Pal, 2005; Broom e Fraser, 2007).

Durante il passaggio dall' alimentazione liquida a quella solida, i canidi possiedono evoluti rituali di alimentazione con la madre che rigurgita la carne parzialmente digerita per alimentare il giovane animale in prossimità del periodo di svezzamento (Ewer, 1973; Kleiman e Eisenberg, 1973; Martins, 1949; Scott, 1950; Rheingold, 1963; Malm, 1995; Scott e Marston, 1950). Questo comportamento serve probabilmente ad introdurre il cucciolo ad una alimentazione solida e come supplemento della loro dieta in attesa che essi diventino capaci di alimentarsi da soli (Pal, 2005).

### **Comportamento di adozione di altri cuccioli nel cane:**

L' adozione di cuccioli non è di norma un problema per una cagna con una sua cucciolata, anche se i cuccioli che devono essere adottati sono di poche settimane più grandi dei suoi; poiché tutti i lupi all' interno di un branco partecipano alle cure dei cuccioli, e sono tutti geneticamente parte della stessa famiglia, non ci sarebbe un vantaggio per una femmina di lupo nel riconoscere solo ed esclusivamente i propri cuccioli. Questo comportamento dei lupi viene riprodotto in parte dai nostri cani

moderni (Hart, 1980; Broom e Fraser, 2007)

Femmine imparentate di lupo possono stare a guardare e giocare con i giovani mentre la madre è a caccia; in caso di false gravidanze, queste femmine sono anche in grado di produrre latte e quindi possono anche allattare i cuccioli. Questo comportamento di partecipazione nella gestione dei piccoli è meno frequente nel cane, ma la ragione può essere in funzione di come sono detenuti i cani moderni (una mancanza di opportunità), piuttosto che ad una mancanza di comportamento (Broom e Fraser, 2007).

### **-1-8: Differenze del comportamento materno in femmine primipare e pluripare:**

Le differenze di cure materne tra madri primipare e pluripare sono state studiate in passato in diverse specie di mammiferi, come nei roditori e primati non umani, ma non nella specie canina. Molte poche ricerche sono state fatte in passato al fine di descrivere e valutare le cure materne nei cani domestici nelle prime settimane del periodo post-partum (Martins, 1949; Scott, 1950; Scott e Marston, 1950; James, 1952; Welker, 1959; Rheingold, 1963; Kleiman e Malcolm, 1981), e gli studi condotti fino ad ora sono stati eseguiti in condizioni di laboratorio o di canile con poche eccezioni (Pal, 2005; Czerwinski *et al.*, 2014) e senza la messa a fuoco dell'esperienza riproduttiva (numero dei parti) dei soggetti.

Diversi studi hanno confrontato il comportamento di primati non umani femmine primipare e pluripare; in generale, da queste ricerche è emerso che madri pluripare tendono ad essere meno protettive ed a mostrare un maggior tasso di rigetto nei confronti del proprio cucciolo, rispetto a madri primipare (Mitchell e Stevens, 1968; Mitchell e Brendt, 1970; Kuyk *et al.*, 1977; Hooley e Simpson, 1981; Seay, 1986; Fairbanks, 1988; Tanaka, 1989; Schino *et al.*, 1995).

Purtroppo, nessuno di questi studi ha misurato la correlazione tra l'esperienza materna ed il comportamento materno rimuovendo l'effetto dell'età materna; pertanto non possiamo escludere che, in alcuni o tutti gli studi di cui sopra, gli effetti attribuiti all'esperienza materna fossero in realtà causati dall'età della femmina. L'età materna può dunque essere una variabile importante che influenza la qualità della relazione madre-cucciolo (Schino *et al.*, 1995).

Wiesner e Sheard (1933), riportano che, confrontando il comportamento di recupero dei propri cuccioli in femmine di ratto primipare e pluripare, entrambi i gruppi hanno mostrato livelli pressochè identici di competenza per quanto riguarda tale attività.

Allo stesso modo, Beach e Jaynes (1956) e Moltz e Robbins (1965), riferiscono che le femmine di ratto e criceto primipare e pluripare sono altrettanto abili nel comportamento materno nei confronti della prole. Ad esempio, studi hanno dimostrato che la femmina inesperta recupera il suo cucciolo con la stessa alacrità, ed anzi, con la stessa competenza, di una madre con maggiore esperienza. Anche l'attività di *nursing* e di costruzione del nido non differivano tra le due categorie di femmine, il che suggeriva che la quantità complessiva di assistenza osservata in un criceto femmina nei confronti della prole può essere indipendente dall'esperienza. Una maggiore attività di *licking* è stato osservato in madri primipare, probabilmente in risposta alla novità del giovane.

Numan e Insel (2004), riferiscono invece che le femmine primipare differiscono nel loro comportamento materno rispetto alle pluripare, quindi è possibile che le iniziali esperienze di allevamento della prole abbiano un impatto sulle future competenze materne e sull'efficienza riproduttiva, in quanto le madri con l'esperienza hanno appreso le migliori tecniche di gestione dei cuccioli nelle varie situazioni stressanti vissute nel periodo post-parto e durante l'allattamento e lo svezzamento (Numan e Insel, 2003).

Attraverso successivi studi condotti sul comportamento di recupero dei piccoli da parte della madre, un comportamento in cui la pratica può svolgere un ruolo, sono state invece osservate differenze tra madri primipare e pluripare (Swanson e Campbell, 1979). Nei criceti, al contrario dei topi e dei ratti, l'esperienza riproduttiva non influenza la quantità e la qualità delle cure materne offerte (Campbell e Swanson, 1979).

Carlier e Noirot (1965), riferiscono attraverso studi condotti su ratti, che una esperienza preliminare con dei piccoli altera il comportamento materno nei confronti di cucciolate successive. Hanno difatti riscontrato che il comportamento di recupero delle femmine pluripare è migliore di quello di femmine primipare; difatti, le madri pluripare recuperavano più rapidamente e facevano cadere meno cuccioli durante il trasporto rispetto alle primipare, precisando però il fatto che le femmine pluripare erano più adulte e probabilmente anche fisicamente più forti rispetto alle primipare.

Gli effetti delle gravidanze passate sul comportamento parentale e sullo sviluppo della cucciolata sono stati studiati confrontando madri primipare e pluripare di Arvicole di Prateria (*Microtus Ochrogaster*). Da questi studi è emerso che madri pluripare spendono meno tempo in attività al di fuori del nido e trascorrono più tempo nel dedicarsi alle cure parentali della prole rispetto a madri primipare. Questa maggiore partecipazione nella cura della prole porta ad un più rapido sviluppo dei cuccioli, ad un tasso di sopravvivenza più elevato e a dimensioni finali maggiori dei cuccioli, che risultano più

grandi rispetto a quelli di madri primipare; la precedente esperienza associata al numero di gravidanze può portare dunque all' aumento delle cure parentali da parte delle madri (Wang e Novak, 1994).

Madri pluripare che hanno già sperimentato l' allattamento mostrano inoltre più alti livelli di prolattina rispetto a madri primipare; la prolattina è conosciuta per svolgere un ruolo importante nel facilitare il comportamento materno (Stern e Siegel, 1978; Wang e Novak, 1994).

Femmine di ratto pluripare, hanno migliore capacità di *recognition e placement* nei confronti della propria prole rispetto a madri primipare o a femmine nullipare, il che indica una capacità di memoria migliore in relazione all' esperienza riproduttiva precedente (Paris e Frye, 2008; Macbeth e Luine, 2010).

A seguito dell' esposizione ai neonati al momento del parto, una femmina di topo primipara manifesterà velocemente il comportamento materno quando esposta ad una nuova cucciolata in un periodo successivo (Bridges, 1975,1977; Orpen e Fleming, 1987; Scanlan *et al.*, 2006). Questo mantenimento di comportamento materno è legato ad una "memoria materna". Oltre alla femmina che ha partorito, anche femmine di ratto nullipare possono essere indotte a mostrare un comportamento materno dopo 5-7 giorni di esposizione a cuccioli adottivi (Rosenblatt, 1967; Scanlan *et al.*, 2006); una volta che questo comportamento è stabilito, le femmine possono manifestare il mantenimento di questo comportamento, o memoria materna, quando riesposte ad altri cuccioli (Cohen e Bridges, 1981; Bridges e Scanlan, 2005; Scanlan *et al.*, 2006).

Come è stato dimostrato nei roditori, questo avviene perché gli ormoni prodotti durante la gravidanza e nel periodo post-partum inducono dei cambiamenti morfologici nelle aree cerebrali associate allo sviluppo delle funzioni cognitive come l' ippocampo e l' area preottica mediale e nel bulbo olfattivo con aumento delle dimensioni cellulari e ampliamento dell' estensione delle ramificazioni dendritiche (Shen *et al.*, 2013).

Recenti scoperte hanno dimostrato però che la memoria materna svanisce nel tempo nelle femmine di ratto nullipare; il tempo con cui il comportamento materno veniva "perso", sembra correlato all' intervallo di tempo tra l' esperienza materna iniziale e il periodo in cui le femmine venivano ritestate per valutare la presenza/assenza di tale comportamento (Bridges e Scanlan, 2005; Scanlan *et al.*, 2006). Da questi studi è stato evidenziato che la memoria materna in femmine nullipare, acquisita in soli due giorni di contatto con i cuccioli, scompare dopo circa 80 giorni dall' induzione iniziale del comportamento, se queste vengono tenute isolate da neonati; non sorprendentemente le madri primipare esibiscono un mantenimento del comportamento materno per un

periodo più prolungato rispetto che le femmine nullipare (Scanlan *et al.*, 2006).

Studi condotti su femmine di ratto hanno dimostrato attraverso l'osservazione del comportamento materno di madri primipare e pluripare, che queste ultime sono responsive ai segnali di stress solo per i primi due giorni dello studio, mentre madri primipare sono costantemente sensibili a questi segnali. Lo studio prevedeva la reintroduzione nel nido di cuccioli stressati e la valutazione del comportamento dei due diversi tipi di madri nei loro confronti; le madri primipare hanno risposto al ritorno di cuccioli stressati nel nido aumentando il tempo trascorso in posizione di allattamento, mentre le madri pluripare non hanno modificato il loro comportamento nei confronti della prole. Madri pluripare secondo questi studi inoltre producono una prole meno timorosa rispetto alle madri primipare (Wright e Bell, 1978).

Macbeth e Luine (2010), riferiscono che l'attivazione dell'HPA (asse ipotalamo-ipofisi-surrene) può essere ulteriormente attenuato con gravidanze multiple, come nelle madri pluripare che allattano le quali hanno una risposta ridotta del cortisolo a fattori di stress sociali ed emotivi. Allo stesso tempo, femmine di ratto primipare hanno una maggiore resistenza allo stress ed una minore ansia rispetto a ratti femmine che non hanno mai sperimentato la maternità (vergini o nullipare).

Rima e colleghi (2009) e Kinsley e colleghi (2009), riportano risultati contraddittori su studi eseguiti su ratti di laboratorio femmine primipare, pluripare e nullipare; difatti, madri primipare presentavano una minore espressione di mRNA della subunità del recettore GABA sia all'interno dell'area preottica mediale che in quella dell'amigdala mediale rispetto alle femmine nullipare, indicando potenzialmente una maggiore presenza di ansia nelle femmine primipare; al contrario però, le madri primipare presentavano livelli di prolattina e recettori per la prolattina significativamente più alti nella zona preottica mediale e nel nucleo arcuato, indicando potenzialmente una ridotta paura e ansia rispetto alle femmine nullipare. Inoltre, altri risultati contraddittori sono stati evidenziati nella valutazione dei livelli di glucocorticoidi riscontrati nelle femmine pluripare, che nello studio condotto erano più anziane rispetto alle madri primipare ed alle femmine nullipare facenti parte della medesima ricerca. Difatti, nelle femmine di ratto anziane il risultato aspettato sarebbe stato quello di una aumentata secrezione di glucocorticoidi in risposta allo stress, quindi livelli relativamente elevati di corticosterone in relazione a progressivi cambiamenti per l'età nella risposta ipotalamo-ipofisi-surrene; in realtà invece, le madri pluripare hanno mostrato avere i più bassi livelli di corticosterone rispetto alle altre due categorie di femmine oggetto dello studio, il che indica che altri fattori sono implicati nel determinare una ridotta ipersecrezione di

corticosterone, ipersecrezione che sarebbe dovuta essere presente in relazione all' invecchiamento dell' animale.

Pawluski (2009), riferisce attraverso studi effettuati su ratti che i livelli di corticosterone libero risulta elevato sia nelle madri primipare che pluripare, ma che le prime mostrano un livello molto più elevato rispetto alle seconde durante l' allattamento.

Kinsley,

Macbeth e colleghi, (In Press) e Kinsley (2008), riportano che esistono alcune differenze essenziali tra il cervello di madri pluripare e quello di madri nullipare che derivano dalle esperienze della gravidanza, dal periodo post-partum e dalle interazioni con i cuccioli, che sono descritte come positive ed arricchenti; il loro lavoro descrive la neuroplasticità intrinseca caratteristica della riproduzione e alcune mediazioni neurochimiche implicate del cervello materno, compresi i segnali derivanti dai cuccioli stessi, che sottendono a modifiche nel comportamento della madre. La maternità, che di per sé è ritenuto un episodio della vita fisicamente stressante, in realtà possiede in sé elementi di arricchimento per la vita della femmina, come una riduzione della paura e delle risposte di ansia, miglioramenti circa l' apprendimento e la memoria, miglioramento delle cure dei piccoli e una più efficace acquisizione di cibo e risorse, tutti adattamenti di cui può beneficiare la prole: per realizzare tali prodezze è necessario un cervello molto diverso, un "cervello materno".

L' esperienza riproduttiva ha effetti significativi sul cervello, comportamento e profili ormonali delle madri. Studi recenti hanno dimostrato che le madri di ratto primipare mostrano una ridotta arborizzazione dendritica nell' ippocampo e migliori prestazioni nella memoria spaziale dipendente dall' ippocampo al momento dello svezzamento rispetto alle femmine nullipare, ma in misura minore rispetto alle madri pluripare (Pawluski *et al.*, 2009); questo ha fatto sì che esse acquisissero una maggiore capacità di muoversi nell' ambiente e ad adattarsi alle sue variazioni grazie all' incremento della loro neuroplasticità (Kinsley, 2008). Tutto questo persiste nel tempo e facilita le performance riproduttive (Macbeth, 2010).

### **-1-9: Comportamento materno in relazione alle dimensioni della cucciolata:**

In molte specie di mammifero come roditori, conigli, lepri, la dimensione della cucciolata determina delle variazioni nella crescita dei piccoli; difatti, i nascituri di una cucciolata numerosa pesano di meno e crescono meno velocemente già prima della

nascita rispetto a quelli di una cucciolata meno numerosa (Heggenes *et al.*, 1961; Galler e Turkewitz, 1975; Nagy *et al.*, 1977; Chahoud e Paumgartten, 2009) a causa della minore disponibilità di latte e di cure materne che la madre può offrire a ciascun individuo quando la prole è numerosa (Guerra e De Nunes, 2001; Rodel *et al.*, 2008).

Russel (1980), riferisce che la dimensione della cucciolata influenza infatti i livelli di ossitocina materni e quindi i livelli di produzione di latte e la sua emissione.

Priestnal (1972), riporta che le madri di figliate numerose, passano meno tempo nel nido perché sono alla continua ricerca di cibo e si possono dedicare meno all'attività di *licking* e *grooming* di ogni cucciolo, mentre le femmine che si prendono cura di cucciolate più piccole, trascorrono più tempo all'interno del nido con i cuccioli in interazione corporea con essi (Guerra e de O Nunes, 2001; Grotta e Ader, 1969; Draper, 1968). Queste madri in relazione al loro maggiore stato di affaticamento, risultano essere meno "materne" nei confronti dei propri cuccioli (Seitz, 1954, 1958), più aggressive, più attive fuori dal nido e meno attente al recupero dei piccoli; tutto questo può dimostrare che l'allevamento di cucciolate numerose può influenzare il comportamento materno (Maestrepieri e Alleva, 1990).

Secondo Draper (1968) e Grotta e Ader (1969), il contatto madre cucciolo è minore quando la prole è numerosa forse anche a causa del disturbo causato alla madre dalle continue richieste di latte e dall'aumentata temperatura legata alla presenza di numerosi piccoli.

Altri studi indicano che in una vasta gamma di dimensioni della cucciolata, non ci sono correlazioni significative tra la dimensione della cucciolata e il comportamento di *arched-back nursing* o di *licking-grooming*, mentre nei Mongolian gerbilli, le madri di grandi cucciolate annusano e leccano i loro cuccioli più spesso (Guerra e de O Nunes, 2001).

Tuttavia, se il tempo complessivo speso nel comportamento materno attivo (ad esempio *licking-grooming*) è stabile indipendentemente dalle dimensioni della cucciolata, questo sta ad indicare che la quantità di cure materne che ogni cucciolo riceve individualmente sarà diverso in funzione della dimensione della cucciolata (essendo le cucciolate più piccole quelle che hanno ricevuto di più) (Dimitantos *et al.*, 2007).

Madri di cucciolate più grandi presentano anche attività locomotoria superiore e la quantità totale di comportamento di *retrieving* dei cuccioli ovviamente aumenta in funzione alla dimensione della cucciolata (Guerra e de O Nunes, 2001).

Madri pluripare attuano cure parentali qualitativamente migliori rispetto alle primipare ma della correlazione di questo aspetto con la dimensione della cucciolata sappiamo ben

poco (Rodel *et al.*, 2010).

## **-1-10: Epigenetica del comportamento materno:**

Waddington (1957), ha coniato il termine epigenetica per descrivere una soluzione concettuale di un enigma, un puzzle che si pone come una considerazione fondamentale nella biologia dello sviluppo. Tutte le diverse cellule del nostro corpo hanno esattamente lo stesso genoma, cioè, esattamente la stessa sequenza nucleotidica di DNA, con solo poche eccezioni nel sistema riproduttivo e immunitario; in questo modo ad esempio, le cellule del fegato hanno esattamente lo stesso DNA dei neuroni (Waddington, 1957; Sweatt, 2009; Franklin e Mansuy, 2010).

Waddington coniò il termine “epigenetica” per descrivere le interazioni gene-ambiente che alla fine portano ad un particolare fenotipo.

Tuttavia, un ulteriore aspetto del controllo epigenetico dell'espressione genica sta emergendo da recenti studi sui meccanismi molecolari epigenetici nel sistema nervoso. Così, si stanno accumulando prove convincenti che meccanismi epigenetici non contribuiscono solo al collegamento fenotipico a livello cellulare. Al contrario, nel sistema nervoso con la sua abbondanza di cellule, non-divisibili e immodificabili, i meccanismi epigenetici giocano un ruolo nella regolazione acuta dell'espressione genica in risposta a segnali ambientali e all'esperienza (Feng *et al.*, 2007; Razin, 1998; Sweatt, 2009; Curley *et al.*, 2011).

I meccanismi che sono in grado di alterare l'espressione genica senza alterare la sequenza genica sono chiamati epigenetica, nel senso di al di sopra della genetica (Jablonka e Lamb, 2002; Gudsruk e Champagne, 2011). I meccanismi epigenetici sono tipicamente cambiamenti molecolari allo stesso DNA o alle proteine intorno a cui il DNA è strettamente avvolto (Gudsruk e Champagne, 2011).

Ci sono due meccanismi epigenetici molecolari di base che sono ampiamente studiati attualmente: la regolazione della struttura della cromatina attraverso modifiche post-translazionali degli istoni, e la metilazione del DNA (Feng *et al.*, 2007; Razin, 1998; Sweatt, 2009; Curley *et al.*, 2011).

Il primo meccanismo principale con il quale il genoma può essere epigeneticamente marcato è la metilazione del DNA. La metilazione del DNA è una modifica chimica diretta di una catena laterale della citosina che aggiunge un gruppo -CH<sub>3</sub> attraverso un legame covalente. La metilazione del DNA è catalizzata da una classe di enzimi noti come DNA metiltransferasi (DNMTs) (Okano *et al.*, 1998; Sweatt, 2009). I DNMTs

trasferiscono gruppi metilici residui di citosina in un tratto continuo di DNA, in particolare nella posizione 5 dell'anello pirimidinico (Santi *et al.*, 1983; Sweatt, 2009). Non tutte le citosine possono essere metilate; solitamente le citosine devono essere seguite immediatamente da una guanina per essere metilate (Bird, 1978; Cedar *et al.*, 1979; Sweatt, 2009). Queste sequenze "CpG" dinucleotidiche sono molto sottorappresentate nel genoma rispetto a quello che ci si aspetterebbe; Tuttavia circa il 70% dei dinucleotidi CpG presenti sono metilati (Cooper e Krawczak, 1989; Sweatt, 2009).

Ma quali sono le conseguenze funzionali della metilazione del DNA? Nella maggior parte dei casi che sono stati studiati finora, la metilazione del DNA è associata con la soppressione della trascrizione genica, e in molti casi un'estesa metilazione del DNA innesca un completo silenziamento del gene associato. I processi molecolari precisi attraverso cui questo avviene sono complessi e ancora in fase di studio. In sostanza, la metilazione di citosine a dinucleotidi CpG recluta proteine leganti metil-DNA in siti specifici nel genoma (Sweatt, 2009).

Recenti scoperte hanno suggerito una nuova e interessante idea; che le modifiche della cromatina in particolare (Putignano *et al.*, 2007; Medini e Pizzorusso, 2008; Champagne, 2011), e dei meccanismi molecolari epigenetici in generale, potrebbero essere coinvolte nello *switching-off* della plasticità corticale del sistema nervoso centrale come meccanismo di chiusura di un periodo critico dello sviluppo (Putignano *et al.*, 2007; Medini e Pizzorusso, 2008). In questi esperimenti di laboratorio un periodo critico dello sviluppo è definito come un lasso di tempo durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale quando i giovani animali hanno una predisposizione a cambiamenti plastici, sia anatomici che funzionali (Putignano *et al.*, 2007; Medini e Pizzorusso, 2008).

Esperienze durante i periodi sensibili dello sviluppo, come quello embrionale, neonatale, e l'adolescenza possono agire insieme o in modo indipendente per modificare il genoma senza alterare la struttura del DNA. Questi effetti, chiamati epigenetici, possono portare ad una eredità epigenetica, così che l'ambiente può influenzare il trascrittoma degli individui durante il loro sviluppo e potenzialmente quello dei loro discendenti (Crews, 2008).

Una "chiusura" del periodo critico comporta l'interruzione, almeno in larga misura, di questa capacità di cambiamenti anatomici e funzionali guidati dall'esperienza (Putignano *et al.*, 2007; Medini e Pizzorusso, 2008).

Le teorie epigenetiche di sviluppo forniscono un quadro di riferimento per l'interpretazione dei ruoli di interazione dell'esperienza e della genetica sia

nell'ontogenesi che nella filogenesi e la trasmissione di caratteristiche non genetiche attraverso le generazioni (eredità epigenetica). Nei mammiferi, in particolare, differenze nel comportamento materno possono contribuire in modo sostanziale alla ereditarietà epigenetica (Bjorklund, 2006).

L'epigenesi può essere definita come "un processo emergente, attraverso il quale la struttura di un organismo e la sua funzione cambiano da stati relativamente indifferenziati a forme sempre più specializzate e differenziate durante tutta l'ontogenesi" (Miller, 1998). Da questo punto di vista, non è possibile dividere gli effetti biologici da quelli ambientali sugli organismi, poiché i geni, gli ormoni, i neuroni, le cure materne, e l'ambiente fisico e sociale contribuiscono in modo dinamico nella creazione di un comportamento. Lo sviluppo si verifica come risultato dell'interazione continua e bidirezionale tra diversi componenti dei sistemi di sviluppo, tra cui, ma non solo attività genetica, la maturazione strutturale, attività che proviene dalle strutture (o funzione), e l'ambiente, inteso in senso lato. I geni non sono dati privilegio, ma sono visti come parte integrante di un sistema di sviluppo, senza maggiore importanza rispetto ad altri aspetti del sistema (Bjorklund, 2006).

Suomi (2004), ha suggerito che possa esistere una trasmissione trans-generazionale di alcune caratteristiche biocomportamentali. Ricerche precedenti su primati non umani avevano dimostrato che il comportamento di attaccamento materno si trasmette di generazione in generazione, anche quando le scimmie non vengono allevate dalle madri biologiche (Suomi, 1999; Suomi, 2004).

Studi condotti da Franklin e Mansuy (2010), furono diretti a valutare l'evidenza che fattori ambientali avversi potessero influenzare non solo gli individui direttamente esposti a questi fattori, ma anche la loro prole. Poiché l'epigenoma è sensibile alle influenze ambientali e, in alcuni casi, può, in parte, essere trasmesso attraverso le generazioni, fornisce un potenziale meccanismo per la trasmissione transgenerazionale dell'impatto dei fattori ambientali. Uno dei fattori ambientali esaminati include l'esposizione a diverse cure post-natali.

La variazione della qualità e/o quantità delle interazioni madre-prole è stata dimostrata in diverse specie, compreso l'uomo (Hane e Fox, 2006; Gudsruk e Champagne, 2011) ed è sempre più esplorato come un percorso attraverso il quale emergono le differenze individuali nella fisiologia e nel comportamento. Lo stress materno e la depressione sono predittori significativi della qualità delle interazioni postnatali madre-figlio (Field, 2002,2010; Gudsruk e Champagne, 2011), in particolare, il livello di stimolazione tattile (carezze) che le madri forniscono alla prole è predetto dall'umore materno (ad

esempio, le madri depresse forniscono una stimolazione tattile minore) (Gudsnuk e Champagne, 2011).

L'influenza della qualità dell'ambiente sul primo periodo di vita è stata ricercata approfonditamente. E' ormai ampiamente riconosciuto che l'abuso precoce o un trauma hanno grossi effetti sugli individui nel corso della loro vita adulta. La persistenza dei disturbi che possono essere sorti da maltrattamenti durante l'infanzia ha spinto i ricercatori a indagare se la metilazione del DNA giocasse un ruolo. Nel ratto, la quantità di cure materne fornite durante lo sviluppo iniziale ha dimostrato di influenzare il pattern di metilazione del DNA nel cervello del cucciolo da adulto. Femmine di ratto sono state selezionate in base alla loro capacità di nutrimento e poste in due gruppi di studio, uno con alto ABN-LG (*arched-back nursing* e *licking/grooming*), e uno con basso ABN-LG. Studi su cuccioli allevati da madri con alto ABN-LG hanno mostrato che questi cuccioli, da adulti, hanno una maggiore espressione dei recettore dei glucocorticoidi (GR) nell'ippocampo e una maggiore sensibilità al feed-back dei glucocorticoidi rispetto ai cuccioli di madri con basso ABN-LG (Weaver *et al.*, 2004; Franklin e Mansuy, 2010). Questi effetti sono stati associati con una più bassa metilazione del DNA nella regione promotrice di GR (Weaver *et al.*, 2004). In seguito alla modifica della metilazione, un ambiente postnatale povero è stato recentemente dimostrato provocare la trasmissione transgenerazionale di anomalie di metilazione nel cervello di ratto.

L'infusione di triochostatine A (TSA), un composto organico che promuove l'acetilazione degli istoni e riduce la metilazione, nella prole adulta che ha ricevuto un basso livello di LG durante l'infanzia, induce una diminuzione della metilazione del GR ippocampale, un incremento del GR mRNA e una ridotta risposta allo stress (Weaver *et al.*, 2004; Curley *et al.*, 2011). Invece, trattando la prole che ha un alto livello di LG durante l'infanzia per due settimane con metionina, presenta una maggiore disponibilità dei gruppi metilici, maggiore metilazione del GR ippocampale, minore espressione del GR e un aumento della risposta comportamentale allo stress (Weaver *et al.*, 2005; Curley *et al.*, 2011). La somministrazione centrale di zebularina, un composto che riduce la metilazione del DNA, induce invece un aumento dell'espressione di BDNF nei ratti maltrattati così che i livelli di BDNF sono equivalenti nella prole abusata e non abusata (Roth *et al.*, 2009; Curley *et al.*, 2011).

Dei cuccioli che ricevono cure materne quotidianamente abusive (ad esempio: pestare, lasciar cadere, trascinare, ed elusione attiva) da madri non biologiche durante il periodo dopo la nascita (PND) uno su sette ha mostrato una ridotta espressione di BDNF e una

maggior metilazione del gene BDNF nella corteccia prefrontale quando adulto (Roth *et al.*, 2009; Franklin e Mansuy, 2010).

I risultati sono particolarmente interessanti perché, nell'uomo, l'aumento della metilazione del gene BDNF nella corteccia frontale è associato con le principali psicosi come la schizofrenia e il disturbo bipolare (Mill *et al.*, 2008). Pertanto, questo studio nel ratto suggerisce che il maltrattamento durante i primi periodi di sviluppo può non solo predisporre gli individui a psicosi maggiori, ma viene anche trasmesso alla loro prole attraverso la trasmissione di pattern anormali di metilazione attraverso le generazioni. È importante sottolineare che maltrattamenti durante lo sviluppo iniziale inducono una scarsità delle cure materne nella prole femminile quando esse stesse avranno cuccioli (Roth *et al.*, 2009; Franklin e Mansuy, 2010). In tal modo, le alterazioni nella metilazione del BDNF nel cervello della prole di madri maltrattate possono derivare da trasmissione di metilazione attraverso i gameti o cambiamenti di metilazione suscitati dalla trasmissione di scarsa cura materna attraverso le generazioni. È interessante notare che il *cross-fostering* non ha invertito completamente le alterazioni dei livelli di metilazione, il che suggerisce che l'esperienza post-natale non è l'unico fattore che contribuisce a questa trasmissione (Roth *et al.*, 2009; Franklin e Mansuy, 2010).

L'ambiente materno di cui fa esperienza un organismo in via di sviluppo può svolgere dunque un ruolo fondamentale nel plasmare i pattern comportamentali nell'individuo adulto. Inoltre, ci può essere la trasmissione di questi effetti alle generazioni successive che si manifestano attraverso alterazioni nel comportamento riproduttivo della prole. Così le cure materne possono essere trasmesse dalla madre alle figlie e alle nipoti. I meccanismi che mediano questa trasmissione sono stati esplorati nei roditori e coinvolgono alterazioni epigenetiche di geni dei recettori steroidei che producono cambiamenti a lungo termine nell'espressione genica e nel comportamento.

Sia negli esseri umani che nei primati ci sono prove di una trasmissione matrilineare del comportamento materno (Champagne, 2008).

Nel caso di abusi sui minori, vi è una notevole continuità trans-generazionale negli esseri umani. Attualmente si stima che fino al 70% dei genitori violenti sono stati essi stessi abusati, mentre il 20-30% dei bambini vittime di abusi rischiano di diventare tossicodipendenti (Egeland *et al.*, 1987; Chapman e Scott, 2001; Champagne, 2008). Le donne allevate in orfanotrofi senza esperienza di cure parentali mostrano una minore sensibilità e sono più conflittuali nei confronti dei propri figli (Dowdney *et al.*, 1985; Champagne, 2008).

Una trasmissione intergenerazionale delle cure materne e dell'iperprotettività, come valutato dal Parental Bonding Index (PBI), un test di autovalutazione retrospettiva sulle interazioni dei genitori (Parker, 1989), è stata dimostrata tra le donne e le loro figlie (Parker, 1989; Miller *et al.*, 1997) e questa trasmissione di stile parentale sembra essere indipendente dallo status socio-economico, dal temperamento o dalla depressione sia della madre che della figlia. L'attaccamento di una madre alla propria madre è un buon predittore dell'attaccamento del suo bambino (Benoit e Parker, 1994; Pederson *et al.*, 1998; Champagne, 2008).

Sroufe e colleghi (2005), hanno riportato i risultati preliminari di uno studio prospettico che suggerisce le prove per la trasmissione delle classificazioni di attaccamento come misurato nel Strange Situation Task di madre in figlia e nipote; questo SST esplora i cambiamenti nel comportamento di un bambino in seguito ad una breve separazione e reintroduzione della madre durante una sessione di osservazione (Sroufe, 2005; Sroufe *et al.*, 2005; Champagne, 2008).

Negli studi su primati non umani, Dario Maestripieri e colleghi hanno dimostrato l'influenza di abusi genitoriali nei Rhesus macaco nel modulare il successivo comportamento materno della prole, fornendo la prova che oltre il 50% della prole che aveva ricevuto abusi parentali durante i primi 6 mesi di vita esibivano una genitorialità abusiva da adulti (Maestripieri, 1998,1999; Maestripieri e Carrol, 1998). Il *cross-fostering* di neonati da una femmina abusiva a una femmina non abusiva, ha dimostrato che questi neonati da adulti, non manifestavano abusi nei confronti della propria prole, suggerendo il ruolo del contesto post-natale nel mediare questi effetti (Maestripieri, 2005).

La trasmissione di abuso è stata a lungo sospettata da studi condotti su gruppi sociali di Rhesus e Pigtail macachi in cui l'abuso infantile è altamente concentrato entro certe linee materne e tra le femmine strettamente connesse a loro (Maestripieri *et al.*, 1997; Maestripieri e Carrol, 1998). Tuttavia, questa trasmissione generazionale non è limitata a comportamenti abusivi.

Tra cercopitechi in cattività, il miglior predittore della frequenza di contatto madre-bambino è il livello di contatto che una femmina aveva ricevuto dalla madre durante i primi sei mesi di vita (Fairbanks, 1989; Champagne, 2008; Gudsruk e Champagne, 2011). La trasmissione matrilineare dei tassi di respingimento materno è stato osservata anche tra le scimmie Rhesus (Berman, 1990; Champagne, 2008).

Molti studi hanno utilizzato come modello i roditori, in quanto questa specie è caratterizzata da una fecondità e durata di vita che permettono lo studio di più

generazioni di comportamento della prole in un minor periodo di tempo (Champagne, 2008).

Un approccio sperimentale è stato quello di modificare le cure materne ricevute dalle prole e quindi caratterizzare le interazioni madre-cucciolo. La riduzione della normale esposizione dei cuccioli di topo femmine all' interazione materna attraverso uno svezzamento precoce è associata a più bassi livelli di *licking/grooming* (LG) e *nursing* verso i propri cuccioli (Kikusui *et al.*, 2005; Champagne, 2008). Cuccioli femmina di ratto che vengono artificialmente separati dalle loro madri, sia per brevi periodi ripetuti (Lovic *et al.*, 2001; Champagne, 2008) o che hanno subito un'esperienza completa di deprivazione materna (Gonzales *et al.*, 2001; Champagne, 2008), mostrano alterate cure materne.

Un approccio alternativo è stato implementato nello studio sugli effetti materni legati alle variazioni naturali nella cura materna dei ratti Long- Evans (Meaney, 2001; Champagne, 2008). Durante la prima settimana dopo il parto, femmine di ratto in allattamento mostravano una alta frequenza di LG. La frequenza con la quale le femmine si impegnano nell' LG varia notevolmente tra gli individui (Champagne *et al.*, 2003; Champagne, 2008). Così, le femmine possono essere classificate come impegnate in alti, medi, o bassi livelli di LG materno. La prole di femmine con livelli di LG alto, medio e basso presentano livelli di LG che sono altamente correlati al comportamento esibito dalle loro madri (Francis *et al.*, 1992; Fleming *et al.*, 2002; Champagne *et al.*, 2003; Champagne, 2008). Inoltre, effettuando un *cross-fostering* di prole femminile tra madri con alto e basso LG si conferma il ruolo delle cure post-natali nel mediare questa trasmissione. Così, le femmine nate da madri con basso LG e poi affidate a madri con alto LG mostreranno alti livelli di LG verso i propri cuccioli mentre le femmine nate da madri con alto LG e poi affidate a madri con basso LG mostreranno bassi livelli di LG (Francis *et al.*, 1992; Francis e Meaney, 1999; Diorio, Liu e Meaney, 1999; Gonzalez *et al.*, 2001; Champagne *et al.*, 2003; Champagne, 2008).

Da un punto di vista neuroendocrino, figlie allevate da madri con basso LG sono state trovate ad avere un prolungato innalzamento dell'ACTH e del corticosterone in seguito a un moderato stress, una riduzione dell'mRNA dei recettori dei glucorticoidi ippocampali ed un aumento dell'mRNA dell CRH ipotalamico (Liu *et al.*, 1997; Caldji *et al.*, 1998; Champagne, 2008).

Questi risultati iniziali suggerivano che prole di madri con basso LG avessero un'elevata attività dell'HPA come conseguenza della ridotta capacità di sottoregolare il rilascio di CRH e ACTH. Il rilascio di corticosterone dopo l'attivazione dell'asse HPA

ha effetti di feed-back negativo sulla risposta allo stress attraverso l'interazione con i recettori dei glucocorticoidi ippocampali. Una diminuzione dei livelli di mRNA GR nell'ippocampo risulta in una ridotta capacità di raggiungere livelli basali di corticosterone in seguito alla cessazione di un fattore di stress (Sapolsky *et al.*, 1985; Champagne, 2008)..

Oltre a questi effetti HPA, progenie di madri con basso LG hanno una ridotta densità di recettori benzodiazepinici nell'amigdala rispetto alla progenie di madre con alto LG (Liu *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Caldji *et al.*, 2000; Champagne, 2008) e l'espressione delle subunità GABA è alterata dall' LG materno con implicazioni per il legame delle benzodiazepine (Caldji *et al.*, 2003; Champagne, 2008).

Le femmine che con basso LG durante la prima settimana dopo il parto mostrano una riduzione dei livelli dei recettori dell'ossitocina (OTR) leganti nell' MPOA rispetto a madri con alto LG (Champagne *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2005; Champagne e Meaney, 2007; Champagne, 2008). L' MPOA nell' ipotalamo è una regione che è fondamentale per il comportamento materno nel ratto (Parent *et al.*, 2005). Così, figli di madri con basso LG hanno ridotti ricettori dell'ossitocina leganti durante il periodo post-partum. Inoltre, figli di madri con basso LG che sono stati ovariectomizzate e sottoposte a elevate dosi di estrogeni non hanno avuto un aumento dei recettori dell'ossitocina (OTR) leganti nell' MPOA (Champagne *et al.*, 2001; Parent *et al.*, 2005; Champagne, 2008).

L'ossitocina sembra agire per facilitare il rilascio di dopamina da parte dei neuroni in un'altra regione chiamata nucleo tegmentale ventrale. L'aumento del rilascio di dopamina attiva l'LG materno (Champagne, Stevenson, Gratton, e Meaney, 2004). Infondendo un antagonista del recettore dell'ossitocina direttamente nel cervello elimina completamente le differenze di comportamento materno tra madri ad alto e basso LG. E ancora, le differenze nell'espressione dei recettori degli estrogeni o dei livelli dei recettori dell'ossitocina sono invertite col *cross-fostering*, il che suggerisce che la cura materna regola l'attività del recettore degli estrogeni, che costituiscono la base per le successive differenze trasmesse nel comportamento materno (Champagne, Weaver, Diorio, Sharma, e Meaney, 2003).

La mancanza di sensibilità agli estrogeni mostrato dalla progenie di madri con basso LG è simile a quella osservata tra i topi privi di una copia funzionale del recettore degli estrogeni alfa (ER $\alpha$ ) (Young *et al.*, 1998; Champagne, 2008).

Un'espressione differenziale dell' ER $\alpha$  nel MPOA nella prole di madri con basso LG rispetto alla prole di madri con alto LG emerge durante la prima settimana post-partum

e si mantiene in età adulta (Champagne *et al.*, 2003; Champagne *et al.*, 2006; Champagne e Meaney, 2007; Champagne, 2008). Così, prole nata da madri con basso LG e sottoposta a *cross-fostering* alla nascita con madri con alto LG hanno livelli elevati di ER $\alpha$  nel MPOA, mentre prole nata da madri con alto LG sottoposta a *cross-fostering* alla nascita con madri con basso LG mostrano minori livelli di ER $\alpha$  (Champagne e Meaney, 2007; Champagne, 2008).

Tra le femmine ovariectomizzate, l'esperienza di alto LG durante lo sviluppo post-natale predice livelli crescenti di OTR e CFO nel MPOA in risposta a crescenti livelli di estradiolo, mentre tra i figli allevati da madri con basso LG, c'è insensibilità a questi effetti estrogeno-mediati (Champagne *et al.*, 2001, 2003b; Champagne, 2011). L'insensibilità agli estrogeni e ridotta *up-regulation* dell' OTR è un fenotipo osservato nei topi cui è stato inibito l'ER- $\alpha$  (Young *et al.*, 1998; Champagne, 2011), che può spiegare le alterazioni nel comportamento materno osservate in questo modello transgenico (Ogawa *et al.*, 1998; Champagne, 2011) . Gli effetti genomici dell'estradiolo dipendono da interazioni estrogeni-ER-  $\alpha$  (Klinge, 2001; Champagne, 2011) e quindi la riduzione o l'eliminazione dell' ER-  $\alpha$  può portare a insensibilità agli estrogeni. Nella prole femminile adulta allevata da madri con basso LG rispetto a madri con alto LG, ci sono riduzioni di espressione genica ER- $\alpha$  all'interno del MPOA e questi effetti di allevamento emergono durante la prima settimana dopo il parto (Champagne *et al.*, 2003b, 2006; Champagne, 2011). In questo modo, le influenze genetiche e ambientali sulle vie neuroendocrine coinvolte nella responsività agli ormoni gonadici possono ottenere effetti simili sul cervello materno in via di sviluppo (Champagne, 2011).

L'isolamento sociale post-svezzamento è associato ad un aumento dell'attività HPA (Anisman *et al.*, 1998; Heidbreder *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2004; Champagne e Maney, 2007; Champagne, 2008), deterioramento cognitivo, e ridotto comportamento sociale (Heidbreder *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2004; Champagne e Maney, 2007; Champagne, 2008). L'isolamento sociale delle femmine durante il periodo post-svezzamento ha dimostrato ridurre i livelli di ER $\alpha$  nel MPOA di arvicole di prateria (Ruscio *et al.*, 2009) e diminuire OTR nella prole femminile di madri con alto LG (Champagne e Meaney, 2007).

Al contrario, le condizioni d'allevamento, post-svezzamento che sono caratterizzate da un arricchimento sociale sotto forma di allevamento di gruppo con coetanei dello stesso sesso è stato dimostrato attenuare la risposta HPA allo stress e migliorare le prestazioni cognitive (Mohammed *et al.*, 1993; Nithianantharajan e Hannan, 2006; Champagne,

2008). Difatti, un ambiente così strutturato può aumentare l'OTR nella prole femminile di madri con basso LG. Queste esperienze post-svezzamento sono efficaci nello veicolare la trasmissione delle cure materne dalla madre alla prole in modo tale che le femmine allevate da madri con basso LG che sono ospitate in condizioni di ambiente arricchito presentino un aumento dell' LG e la prole femminile di madri con alto LG tenute in isolamento presentano un basso LG (Champagne e Meaney, 2007; Champagne, 2011).

Un allevamento artificiale dei cuccioli di ratto caratterizzato da una completa assenza di contatto con le madri dopo la nascita, è stato riscontrato alterare in maniera significativa lo sviluppo neurologico che porta a deficit di attenzione, iperattività e comportamento sociale ridotto (Levy *et al.*, 2003; Lovic e Fleming, 2004; Champagne, 2011). Le femmine allevate in queste condizioni sono state osservate fornire ridotto LG verso la propria prole (Gonzalez *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2006; Champagne, 2011) e le indagini del meccanismo di questo effetto suggeriscono che le femmine artificialmente allevate sono meno sensibili agli aumenti ormonali indotti dal comportamento materno (Novakov e Fleming, 2005; Champagne, 2011).

Riduzione di LG si osserva anche nelle femmine che hanno sperimentato una separazione materna prolungata durante l'infanzia (Boccia e Pedersen, 2001; Champagne, 2011) o che sono state allevate da madri con un comportamento di basso LG (Champagne *et al.*, 2003a; Francis *et al.*, 1999; Champagne, 2011). Così, il cervello materno può essere plasmato dalla qualità dell'ambiente nei primi anni di vita, portando a variazioni stabili nella frequenza delle interazioni madre-bambino (Champagne, 2011). Un modo di alterare la quantità di stimoli materni ricevuto dai cuccioli è dunque quello di variare la quantità di tempo che i cuccioli passano con le madri. Neonati femmine, che sono private in parte del loro ambiente nidaceo (per 5 ore al giorno) hanno mostrato deficit in vari comportamenti materni da adulti come ad esempio nell'LG-ABN (Lovic, Gonzalez, e Fleming, submitted). Questa ricerca mette in evidenza il ruolo della stimolazione e del licking come un fattori importanti che contribuiscono al normale sviluppo delle risposte fisiologiche, comportamentali e neuroendocrine del neonato di ratto.

Alla luce di queste evidenti effetti di quotidiane separazioni di 5 ore dalla madre è sorprendente che l'unico studio di deprivazione materna completa non ha mostrato alcun effetto. Thoman e Arnold (1968), hanno studiato l'effetto della privazione totale materna e sociale nei neonati di ratto. Alcuni cuccioli sono stati allevati da soli o con altri nove cuccioli in una incubatrice a temperatura controllata; altri cuccioli allevati dalla madre

singolarmente o in cucciolate di nove sono stati utilizzati come gruppo di controllo. Thoman e Arnold (1968), trovarono molto poca differenza tra i gruppi allevati come indicato dalle misure direttamente osservabili di comportamento materno. Sulla base dei risultati di questo studio nel ratto, si può concludere che l'isolamento totale dalla madre alla nascita e l'isolamento da coetanei durante il primo periodo di vita produce molto poco effetto sul successivo comportamento materno; tuttavia, ci sono stati una serie di fattori in questo primo studio che possono aver influenzato i risultati. In primo luogo, i neonati allevati nell'incubatrice sono stati alimentati solo ogni 3/4 ore che possono non rappresentare adeguatamente le poppate che i cuccioli ricevono nel nido e la nutrizione può avere avuto qualche effetto sui risultati (Grotta & Ader, 1969). In secondo luogo, gli animali sono stati alloggiati individualmente dal 25° all'85° giorno, che è ancora un periodo sensibile per un animale per essere isolato (Hall, 1998). Il gruppo di controllo può essere stato negativamente colpito da questo isolamento che avrebbe potuto confondere i risultati. In terzo luogo, non state usate misure comportamentali quantificabili per valutare la qualità delle cure materne che le madri hanno dato alla loro prole. Infine, l'uso di un tubo pulsante, caldo e umido su cui cuccioli potevano stringersi potrebbe aver compensato qualsiasi deficit che una completa deprivazione materna produce (Gruendel & Arnold, 1969).

Gonzalez e colleghi (2001), hanno effettuato uno studio successivo su ratti per valutare gli effetti della completa deprivazione materna e il "rimpiazzo" di comportamenti materni con l'aggiunta di una simulazione di *licking* materno (con un morbido pennello) sullo sviluppo di comportamenti materni da adulti. Nel presente studio, i neonati sono stati artificialmente allevati con il 'paradigma "*pup-in-the-cup*" dal 4° giorno di vita fino allo svezzamento. Questo studio è stato progettato con in mente tre scopi. (1) Ci si aspettava che ratti neonati che erano allevati artificialmente avrebbe mostrato molti deficit nel comportamento materno, sulla base dei risultati provenienti da più limitate precoci privazioni materne. (2) E' stato inoltre ipotizzato che neonati artificialmente allevati che avevano ricevuto maggiore stimolazione tattile avrebbero mostrato un'inversione di alcuni dei deficit visti in età adulta. (3) Un fine ultimo di questo studio è stato quello di verificare se i deficit nel comportamento materno potevano essere trasmessi attraverso le generazioni future e ai figli che non avevano mai sperimentato la separazione dalla madre.

I risultati indicano che il modo in cui i cuccioli sono stati allevati influenza sia il comportamento materno che quello emotivo in età adulta. Rispetto alle femmine MR (allevate normalmente), gli animali AR (allevati artificialmente) hanno mostrato una

minor frequenza e minor durata di un certo numero di risposte materne nei confronti dei piccoli, dopo che hanno partorito in età adulta; Animali AR hanno mostrato ridotti livelli di recupero, *licking* e *crouching* nei confronti dei cuccioli. Anche se gli animali AR hanno mostrato un chiaro deficit nel comportamento materno con i cuccioli, erano ancora responsivi nei loro confronti. Nessuno è stato cannibalizzato o trascurato e tutti i cuccioli venivano recuperati.

Tuttavia, sembrava esserci frequenti intrusioni nel flusso dei comportamenti materni di altri "comportamenti inappropriati", che si riflettono nell'aumento dei livelli di appendersi/mordere la cima della gabbia, mordere il pavimento, scavare nella cuccia e rincorrersi la coda. In generale, gli animali AR sono stati facilmente distratti da stimoli esterni e hanno trascorso meno tempo nel nido. È stato inoltre ipotizzato che se i neonati AR fossero sottoposti ad ulteriori stimoli che imitavano gli effetti del *licking* materno, questi animali sarebbero venuti a mostrare modelli di comportamento più simili agli animali MR. Mentre gli animali AR-MAX non eseguivano i compiti allo stesso livello degli animali MR, per la maggior parte dei comportamenti non differivano né dagli MR né dagli AR-MIN. Quindi, la simulazione del *licking* è stata in grado di migliorare in qualche modo alcuni, ma non tutti, gli effetti prodotti dalla deprivazione materna. Il 5° giorno (MAX) gli stimoli forniti agli animali AR-MAX probabilmente non imitavano il modello o la quantità di *licking* ricevuto in una situazione naturale. Il problema affrontato è quello della quantità ottimale di stimoli che si avvicini maggiormente al *licking* materno. Sebbene sia i comportamenti materni che quelli emotivi sono colpiti allo stesso modo dalla precoce deprivazione materna, e sebbene l'emotività degli animali sicuramente ne influenza il comportamento materno, analisi della covarianza hanno mostrato che una precoce deprivazione materna esercita anche effetti sul comportamento materno adulto, indipendente dai suoi effetti sul sistema emozionale. È interessante notare che questi dati suggeriscono anche che la timidezza degli animali esercita un effetto durante i primi giorni dopo il parto (con l'inizio del comportamento), mentre il livello generale di attività degli animali sembra avere i suoi effetti maggiori sul comportamento durante la fase successiva a quella del parto, una volta che il comportamento è ben consolidato. Quando le figlie di madri AR e MR sono state confrontate nel loro comportamento materno da adulte, le figlie di madri AR hanno mostrato alcuni degli stessi deficit comportamentali osservati nelle loro madri. Hanno mostrato deficit nel tempo trascorso nell'LG-ABN rispetto alle figlie di madri MR. Correlazioni positive sono state trovate tra il tempo trascorso nell'LG-ABN dalla prima generazione delle madri (AR e madri MR) e il tempo impiegato in questi stessi

comportamenti dalle loro figlie quando sono cresciute. È interessante notare che le più alte correlazioni erano in comportamenti esibiti durante i primi 5 giorni del periodo post-parto. Sebbene la differenze di allevamento fra AR e MR sono state trasmesse alla successiva generazione di prole, non c'erano differenze tra la prole di madri AR che avevano subito diverse quantità di stimolazione somatosensoriale sostitutiva. Di conseguenza le differenze più grandi persistevano fra le generazioni, mentre le differenze più piccole no. L'osservazione che le differenze tra la serie originale di madri AR e MR manipolate erano notevolmente maggiori rispetto alle differenze tra le progenie AR e MR che non avevano ricevuto nessuna manipolazione non è sorprendente. La serie originale di madri AR sono stati esposte a numerosi interventi e privazione completa; loro prole erano non manipolata. Anche se è stato ritenuto che le differenze comportamentali tra figli di AR e MR sia dovuta interamente a differenze di comportamento delle loro madri, le differenze possono anche essere legate a differenze nelle loro esperienze nel periodo prenatale. Ad esempio, è possibile che la progenie di madri AR sia stata esposta durante lo sviluppo prenatale a livelli più elevati di ormoni dello stress, come pure a livelli alterati di steroidi gonadici, e che gli effetti a lungo termini sul loro comportamento materno possano essere stati mediati attraverso questi meccanismi endocrini (Gonzales *et al.*, 2001).

Nelle condizioni di allevamento dei laboratori standard, la prole femminile che riceve alti livelli di LG saranno madri con alto livello di LG, mentre la prole che riceve bassi livelli di LG madri con basso LG. Se questa prole è collocata in condizioni di isolamento sociale oppure in condizioni di allevamento post svezzamento arricchite non mostra differenze tra i gruppi per quanto riguarda l'LG (Champagne e Meaney, 2007; Champagne, 2008). Inoltre, i livelli recettori dell'ossitocina (OTR) leganti nelle regioni ipotalamiche, ad esempio nell'MPOA, sono più alti nella prole socialmente arricchito di madri con basso LG e minori nella prole socialmente impoverita di madri con alto LG. Questi risultati completano un lavoro precedente che indica che la prole di femmine allevata in questi ambienti "eredita" la caratteristica fenotipica degli animali allevati in queste condizioni (Kiyono *et al.*, 1985; Delle Rose, 1987; Francis *et al.*, 2000; Champagne *et al.*, 2001; Champagne, 2008; Champagne, 2011).

Caldji e colleghi (2000), riferiscono che la prole femminile di madri con alto LG-ABN (*licking/grooming- archedback nursing*) mostrano un maggiore LG-ABN della prole femminile di madri con basso LG-ABN. La prole biologica di madri con basso LG-ABN allevata da madri con alto LG-ABN erano significativamente meno timorose in condizioni di novità rispetto alla prole biologica di madri con alto LG-ABN allevata da

madri con basso LG-ABN. Da adulta la prole femminile di madri con basso LG-ABN allevata da madri con alto LG-ABN non differiva nella frequenza dalla prole allevata con un LG-ABN normale o alto. La frequenza di LG-ABN negli animali allevati da madri con alto LG-ABN era significativamente più alto rispetto al gruppo con basso LG-ABN, e include anche il caso di cuccioli femmine originariamente nati da madri con alto LG-ABN, ma allevati da madri con basso LG-ABN (McCarty e Lee, 1996; Fleming *et al.*, 1999; Francis *et al.*, 1999; Blaffer-Hrdy, 1999; Caldji *et al.*, 2000).

La manipolazione aumenta l'LG-ABN materno. La manipolazione dei cuccioli, infatti, trasforma il basso LG-ABN in alto LG-ABN (Lee & Williams 1974, 1975; Liu *et al.*, 1997; Francis *et al.* 1999b; Liu *et al.* 1997; Meaney, 2001; Champagne e Meaney, 2007). Da adulta, la prole F2 manipolata di tali madri assomigliano ai figli di madri con alto LG-ABN, una constatazione che è coerente con l'ipotesi di trasmissione non genomica. E' stata poi studiata la generazione F3, concentrandoci sulla prole della prole F2 manipolata e non manipolata di madri con basso LG-ABN. Le madri con basso LG-ABN con cuccioli manipolati si comportano in un modo che è indistinguibile da madri con alto LG-ABN, così come la loro prole femminile (Caldji *et al.*, 2000; Meaney, 2001).

La manipolazione post-natale che coinvolge brevi periodi di separazione materna, diminuisce la risposta allo stress della prole (Meaney, Aitken, Bhatnagar, e Sapolsky, 1991; Meaney, Aitken, Bodnoff, Iny, e Sapolsky, 1985; Anisman *et al.*, 1998; Champagne, 2007) e aumenta le capacità di apprendimento e la memoria (Meaney, Aitken, Bhatnagar, e Sapolsky, 1991; Meaney, Aitken, Bodnoff, Iny, e Sapolsky, 1985; Champagne, 2007).

Da adulti, gli animali che sono stati sottoposti a manipolazioni durante i primi 21 giorni di vita mostrano normali livelli di ACTH basale e di corticosterone (Anisman *et al.*, 1998).

E' stato riscontrato (Francis *et al.*, 1999b) che la prole manipolata di madri con basso-LG-ABN assomiglia alla la prole di madri con alto LG-ABN in relazione alla risposta comportamentale e endocrina allo stress, al CRF ipotalamico, e all'espressione dell' mRNA dei recettori dei glucocorticoidi ippocampali, così come ai recettori leganti delle benzodiazepine.

Nella misurazione della risposta del corticosterone plasmatico allo stress o al comportamento di paura in condizione di novità, la prole manipolata di madri con basso LG-ABN non differivano dalla prole, manipolata o meno, di madri con alto LG-ABN. Erano, dopotutto, cuccioli manipolati. Prevedibilmente la prole non manipolata di madri

con basso LG-ABN mostrava un significativo incremento della risposta HPA allo stress e un aumento della paura in risposta alle novità.

Se le differenze nel comportamento materno fossero trasmesse solo attraverso l'eredità genetica, allora sarebbe prevedibile che la prole di madri con basso LG-ABN diventassero madri con basso LG-ABN al di là del fatto che fossero state manipolate o meno nel primo periodo di vita. Di conseguenza l'esperienza della manipolazione era trasmessa alla generazione successiva attraverso cambiamenti nel comportamento materno. Inoltre gli effetti di un evento ambientale nel primo periodo di vita possono essere trasmessi alla generazione successiva e questi effetti sono mediati dalle alterazioni nel comportamento materno. Queste scoperte dimostrano che eventi ambientali possano alterare la traiettoria dello sviluppo non solo nella prole che ne fa esperienza ma anche nella successiva generazione (Caldji *et al.*, 2000; Meaney, 2001).

Studi epidemiologici suggeriscono che le avversità ambientali possono alterare le cure parentali e influenzare quindi lo sviluppo del cucciolo (Champagne e Meaney, 2006).

Modelli contemporanei di psicopatologia dello sviluppo suggeriscono che le esperienze negative ambientali, psicosociali o fisiche durante il primo periodo di vita sono fattori predisponenti lo sviluppo di disturbi comportamentali ed emozionali in età adulta. Negli esseri umani, primati e roditori, l'attaccamento insicuro e cure materne inaffidabili, disorganizzate e scarse influenzano negativamente le risposte comportamentali adeguate e provocano comportamenti disadattivi (Sanchez *et al.*, 2001; De Kloet *et al.*, 2005; Pryce *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2010). Studi epidemiologici hanno inoltre dimostrato che la prole di madri con tali alterazioni comportamentali, e, talvolta, la generazione seguente, è spesso colpita in modo simile pur non avendo subito il trauma essa stessa (Bifulco *et al.*, 2002; Harper, 2005; Sterba *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2010). L'osservazione che le alterazioni comportamentali indotte da stress possono essere trasmesse attraverso le generazioni è interessante e di fondamentale importanza. Poiché implica fattori ambientali, la trasmissione appare essere di natura epigenetica (Weaver *et al.*, 2004; Cameron *et al.*, 2008; Franklin *et al.*, 2010).

Champagne e Meaney (2000), hanno esaminato gli effetti dello stress gestazionale sul comportamento materno di madri con basso e alto LG-ABN. Le femmine precedentemente definite come madri con alto o basso LG-ABN in relazione alla loro prima cucciolata erano esposte o a stress da reclusione durante la prima metà della gestazione o condizioni di controllo. Lo stress gestazionale diminuiva la frequenza di LG-ABN nelle madri con alto LG-ABN ma non in quelle con basso LG-ABN. Di conseguenza un segnale ambientale di stress durante la gravidanza era sufficiente a

ribaltare completamente il pattern di comportamento materno nelle madri con alto LG-ABN.

Queste scoperte inducono a domandarsi se gli effetti dello stress gestazionale appaiano nelle successive cucciolate, anche in assenza di ulteriore stress.

In uno studio successivo condotto sempre da Champagne e Meaney (2006), madri di ratto in fase di allattamento sono state catalogate a seconda della loro spiccata o scarsa tendenza a leccare e curare i cuccioli, e quindi nuovamente fecondate e sottoposte per 7 giorni nel corso della gestazione a condizioni di stress e di controllo. Le femmine di ratto si sono poi accoppiate per una terza volta senza nessuna successiva interferenza. Sono stati esaminati il comportamento materno, il legame dei recettori dell'ossitocina e il comportamento della prole. I risultati emersi da questo studio sono stati che lo stress ha ridotto i legami dei recettori dell'ossitocina e la predisposizione a leccare e curare il cucciolo nelle madri che avevano presentato spiccata tendenza a questo comportamento, fino a livelli comparabili alle madri che avevano manifestato invece una minore inclinazione a tale comportamento. Raggiunta l'età adulta, la prole femmina delle madri con alta propensione a leccare e curare il cucciolo sottoposte a stress gestazionale, mostrano indicatori comportamentali relativi allo stress, al comportamento materno e legami dei recettori dell'ossitocina, simili a quelli della prole delle madri con scarsa tendenza a leccare/curare i cuccioli. Dai risultati della terza fecondazione è emerso un effetto duraturo prodotto dallo stress in gestazione sull'atteggiamento di leccare e curare il cucciolo sia nella madre che nella prole femminile. Questi dati suggeriscono che lo stress può direttamente alterare le cure materne attraverso il sistema neuroendocrino che normalmente le regola. Perciò, gli effetti derivanti dalle condizioni avverse subite nel proprio ambiente, possono tramandarsi alle generazioni successive attraverso un meccanismo di azione non genomico riguardante le cure materne.

Considerati nel loro insieme, i risultati di questa ricerca suggeriscono che un ambiente ostile può alterare il benessere emotivo di alcune madri, provocando una diminuzione della sensibilità materna. Dunque lo stress durante la gestazione porta alla riduzione dei livelli di interazioni post-partum madre-cucciolo (Champagne e Meaney, 2006; Moore e Power, 1986; Champagne, 2011), anche se le femmine si prendono cura di cuccioli non propri non stressati. Tra le femmine che sono state precedentemente caratterizzate come esibenti alto LG verso i loro cuccioli, l'esperienza di stress cronico gestazionale sopprime la frequenza di LG dopo il parto associato a una riduzione stress-indotta dell'OTR nell' MPOA e nell'amigdala (Champagne e Meaney, 2006; Champagne, 2011). La riduzione dell'LG persiste quando queste femmine sono ri-accoppiate,

suggerendo una down-regulation a lungo termine dei circuiti neuroendocrini sottostanti il comportamento materno (Champagne, 2011).

Negli umani, Fleming e Corter (1988), riportano che mentre molti fattori contribuiscono all'atteggiamento materno verso i neonati, nessuno ha un'influenza determinante quanto il livello di ansia della madre. Madri che si sentono depresse o ansiose hanno un atteggiamento meno positivo nei confronti del proprio bambino (Field, 1998; Fleming e Corter, 1988; Caldji *et al.*, 2000). Inoltre, ci sono prove della trasmissione dello stato ansioso. Madri molto ansiose hanno maggior probabilità di avere figli timidi e riservati, e il comportamento delle madri fa presagire un futuro alto livello di inibizioni nel cucciolo (Hirshfeld *et al.*, 1997a, 1997b). Variazioni più estreme nelle cure parentali hanno effetti prevedibili. Studi sulle madri indicano che l'esposizione a livelli di stress estremo è associata ad abusi e incuria del bambino (Whipple e Webster-Stratton 1991). Heim e colleghi (2000), hanno recentemente evidenziato che le donne con una storia di abusi mostrano un'accresciuta risposta endocrina e autonoma del sistema nervoso; e il risultato di questa ricerca è in accordo con i risultati delle ricerche in corso circa la trasmissione per via materna di un atteggiamento timoroso alla prole.

Le prime esperienze di vita influenzano dunque il comportamento (Lay, 2000) e molte ricerche sono state effettuate sugli effetti che le differenti fonti di stress esercitano sul comportamento materno e sullo sviluppo della prole (ad esempio Priestnall, 1973; Lee e Williams, 1974; Sherrod *et al.*, 1974; Pardon *et al.*, 2000; Meek *et al.*, 2001; Macrì e Wurbel, 2007). Le fonti di stress a cui vengono sottoposte le femmine di roditore in gravidanza possono essere vari: termostress, iniezioni, immobilizzazione; uno stress cronico è ottenuto attraverso esposizioni ripetute (Pardon *et al.*, 2000). Un altro approccio è il protocollo di *Chronic Mild Stress* (CMS) dove le fonti di stress possono essere periodi di privazione da cibo e acqua, scuotimento della gabbia e cambio di compagni di gabbia, eseguiti per settimane o mesi (Willner, 1997).

Le fonti di stress pre-partum influenzano il comportamento materno, come dimostrato da Pardon e colleghi (2000). Riducendo l'intensità del protocollo CMS è stato creato un protocollo CUMS (*Chronic Ultra Mild Stress*) e utilizzato dalla fine dell'accoppiamento fino a dopo il parto: scuotimento della gabbia, riduzione delle dimensioni della gabbia, periodi notturni con gabbia sporca, difficoltà di accesso al cibo, ecc. Il CUMS non aveva effetti sul comportamento di *nest building* ma aveva effetti sull'abilità della madre nel proteggere i propri cuccioli da maschi intrusi. Le femmine CUMS non rispondevano aggressivamente all'intruso, mentre recuperavano i cuccioli e li

riportavano al nido nonostante questo portasse quasi sempre al mettere a repentaglio i cuccioli per la presenza del maschio all'interno del nido.

Meek e colleghi (2001), hanno sottoposto le femmine in gravidanza e in allattamento a varie forme di stress psicologico cronico e creato differenti combinazioni di stress pre-partum e post-partum effettuando un *cross-fostering* fra cuccioli e madri stressati e non stressati. Femmine che crescevano cuccioli con una esperienza di stress differente dalla propria mostravano un grado minore di *grooming*, *nursing* e tempo di permanenza nel nido. Madri non stressate che crescevano cuccioli stressati recuperavano i cuccioli molto più lentamente e mostravano un minor numero di attacchi quando sottoposte ai test di aggressività materna sia rispetto alle madri stressate con cuccioli non stressati che alle madri stressate con cuccioli stressati. Femmine stressate che allevavano cuccioli stressati mostravano alti livelli di recupero e aggressività materna.

Tra topi da laboratorio, la riduzione dei materiali di nidificazione forniti alle femmine in allattamento durante il periodo postnatale aumenta in modo significativo l'incidenza di eventi aggressivi tra cuccioli e madri (come pestare i cuccioli, *grooming* aggressivo, e il trasporto di cuccioli da un arto) e diminuisce la frequenza di comportamenti materni come ad esempio l'LG. (Ivy *et al.*, 2008; Rainekei *et al.*, 2010; Gudsruk e Champagne, 2011). Anche quando i cuccioli sono esposti ad una madre non biologica che sono forniti di limitati materiali di nidificazione e poste in un ambiente non familiare, l'esposizione dei cuccioli a questi comportamenti aggressivi aumenta. La conseguenza epigenetica di queste esperienze sono determinate dal gene BDNF nella corteccia prefrontale (Roth *et al.*, 2009; Gudsruk e Champagne, 2011). Il maltrattamento post-natale predice la ridotta espressione del BDNF nella corteccia prefrontale in età adulta. Tra la prole non abusata, ci sono livelli molto bassi di metilazione del DNA nel gene promotore del BDNF, mentre figli abusati hanno livelli elevati di questa modifica epigenetica repressiva. Il BDNF svolge un ruolo critico nello sviluppo del cervello e la plasticità neuronale. (Calabrese *et al.*, 2009; Gudsruk e Champagne, 2011).

Lo stress psicosociale sperimentato da femmine gravide attiva l'asse HPA materno con conseguente rilascio di glucocorticoidi che attivano il sistema nervoso parasimpatico. Benchè ci siano enzimi all'interno della placenta, come l'11- $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi-2 (11- $\beta$ HSD-2) in grado di inattivare i glucocorticoidi e tamponare l'esposizione del feto in via di sviluppo agli ormoni steroidei, l'esperienza di un grave evento stressante può superare la capacità della conversione enzimatica (Edwards *et al.*, 1996; Seckl *et al.*, 1999; Champagne, 2008). Prole esposta ad elevati livelli di glucocorticoidi durante lo sviluppo fetale mostrano elevato corticosterone plasmatico

(Stohr *et al.*, 1998; Champagne, 2008) e una maggiore CRH mRNA nell'amigdala con conseguente iperattività, inibizione nell'esplorare le novità, e difficoltà sulla misurazione del comportamento cognitivo e sociale (Weinstock, 1988; Patine *et al.*, 2005; Champagne, 2008).

Femmine con alto LG esposte a stress gestazionale durante l'ultima settimana di gravidanza presentano bassi livelli di cure materne nel periodo post-partum associata a diminuzione del recettore dell'ossitocina ipotalamica legante sia nelle madri che nelle figlie femmine (Champagne e Meaney, 2006; Champagne, 2008). Se le interazioni genitore-figlio servono per predire il comportamento futuro dei giovani, ci deve essere quindi una relazione prevedibile tra la qualità dell'ambiente e la cura parentale (Parent *et al.*, 2005).

Forse la prova più convincente di tale relazione emerge dagli studi di Coplan e colleghi con primati non umani (Coplan *et al.*, 1996). Nel macaco Bonnet in coppie madre-bambino tenuti in condizioni che richiedono ampio sforzo materno per procurarsi il cibo, ci sono state gravi perturbazioni nella qualità delle interazioni madre-bambino. I neonati di madri ospitate in queste condizioni erano più timidi e paurosi e, anche quando erano in contatto con la madre, in realtà hanno mostrato segni di depressione comunemente osservati nei cuccioli che sono stati separati dalle loro madri. Come gli adolescenti, i bambini allevati nelle condizioni più impegnative erano più timorosi e sottomessi e hanno mostrato un minore comportamento di gioco sociale. Come previsto, queste condizioni influenzano lo sviluppo del sistema neuronale che mediano la risposta comportamentale e endocrina allo stress, aumentando i livelli di CRF e le loro risposte noradrenergiche allo stress e queste caratteristiche verranno poi trasmesse alla generazione successiva.

Il punto critico è l'effetto di avversità ambientale sul comportamento materno. Studi effettuati da Parent e colleghi (2005), hanno dimostrato che femmine di ratto con alto LG esposte quotidianamente a stress durante la gravidanza hanno mostrato una diminuzione dei livelli di LG paragonabili a quelli di madri a basso LG. E gli effetti sul comportamento materno erano evidenti nella prole. Da adulti, i figli di madri con alto LG che erano state stressate in gravidanza, erano paragonabili a quelli di madri a basso LG nella misura di risposta comportamentale allo stress. Questi effetti sono legati allo stress prenatale e si ripresentano nelle successive cucciolate, anche in assenza di ulteriore manipolazione sperimentale. Gli effetti dello stress gestazionale sono evidenti anche nel comportamento materno della prole femminile. La prole femminile di madri con alto LG esposte a stress gestazionale, anche in una precedente gravidanza, si

comportava verso i loro cuccioli in modo coerente con il comportamento delle loro madri; da adulte, queste femmine sono diventate madri a basso LG con riduzione dei livelli dei recettori dell'ossitocina leganti nel MPOA. Quindi gli effetti delle avversità ambientali vengono trasmessi dai genitori ai figli.

Invece secondo Crews (2011), il cambiamento epigenetico dipendente dal contesto si può osservare se i fattori ambientali che determinano la modificazione epigenetica sono mantenuti nel tempo. Ad esempio, se la temperatura, la dieta, il comportamento, o sostanza tossica ambientale, ecc continua a persistere nell'ambiente, allora la modifica epigenetica si manifesterà in ogni generazione. È importante sottolineare che, modificazioni epigenetiche dipendenti dal contesto possono essere invertite rimuovendo il fattore dall'ambiente o fornendo donatori metilici o inibitori delle istone deacetilasi. Anche se non è provato per quanto tempo tali modifiche possono verificarsi non vi è alcuna prova che i cambiamenti epigenetici indotti dal comportamento (ad esempio, quelle prodotte dalla natura e dalla qualità delle cure materne) durino al di là di una sola generazione senza esposizione continua. Ad esempio, la trasmissione dalla madre al cucciolo non è veramente transgenerazionale in natura; cioè, non si ripeterà senza ulteriore esposizione a ogni generazione. Così, modificazioni epigenetiche dipendenti dal contesto hanno a che fare con la trasmissione nell'arco di una generazione (all'interno del ciclo di vita di un individuo) e si propagano attraverso le cellule somatiche (= eredità mitotico epigenetica).

## Capitolo 2: Comportamento del cucciolo:

### -2-1: Sviluppo neurologico neonatale:

In tutti i vertebrati, cane incluso, il cervello si sviluppa nell'embrione a partire dal tubo neurale. Inizialmente si divide in tre parti: prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo. Successivamente il prosencefalo si differenzia in telencefalo e diencefalo; il rombencefalo si differenzia in metencefalo e mielencefalo, mentre il mesencefalo rimane come unità funzionale integra nell'adulto. Ovviamente le relative specializzazioni delle differenti parti del cervello variano a seconda delle specie. Nei mammiferi il telencefalo si sviluppa nel *cerebrum* che include la corteccia cerebrale e questa struttura è estremamente variabile a seconda della specie di appartenenza. E' la parte del cervello che contiene i centri dell'integrazione degli stimoli sensoriali, del ragionamento cosciente e riflesso ed in particolare una parte della corteccia definita neocorteccia, che è unica nei mammiferi. Una parte della corteccia cerebrale è comune a tutti i mammiferi (e rettili) ed è chiamata sistema limbico; questo è composto dall'ippocampo, dalla corteccia olfattiva e da parti del talamo e dell'ipotalamo del diencefalo. Questa regione del cervello contiene i centri coinvolti nell'immediato controllo dei programmi comportamentali di base, legati al *feeding*, all'aggressività, e al comportamento sessuale. Il sistema limbico è anche connesso ad aree sensoriali nella neocorteccia ed è responsabile dei legami di attaccamento e dei sentimenti (Alcock, 2001).

Durante l'embriogenesi, le connessioni nervose si sviluppano sotto l'influenza di due fattori principali: l'espressione del programma genetico di crescita e l'interazione con l'ambiente esterno (Pageat, 1999; Colangeli, 2004). Il primo fattore avvia la formazione dei neuriti, cioè dei prolungamenti cellulari rappresentati dagli assoni, dai dendriti e dalle loro ramificazioni. L'estremità di ciascun neurite è costituita da una struttura attiva chiamata "cono di crescita" che si presenta come un rigonfiamento terminale che emette prolungamenti filamentosi detti filopodi o spicule (Pageat, 1999; Meunier e Shvaloff, 1992).

Differenti fattori biochimici controllano questa crescita. Alcuni agiscono sull'allungamento, come le GAP-1 (*Growth Associated Protein 1*), altri, come le MAP-2 (*Microtubules Associated Protein 2*), permettono di stabilizzare il citoscheletro. Quest'ultima proteina è interessante in quanto oggi sappiamo che è intimamente legata ai

fenomeni di plasticità delle connessioni nervose e, attraverso un processo di defosforilazione, stabilizza i ponti tra i microtubuli ed i neurofilamenti, contribuendo alla formazione delle ramificazioni dendritiche. Al contrario, la fosforilazione di questa proteina provoca la regressione di una rete dendritica in formazione (Pageat, 1999).

Per finire, alcune proteine come le N- CAM (di aderenza tra i neuroni) e le Ng- CAM (di aderenza tra neuroni e cellule gliali) contribuiscono a stabilizzare i contatti intercellulari (Pageat, 1999).

Tra i fattori fisici, si dovranno tenere in considerazione i campi elettrici, la gravità ecc., come anche alcune influenze chimiche di origine materna (Pageat, 1999).

La sinaptogenesi prosegue anche dopo la nascita del cucciolo, ma in questo periodo il ruolo degli stimoli esterni diventa preponderante (Pageat, 1999).

Storicamente, è lo studio dello sviluppo dei sistemi sensoriali che ha permesso di dimostrare che l' assenza di determinati stimoli può causare alterazioni funzionali nell' adulto; questi fenomeni si basano su un' importante regola della sinaptogenesi: una sinapsi viene rinforzata da un effetto retroattivo quando la trasmissione diventa funzionale in seguito a stimolazioni esterne. Il futuro neurone presinaptico, liberando il neurotrasmettitore, induce la differenziazione dell' estremità post-sinaptica e la presenza di enzimi di catabolismo. Durante questo periodo di sviluppo, la produzione di connessioni interneuronali è estremamente importante, ma solo quelle che sono state stimulate sopravvivranno; questo fenomeno di fondamentale importanza nello sviluppo dell' organizzazione del sistema nervoso viene descritto sotto il nome di "stabilizzazione selettiva". Lo sviluppo in un ambiente correttamente stimolante permette una modulazione delle risposte comportamentali; per ciascun canale sensoriale, l' animale avrà la capacità di adattarsi ad un livello medio di stimolazione, che è quello che si trova nel suo ambiente abituale. Questo stato di equilibrio, che si accompagna all' assenza di risposta emozionale al di sotto del livello di stimolazione medio dell' ambiente, corrisponde allo stato di omeostasi sensoriale (Pageat, 1999).

### **Ruolo dell' ippocampo nella regolazione dell' asse HPA:**

Anche se il rilascio di CRH è il primo passo della catena di eventi che portano all' attivazione surrenale, rappresenta anche l' ultimo prodotto delle interazioni tra i diversi circuiti centrali che coinvolgono l' ippocampo (Herman e Cullinam, 1997).

I neuroni ippocampali modulano il feed-back negativo sul rilascio di glucocorticoidi (GC) controllando il rilascio di CRH in funzione del numero di recettori per i GC presenti (Sapolsky *et al.*, 1990)

Sembra quindi logico pensare che modifiche dell'efficienza del feed-back negativo operato dall'ippocampo possano alterare la risposta dell'intero asse HPA allo stress. È stata dimostrata l'implicazione dell'ippocampo nel modellamento delle risposte emozionali agli eventi stressanti e nel controllo del comportamento esploratorio indotto dalla novità (Gray e Mcnaughton, 1983).

Anche se è difficile considerare queste due funzioni indipendentemente, il corticosterone (cortisolo nel cane) le modula grazie alla sua specificità per due sottotipi di recettori presenti nell'ippocampo: i recettori per i GC ed i recettori per i mineralcorticoidi. I recettori per i GC sono coinvolti nell'inibizione della risposta dell'asse HPA allo stress, cioè nel feed-back negativo, mentre i recettori per i mineralcorticoidi sono coinvolti nel ridurre la reattività comportamentale ad un ambiente nuovo (De Kloet *et al.*, 1993).

## **-2-2: Periodi sensibili del cucciolo:**

Negli ultimi 50 anni, lo sviluppo sociale degli individui sia umani che non umani è stato oggetto di numerosi studi ed è ormai ammesso che le esperienze precoci hanno un effetto maggiore sul futuro comportamento dell'adulto che non quelle che avvengono in altre fasi più tardive della vita (Levine, 1962; Bateson, 1981).

Le prime ricerche nel laboratorio di Bar Harbor, sull'ontogenesi del comportamento del cane, portarono alla conclusione che esistono periodi particolari di sviluppo precoce in cui i cuccioli sono particolarmente sensibili alle influenze ambientali e, di conseguenza, particolarmente vulnerabili a danni psicologici permanenti (Scott e Fuller, 1965; Wilsson e Sundgren, 1998). Un corretto sviluppo comportamentale del cucciolo che tenga conto di tali periodi è di fondamentale importanza per il suo futuro inserimento nella società umana di cui dovrà far parte; anche se alcuni tratti caratteriali hanno sicuramente una base ereditaria, gran parte del comportamento del cane adulto dipende da come è stato allevato nelle prime settimane di vita e anche prima della nascita.

Infatti, lo sviluppo comportamentale del cucciolo permette l'acquisizione di diverse competenze: sensoriale, emozionale, cognitiva e sociale. Queste competenze dipendono da vari fattori correlati fra loro: una promessa genetica, un adeguato equipaggiamento neurosensoriale, un ambiente ricco di stimoli e la presenza di partner sociali (Colangeli, 2004).

Durante gli ultimi 20 anni è emerso il concetto dei "periodi critici" da un punto di vista comportamentale, concetto che ha avuto un forte impatto nel rapporto con il cane.

Recentemente il termine “periodo sensibile” ha sostituito quello di critico. Il periodo sensibile è rappresentato da una porzione di tempo nella vita dell’ animale, in cui una piccola quantità di esperienza (o la totale mancanza di esperienza) ha un grande effetto sul comportamento successivo (Scott e Marston, 1950; Freedman *et al.*, 1961; Scott, 1962; Houpt, 2011).

Lo sviluppo del comportamento del cane comprende diverse fasi anche se esse non sono altro che “un sistema di classificazione semplificato dove delle linee rette sono state tracciate in un processo continuo” (Bateson, 1981).

Scott e Marston (1950), Freedman e colleghi (1961), Scott (1962), Scott e Fuller (1965), Houpt, (2011), Braastad e Bakken (2002), Battaglia (2009), riferiscono che i periodi critici nel cane sono definiti come periodo neonatale (1-2 settimane), periodo di transizione (3 settimana), periodo della socializzazione (4-10 settimane) e periodo giovanile (da 10 settimane fino alla maturità sessuale).

Questa divisione presenta tuttavia l’inconveniente di ignorare una fase della maturazione di cui si sottolinea sempre più l’importanza: il periodo prenatale che, grazie all’apporto recente dell’ecografia, è stato inserito nel contesto generale dello sviluppo comportamentale del cucciolo (Colangeli, 2004).

Nel gatto, il periodo sensibile va invece dalle 2 alle 7 settimane ed è più precoce rispetto a quello del cane (Turner e Bateson, 1988; Houpt, 2011).

### **Periodo prenatale:**

Il periodo prenatale corrisponde alla vita in utero, fino al momento della nascita.

Appena prima della nascita il feto maschio produce una scarica di testosterone che ha l’effetto organizzativo sul suo cervello, mascolinizando e defemminizzando il cervello stesso. La mascolinizzazione risulta nei comportamenti tipici maschili come il *roaming*, il marchiare il territorio con l’urina, aggressività fra maschi e comportamento sessuale tipico del maschio. La predisposizione del cervello fetale verso un fenotipo maschile o femminile è irreversibile, ed influenza tutti i comportamenti tipici del genere (Luescher, 2011).

Secondo Colangeli (2004), tre sono i punti da focalizzare in questo periodo: le reazioni emotive, la preferenza alimentare e la sensibilità tattile. .

Per quanto riguarda la reattività emozionale, studi condotti da Pageat (1999), hanno dimostrato che uno stress provocato nella madre induceva una forte agitazione dei feti e la suzione degli arti o del cordone ombelicale. Essendo il feto sordo, si può ipotizzare che ci sia una trasmissione della reazione emotiva dalla madre al cucciolo.

Esperimenti condotti su roditori indicano che le influenze materne transplacentari hanno un effetto sul comportamento della prole. E' stato dimostrato che piccoli nati da ratte sottoposte a continue situazioni stressanti durante la gestazione hanno sensibilità sensorio-motrici, cognitive e immunitarie significativamente inferiori a quelli nati da femmine mantenute in un ambiente favorevole (Denenberg e Rosenberg, 1967; Denenberg e Wimbley, 1963).

Altri studi hanno dimostrato che l'iniezione di ACTH in ratte gravide portava alla nascita di individui più emotivi e con minor capacità di adattamento alle situazioni inconsuete (Fox, 1978).

Si può così affermare che la reattività emozionale dell'adulto è, almeno in parte, determinata dalle circostanze della vita intrauterina (Colangeli, 2004). Infatti, gli ormoni passano facilmente la barriera placentare per cui, in caso di stress, l'ipercortisolemia materna si trasmetterà molto rapidamente ai suoi feti. Inoltre, nei roditori, è stato dimostrato che gli androgeni derivanti dalla circolazione materna o dalla prossimità con maschi in utero esercitano un effetto mascolinizante sul comportamento delle femmine neonate (Hart e Hart, 1985).

Per quanto concerne la preferenza alimentare, numerose osservazioni realizzate sia negli invertebrati che nei vertebrati hanno mostrato che alcune sostanze alimentari, presenti nella dieta della femmina, sarebbero poi attivamente ricercate dalla sua progenie e rappresenterebbero un criterio di riconoscimento degli alimenti. Ad esempio, la femmina di *Nemeritis canescens*, un imenottero entomofago, depone le sue uova in larve di insetti fitofagi. Le piante, che costituiscono il nutrimento principale di queste larve, rappresenteranno il medesimo habitat nel quale gli adulti di *Nemeritis* troveranno le loro prede (Thorpe e Caudle, 1937).

Nel cane, è possibile orientare il gusto dei cuccioli in base all'alimentazione della madre. Un studio ha dimostrato che cuccioli figli di madri alimentate con razioni contenenti essenza di timo ricercano maggiormente le mammelle spennellate con timo (Pageat, 1999). Anche se i dati riguardanti questo periodo sono ancora frammentari, si può ritenere che l'ambiente di vita della cagna, il suo stato emotivo e le interazioni con l'uomo rivestono una notevole importanza per lo sviluppo comportamentale del cucciolo (Pageat, 1999).

Per quanto riguarda invece la sensibilità tattile, durante la gestazione, il sistema nervoso è in corso di sviluppo per cui è ancora presente un deficit sensoriale: il cucciolo è sordo e cieco, ma il canale sensoriale tattile è quasi completamente sviluppato (Colangeli, 2004).

Carmichael e Lehner (1937), in uno studio su cavie, scoprirono l'esistenza, di una sensibilità termica durante la vita fetale. Intensi stimoli termici, freddi o caldi, erano infatti in grado di evocare risposte attive.

Nel cane, la sensibilità tattile del feto in utero è stata dimostrata da esperimenti condotti da Pageat (1998), su femmine sottoposte a controllo ecografico (Pageat, 1999). Palpando la zona addominale in corrispondenza delle corna uterine al 45° giorno di gravidanza, i feti producono una risposta di agitazione per almeno 30 secondi. Inoltre con il prolungarsi nel tempo di questo trattamento la reazione di agitazione diminuisce sensibilmente, a testimoniare che già nel feto esiste la possibilità di assuefazione a questo stimolo. Secondo Pageat, è logico pensare che questa capacità di abitudine giochi un ruolo nello stabilire le future soglie di sensibilità tattile.

### **Periodo neonatale:**

Il periodo neonatale, sia nel cane che negli altri mammiferi, è stato a lungo sottovalutato dagli etologi, a causa dell'aspetto "vegetativo" dell'attività dei cuccioli (Pageat, 1999); difatti ad esempio, alla nascita ratti e topi somigliano a feti, sono ciechi e riescono solo a contorcersi inutilmente, oltre al fatto che sono ancora poichilotermi (cioè a sangue freddo) poiché il loro cervello non è ancora sviluppato abbastanza per regolare la temperatura corporea (Carlson, 2001; Numan e Insel, 2003).

Solo grazie ai lavori che hanno indagato lo sviluppo postnatale del sistema nervoso centrale e delle sue variazioni sulla base delle stimolazioni che riceve, gli etologi hanno preso coscienza dell'importanza di tale periodo (Pageat, 1999).

Il periodo neonatale è definito come il tempo che intercorre fra la nascita del cucciolo e l'apertura degli occhi, nel cane verso i 10-13 giorni di età (Pageat, 1999).

Alla nascita, il sistema nervoso del cucciolo neonato è ancora un sistema in via di sviluppo e largamente immaturo e la corteccia cerebrale non è ancora interamente formata; l'insieme delle risposte del cucciolo deriva dal controllo sotto-corticale (Fox, 1971; Pageat, 1999).

Il cervello di un cucciolo neonato è costituito da 10% di sostanza secca a fronte del 19% dell'adulto per cui il sistema nervoso è ancora largamente immaturo e deve completare il suo sviluppo (Fox, 1971; Houpt, 2011).

Gli abbozzi corticali più sviluppati in questo momento corrispondono alle aree motrici, e la corteccia occipitale, che comprende le aree visive, cresce più in fretta delle aree sensoriali e motorie situate frontalmente, da una parte e dall'altra della scissura di Rolando. Questa regione corticale comprende d'altronde numerosi neuroblasti, che

maturano solo alla terza settimana circa (Fox, 1965; Pageat, 1999).

Anche se gli abbozzi corticali più sviluppati corrispondono alle aree motrici (Fox, 1964), le capacità motorie del cucciolo neonato sono comunque molto limitate. Il suo unico metodo di locomozione è quello di strisciare lentamente, guidato dal termotattismo positivo, soprattutto grazie all'azione degli arti anteriori, più sviluppati di quelli posteriori (Scott e Fuller, 1965).

Infatti, gli arti anteriori acquisiscono per primi un tono sufficiente, verso il 10° giorno, mentre quelli posteriori diventano capaci di reggere il peso del corpo solo a partire dalla fine della seconda settimana (James, 1952; Pageat, 1999). Per questo motivo, in questo intervallo di tempo, il cucciolo dà l'impressione di trascinare il treno posteriore ancora non funzionante (Pageat, 1999).

La crescita è molto rapida durante le prime settimane dopo la nascita ed è massima tra la seconda e la quarta, decrescendo bruscamente dopo la sesta settimana. Il sistema nervoso del neonato non è mielinizzato (Harman, 1958; Scott e Fuller, 1965; Pageat, 1999; Houpt, 2011), ad eccezione delle zone di connessione del nervo trigemino, del nervo facciale, della porzione vestibolare del nervo auditivo e di una parte dei nervi olfattori. Queste strutture, già funzionanti, permettono al cucciolo di orientarsi nello spazio e assicurano un minimo di equilibrio (Harman, 1958; Pageat, 1999; Fox, 1964).

La mielinizzazione accompagnerà progressivamente la crescita della rete dendritica e lo sviluppo della nevroglia, ma l'assenza iniziale di mielinizzazione spiega la lentezza delle risposte del cucciolo a qualsiasi stimolazione. In effetti, la conduzione rapida è resa possibile unicamente dai nodi di Ranvier, grazie alla conduzione saltatoria. Dal momento che nemmeno il sistema neurovegetativo è mielinizzato, le funzioni escrettrici del cucciolo non saranno autonome fino alla quarta settimana di vita (Pageat, 1999).

Il midollo spinale del cucciolo neonato non è pienamente funzionale, in quanto la sua mielinizzazione non è ancora realizzata, ma progredisce rostrocaudalmente e più rapidamente a livello delle corna ventrali della sostanza grigia che di quelle dorsali. Questa differenza di evoluzione tra i due tipi di corna della sostanza grigia ha una corrispondenza funzionale; le corna ventrali contengono neuroni motori e le dorsali neuroni sensitivi, ciò spiega la maggiore precocità delle competenze motorie in rapporto a quelle sensoriali. Durante le prime due settimane, gli stimoli determinano l'avvio delle risposte corte, medullari, di tipo riflesso. A partire dal 10° giorno, la trasmissione nervosa è più efficace; la comparsa di controlli superiori che accompagna la corticalizzazione spiega la trasformazione delle risposte primarie dei neonati in risposte volontarie (Pageat, 1999; Scott e Fuller, 1965).

Durante questo periodo si notano difatti diversi riflessi che scompariranno gradualmente con lo sviluppo progressivo del sistema nervoso centrale; si può utilizzare la presenza o l' assenza di questi riflessi per determinare l' età di un cucciolo normale o per stabilire l' andamento dello sviluppo se si sospetta una patologia in un soggetto di età conosciuta (Haupt, 2011).

Per i primi 3 giorni, i cuccioli evidenziano una dominanza flessoria, cioè flettono gli arti quando vengono sollevati per la collottola; da 3 giorni fino alle 4 settimane di vita, vi è invece una dominanza estensoria, cioè il cucciolo estende gli arti quando viene sollevato; gradualmente apparirà la normotonia (Haupt, 2011)

Il riflesso di Magnus è presente per le prime due settimane di vita del neonato (Haupt, 2011; DeJong, 1956), e si evidenzia ruotando da un lato la testa del cucciolo, per cui sia gli arti anteriori che posteriori della parte in cui la testa è stata girata si estendono, mentre gli arti del lato opposto si flettono (Fox, 1964).

Per le prime due settimane si evidenzia anche il riflesso estensore crociato, che viene stimolato pinzando un arto posteriore: l' arto viene sottratto mentre il controlaterale viene esteso . Il riflesso di spinta col capo si evidenzia bene dopo che il cucciolo ha pochi giorni di vita: esso spinge in avanti il muso in una mano a coppa; questo riflesso viene utilizzato dalla madre per recuperarlo. Tutti questi riflessi suddetti persisteranno fino alle 4 settimane di vita del cucciolo (Haupt, 2011; DeJong, 1956).

I riflessi primari sono dunque circuiti transitori che permettono comportamenti innati con le seguenti caratteristiche: sono rapidi, automatici, sempre uguali come forza ed intensità e compaiono in seguito a stimoli semplici. Questi riflessi permettono al cucciolo di adattarsi rapidamente alle condizioni ambientali che trova dopo la nascita (Volokhov, 1958).

Fox (1964), riferisce che i riflessi primari presenti durante il periodo neonatale, importanti e fondamentali per la sopravvivenza del neonato sono: Il riflesso perineale, che si manifesta a seguito di una stimolazione da parte della madre della regione perineale del cucciolo e determina l' emissione di feci ed urina (che essa stessa ingerisce) da parte del neonato.

Questo è un riflesso indispensabile in assenza di autonomia neurovegetativa (Pageat, 1999).

Anche i cuccioli di ratto non sono in grado di urinare e defecare in maniera indipendente per le prime 3 settimane di vita. L' assenza di *licking anogenital* da parte della madre comporterebbe la morte del cucciolo (Brohuet-Lahlou, *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 2003).

Il riflesso labiale, per cui il cucciolo inizia a succhiare non appena le labbra incontrano il capezzolo (Fox, 1964); in questo momento non si osserva l'attaccamento del neonato ad una mammella precisa, come invece è stato descritto nel gatto (Pageat, 1999).

La sensibilità tattile è ben sviluppata e permette al cucciolo di raccogliere sufficienti informazioni circa la struttura, il rilievo e la temperatura ambientale; difatti, esiste un termotattismo positivo, utile all'orientamento ma indispensabile in particolare alla ricerca di sorgenti di calore, che sono le sole che sono capaci di stabilizzare la temperatura corporea del piccolo, essendo il neonato incapace di mantenere la sua temperatura in quanto i centri bulbari consono ancora maturi (Pageat, 1999; Fox, 1964). L'attrazione verso le sorgenti di calore permette inoltre al cucciolo di muoversi in direzione della madre e quindi ottenere il latte (Fox, 1964).

Il riflesso di ricerca del capezzolo, si verifica invece quando il neonato con l'estremità del muso tocca la madre o un altro cucciolo e il movimento si arresta e riprende poi in direzione dell'oggetto incontrato, permettendo così al cucciolo di trovare la mammella (Pageat, 1999; Fox, 1964).

Infine, il riflesso di evitamento agli stimoli nocicettivi, che comporta l'allontanamento di quella parte del corpo sottoposta a stimolazione dolorosa e che pertanto ha una funzione protettiva (Fox, 1964).

Alla nascita inoltre il senso del gusto è già ben sviluppato (Pageat, 1999; Scott e Fuller, 1965) e le risposte ai sapori elementari sono già presenti. Semplici esperienze hanno mostrato che l'applicazione di sostanze zuccherate sulla mucosa boccale provoca un movimento di suzione e deglutizione (Pageat, 1999), mentre l'applicazione di una sostanza amara (chinino) causa raggrinzimento del muso, protrusione della lingua e salivazione (Pageat, 1999; Scott e Fuller, 1965; Vastrade, 1986).

La presenza del senso dell'equilibrio è dimostrata dalla reazione del cucciolo quando viene posizionato sul dorso: comincia immediatamente a lottare per rigirarsi. Inoltre, se una parte del corpo non è sostenuta, come ad esempio sul bordo di un tavolo, comincia a guaire (Scott e Fuller, 1965).

Al contrario, per quanto riguarda il senso dell'olfatto, il neurologo Harman (1958), esaminando la mielinizzazione dei cervelli di alcuni neonati concluse che i nervi olfattori e la regione cerebrale ad essi connessa sono talmente sottosviluppati che il senso dell'olfatto non può svolgere una importante funzione (Harman, 1958; Scott e Fuller, 1965).

Scott e Fuller (1965), hanno osservato che cuccioli neonati reagiscono ad un repellente per cani con un caratteristico riflesso di evitamento, allontanando indietro la testa

appena possibile. Siccome, nell'uomo il principio attivo usato in questo esperimento (olio di citronella) lascia in bocca un retrogusto sgradevole, è quindi possibile che questa sostanza coinvolga primariamente il gusto piuttosto che l'olfatto.

Anche lo sviluppo del sistema visivo nel cane è incompleto alla nascita, come dimostrato dal fatto che appena nati i cuccioli hanno le palpebre sigillate (Fox, 1963).

Il comportamento neonatale cambierà quando i riflessi primitivi saranno soppiantati da risposte più altamente organizzate; queste risposte riflesse sono quindi in relazione ai bisogni e all'attività dell'animale in un determinato periodo del suo sviluppo. La loro presenza, persistenza, scomparsa o modificazione dipendono dal fatto che siano adatte ad un particolare ambiente (Fox, 1964).

A causa dell'imaturità dei loro sistemi neurosensoriali, si è pensato a lungo che i cuccioli neonati fossero incapaci di apprendimento associativo; in seguito, è stato dimostrato che sono in grado di imparare associazioni semplici, anche se più lentamente in confronto a cuccioli di età maggiore (Scott e Marston, 1950).

Stanley e colleghi (1963), dimostrarono in cuccioli di età inferiore ai 10 giorni, un certo grado di apprendimento in relazione alla suzione. Un cucciolo a cui viene dato latte dopo aver succhiato un capezzolo di gomma comincerà a succhiarlo più spesso rispetto a un cucciolo al quale non è mai stato presentato, mentre uno a cui è somministrato chinino al posto del latte rifiuterà del tutto il capezzolo.

Studi successivi hanno dimostrato che i cuccioli neonati potevano imparare a compiere un'associazione fra il pavimento di stoffa di una gabbia in cui erano posti ed uno stimolo aversivo costituito dal soffio d'aria che potevano interrompere spostandosi nella parte di gabbia con pavimento di plastica (Stanley *et al.*, 1968).

Questo tipo di apprendimento è anche soggetto al fenomeno di estinzione; il comportamento di evitamento tende a scomparire se il cucciolo è sottoposto ad un periodo di decondizionamento di soli 3 giorni in cui lo stimolo avverso non è più somministrato (Stanley *et al.*, 1974).

L'attività fondamentale dei cuccioli durante il periodo neonatale è rappresentata dal sonno: circa il 90% del ciclo nictemerale è costituito da sonno ed il 95% di questo da sonno paradossale. Durante il sonno paradossale, i cuccioli presentano continui movimenti della faccia, delle orecchie, delle palpebre, delle labbra, ma anche degli arti (fremiti), del tronco (aumentati dalla polipnea), e dei muscoli pellicciai. Essi sono ammassati gli uni sugli altri ed è probabile che le stimolazioni tattili che causano questi contatti giochino un ruolo nella maturazione sensoriale (Pageat, 1999; Houpt, 2011).

Il fatto che i neonati dormano ammassati potrebbe servire a prevenire la dispersione di calore; se un cucciolo viene rimosso dalla sua cucciolata si sveglierà ed uggiolerà finché non sarà rimesso con i suoi fratellini o sistemato su una superficie calda e morbida (Haupt, 2011; Fox e Stanton, 1967).

Infatti, poichè sistema di termoregolazione dei mammiferi non è pienamente funzionante alla nascita, essi sono praticamente poichilotermici e continuano ad esserlo per diversi giorni (Rogers, 1927).

Rogers (1927), dopo aver osservato che cuccioli posti su una superficie riscaldata si addormentavano immediatamente, ipotizzò che il calore giocasse un ruolo di sostituto del calore materno. Per Fredericson e colleghi (1956), il calore è una variabile essenziale nelle relazioni sociali del periodo neonatale e i contatti termici precoci sono basilari nello sviluppo dell'organismo. E' il bisogno di calore, nei mammiferi, che causa, almeno in parte, l'intimo contatto fra madre e fratelli durante il periodo precoce dello sviluppo.

Parallelamente alla crescita, la percentuale di sonno REM diminuisce dall' 85% a 7 giorni sino al 7% a 35 giorni (Haupt, 2011; Fox e Stanton, 1967).

Talvolta si osservano alcuni periodi di sonno profondo (5% dei cicli) caratterizzati da un apparente stato di riposo totale (Pageat, 1999).

Il tempo di veglia è quasi completamente occupato dalle poppate, che si presentano con cicli nictemerali abbastanza regolari, ogni 3-4 ore; esse sono sincronizzate per tutta la cucciolata, che presenta dapprima una fase di agitazione con movimenti striscianti, in direzione casuale accompagnata dall' emissione di grida. Quando l' estremità del muso tocca la madre o un' altro cucciolo, il movimento si arresta e riprende poi in direzione dell' oggetto incontrato permettendo così al cucciolo di trovare la mammella (Pageat, 1999).

Una volta che ha raggiunto la mammella il cucciolo la massaggia con le zampe anteriori con un movimento alternato, determinando l' eiezione del latte (Pageat, 1999). Il contatto tra il capezzolo e le labbra provoca la suzione, grazie al riflesso labiale (Pageat, 1999; Fox, 1964).

Il *suckling*, oltre a determinare l' emissione di latte, acqua e calorie, esercita anche dei profondi effetti sul comportamento di neonati di ratti e umani; in particolare induce una sensazione di calma, riduce la frequenza cardiaca ed il tasso metabolico ed inoltre eleva la soglia del dolore. Questi cambiamenti sono mediati da sistemi oppioidi e non oppioidi, ognuno con il proprio comportamento a parte e con proprie caratteristiche neurologiche (Blass, 1994).

Le competenze motorie del cucciolo sono ancora molto limitate, non potendosi sollevare sui propri arti ma utilizzando lo strisciare come unico mezzo di locomozione (Pageat, 1999), al contrario dei piccoli di ungulati al pascolo sono più precoci e riescono a camminare già poco dopo la nascita (Hudson e Mullord, 1977; Kendrick *et al.*, 1997; Broom e Fraser, 2007).

Quando un cucciolo si trova lontano dalla sua cucciolata presenta uno stato di agitazione molto marcato, associato all' emissione di vocalizzazioni, che cessano solo quando ritorna il contatto (Pageat, 1999); quando la madre percepisce i suoi guaiti, si dirige verso di lui e lo riporta in mezzo alla cucciolata. Queste vocalizzazioni che richiamano l'attenzione della madre costituiscono un comportamento et-epimeletico (richiesta di cure materne) (Pageat, 1999).

Per Scott e Fuller, da un punto di vista sensoriale, il cucciolo neonato è fondamentalmente un animale "tattile": risponde al contatto, al freddo e al dolore. Anche i suoi sensi chimici, per essere efficaci richiedono un contatto stretto o una brevissima distanza. Di conseguenza si può dire che il cucciolo interagisce solo con quella parte dell'ambiente che si trova in stretto contatto con lui (Scott e Fuller, 1965).

La cagna, durante le prime due settimane, passa quasi tutto il suo tempo con i cuccioli, che le si ammassano contro; sembra che questo contatto abbia un effetto di soddisfazione reciproca, infatti si costata che intorno al 14 giorno la soppressione del contatto fisico tra la madre ed i cuccioli provochi una agitazione di tutta la cucciolata. La predominanza di risposte alla stimolazione tattile è stata dimostrata da James (1952). In uno studio effettuato su 22 cuccioli durante le prime quattro settimane di vita, osservò che i cuccioli diventavano più attivi in risposta ad un'interruzione del contatto tattile con la madre o con degli oggetti.

La cagna resta passiva in genere durante le poppate, ma può anche ricondurre sotto di sé attraverso il muso un cucciolo che si è allontanato; diventa invece più attiva alla fine della poppata, quando rigira i suoi cuccioli e li pulisce, stimolando al contempo la regione perineale dei piccoli, causando l' emissione di feci ed urine che lei stessa ingerisce (Pageat, 1999).

L'im maturità del sistema neurovegetativo del cucciolo alla nascita fa sì che le funzioni escrettrici non siano autonome e che il cucciolo debba essere stimolato dalla madre (Pageat, 1999).

Ciascun cucciolo viene leccato e ciò contribuisce, variando gli stimoli, alla sua maturazione tattile; tale pulizia è seguita dal raggruppamento dei cuccioli, che di nuovo si addormentano sotto la madre (Pageat, 1999).

Il leccamento effettuato dalla madre, così come i contatti effettuati con il tartufo e con la bocca, sono anche fondamentali per la nascita del legame di attaccamento (Colangeli, 2004).

Il periodo neonatale è per la madre il momento nel quale si sviluppa pienamente l'attaccamento ai cuccioli; ciò significa che a partire da questo momento tutto ciò che limita i contatti tra la cagna ed i suoi piccoli causa uno stato di profondo disagio (Pageat, 1999).

La madre sviluppa l'attaccamento verso la sua cucciolata nelle prime 24 ore dalla nascita e questo avviene grazie alla produzione feromonale emessa dai cuccioli e dai loro annessi placentari. L'attaccamento materno è favorito anche dall'aspetto neotenico della prole (Colangeli, 2004).

Viceversa, i cuccioli cercano semplicemente un oggetto caldo, morbido e contenente del latte, e qualsiasi cagna allattante li può soddisfare; la relazione tra i cuccioli e la madre si sviluppa completamente durante il periodo di transizione (Pageat, 1999).

Al contrario Kendrick e colleghi (1997), riferiscono che negli ungulati si forma un legame individuale forte e selettivo, bidirezionale immediato tra la madre e la sua prole usualmente entro 1-2 ore dal parto.

Anche nella cagna il processo di attaccamento è un meccanismo bidirezionale, anche se l'attaccamento della prole alla madre avviene più tardivamente: la madre lo subisce nei confronti della cucciolata nelle prime 24 ore dalla nascita e questo avviene grazie alla produzione feromonale emessa dai cuccioli e dai loro annessi placentari. L'attaccamento materno è favorito anche dall'aspetto neotenico della prole (Colangeli, 2004).

Attraverso studi svolti su ratti di laboratorio, è emerso come durante la prima settimana di vita il neonato abbia un ruolo nel complesso passivo nell'instaurarsi della *relationship* tra la madre ed il piccolo stesso; il cucciolo inizia a contribuire attivamente nell'instaurarsi di questo legame a partire dalla fine della seconda settimana di vita, quando essi iniziano ad avere una migliore capacità di termoregolazione, iniziano a muoversi e sviluppano rapidamente capacità percettive (Rosenblatt e Lehrman, 1963).

### **Periodo di transizione:**

Fox (1971) e Preti e colleghi (1976), riferiscono che il periodo di transizione inizia con l'apertura degli occhi e si conclude con la comparsa dell'udito, che si rende manifesto mediante un "riflesso di trasalimento" positivo. Esso si rende manifesto piazzando il cucciolo su una superficie morbida e battendo le mani ad alcuni centimetri sopra la testa del cucciolo che si solleva sugli arti e si lascia ricadere.

L'intero processo prende meno di una settimana in quanto l'apertura completa degli occhi si ha a 13 giorni e l'apertura dei condotti uditivi avviene mediamente a 19.5 giorni di età (Scott e Fuller, 1965).

Il periodo di transizione si evidenzia dunque come l'ultima tappa di sviluppo della corteccia cerebrale (Fox, 1971; Preti *et al.*, 1976).

Si tratta dell'acquisizione degli ultimi elementi sensoriali necessari ad una vita di relazione ottimale (Pageat, 1999; Vastrade, 1986).

Gli occhi si aprono tra il 10 ed il 16 giorno, sebbene l'acuità visiva sia scarsa ed i piccoli non seguano stimoli visivi appena gli occhi si aprono (Haupt, 2011).

All'apertura degli occhi il riflesso pupillare è ancora lento ma diventa perfettamente funzionante nel giro di qualche giorno (Pageat, 1999 ; Vastrade, 1986). Infatti, sotto uno stimolo luminoso, le pupille continuano a fluttuare, indicando che il meccanismo non è ancora completamente sviluppato (Scott e Fuller, 1965),

I tracciati elettro-encefalografici della corteccia visiva di cuccioli mostrano un improvviso aumento delle onde alfa a 3 settimane ma le onde caratteristiche dell'adulto si ottengono solo dopo le 8 settimane di età (Serpell, 1995).

Infatti sia il test dell'orientamento visivo che quello del gradino visivo sono ancora negativi:

- Il test dell'orientamento visivo si effettua tenendo il cucciolo con entrambe le mani ed avvicinandolo con la testa diretta verso il basso ad una superficie orizzontale. La risposta positiva consiste nel tentativo da parte del cane di posizionare gli arti in modo da toccare la superficie. Risposte positive a questo test si ottengono tra il 20° e il 25° giorno di vita
- Il test del gradino visivo, messo a punto da Walk e Gibson (1961), viene realizzato ponendo il cucciolo su una piattaforma di vetro trasparente disposta su un gradino a scacchi. La prima parte della lastra di vetro riposa pertanto direttamente sullo scalino mentre sotto la seconda parte appare il vuoto. Testando cuccioli dall'apertura degli occhi in poi osservarono che fino a 30 giorni esso camminano indiscriminatamente da una parte e dall'altra della lastra di vetro, dopodiché avvertono la presenza del gradino e rimangono nella parte alta del gradino per paura di cadere.

Con il miglioramento della capacità visiva, i cuccioli non dondolano più la testa quando si muovono (Haupt, 2011).

A poco a poco la vista modifica il modo di orientarsi del cuccioli, il senso tattile perde la sua predominanza, con la scomparsa di numerosi riflessi primari, come il riflesso di ricerca del capezzolo o il riflesso labiale (Pageat, 1999; Fox, 1964).

Scompaiono inoltre il riflesso estensore crociato a partire dagli arti anteriori, ed il riflesso di Magnus (Haupt, 2011).

La minzione e la defecazione avvengono spontaneamente; la madre comunque continua ad ingerire gli escrementi per diverse settimane (Haupt, 2011).

Essendosi completata la mielinizzazione del sistema neurovegetativo, la stimolazione dalle zona perineale del cucciolo da parte della madre non è più necessaria per provocare l'eliminazione (Pageat, 1999).

Il ritmo di vita dei cuccioli è ora molto diverso, in particolare per quanto riguarda l'alternanza veglia-sonno; quest' ultimo è ancora molto importante, ma non occupa più del 65/70% del tempo. Anche la sua organizzazione è cambiata, dal momento che il sonno paradossale non rappresenta più del 50% del sonno totale (Pageat, 1999).

Durante i periodi di veglia, il cucciolo non si dedica più solo alla poppata, ma comincia a mostrare un comportamento esplorativo: ciò in seguito ad informazioni visive, al fiuto e al leccamento (Pageat, 1999).

A partire dalle tre settimane, il cucciolo comincia a sollevarsi sulle zampe e a camminare invece di strisciare. Acquisisce inoltre la capacità ad andare sia in avanti che indietro (Scott e Fuller, 1965).

Anche se gli occhi gli permettono di orientarsi, alcuni elementi funzionali sono ancora mancanti. Inoltre, il cucciolo è ancora sordo, ma comincia a produrre vocalizzazioni più varie, emette i suoi primi grugniti e abbaia (Pageat, 1999).

In molti mammiferi sia la madre che la prole possono vocalizzare e questo è molto importante per lo sviluppo del legame madre-neonato (Broom e Fraser, 2007).

Ad esempio, i piccoli di topo, ratto e criceto emettono almeno due tipi diversi di richiamo ultrasonico, non percepibili dall' orecchio umano, ma ovviamente percepiti dalla madre (Carlson, 2001; Noirot, 1972; Hofer e Shair, 1993).

La prima comparsa del comportamento agonistico si osserva in questo periodo: alcuni cuccioli ringhiano già a 2 settimane, se viene dato loro un osso. All'età di tre settimane diventa comune il gioco di lotta fra i piccoli che cominciano a darsi zampate e a mordersi (Scott e Fuller, 1965).

Le orecchie si aprono ed iniziano a rispondere a stimoli uditivi a 14-18 giorni, mentre a 16 giorni riescono a localizzare un suono (Haupt, 2011; Ashmead *et al.*, 1986).

Durante il periodo di transizione, si osserva un passaggio graduale all'alimentazione

dell'adulto con i cuccioli che cominciano a mostrare interesse nei confronti dell'alimento solido (Serpell, 1995).

A due settimane, il cucciolo è già in grado di leccare latte o alimento umido presentato in un piattino, anche se in modo maldestro.

Verso la fine del periodo di transizione compaiono i primi denti ed il comportamento di suzione, unico osservabile nel periodo neonatale, viene sostituito da nuove capacità di ingestione dell'alimento come il leccare e il masticare (Scott e Fuller, 1965).

Inoltre, la madre comincia a rigurgitare alimento semiliquido che costituisce un supplemento alimentare naturale e dà inizio al processo di svezzamento (Ewer, 1973; Kleiman e Eisenberg, 1973; Martins, 1949; Scott, 1950; Rheingold, 1963; Malm, 1995; Scott e Marston, 1950; Pal, 2005).

Il periodo di transizione non si limita alla sola acquisizione degli ultimi elementi sensoriali, ma rappresenta anche il momento in cui il cucciolo si attacca alla madre e comincia a subire il processo di imprinting; le nuove strutture sensoriali del cucciolo gli permettono di raccogliere nuove informazioni sulla madre, egli memorizza progressivamente la forma del corpo, gli odori, e poi le caratteristiche sonore, che gli permettono di costruirsi un'immagine specifica. L'attaccamento dei cuccioli alla madre avviene grazie allo sviluppo della parte corticale del cervello, l'attività sensoriale del cucciolo si specializza, il sistema di locomozione si perfeziona permettendo la percezione del mondo esterno, la vita di relazione e l'apprendimento (Colangeli, 2004).

Studi effettuati da Pageat (1999), sui feromoni hanno mostrato che l'attaccamento sarebbe indotto dalla produzione di feromoni da parte della madre, il DAP (*Dog Appeasing Pheromone*), ad oggi chiamato ADAPTIL, che il cucciolo riesce a percepire solo nel periodo di transizione, quando il sistema dell'organo vomeronasale di Jacobson diventa funzionale.

Da questo momento, solo quella cagna sarà l'oggetto rassicurante che potrà calmare i suoi cuccioli, punto di riferimento sicuro intorno al quale si potrà sviluppare il comportamento esplorativo (Pageat, 1999).

Ma addosso alla madre i cuccioli si possono anche addormentare l'uno sull'altro e l'attaccamento diventa dunque reciproco: ogni tentativo di impedire il contatto scatena uno stato di disagio, che si esprime con agitazione ed emissione di vocalizzazioni sia da parte della madre che dei suoi cuccioli (Pageat, 1999).

L'attaccamento sembra un corollario indispensabile al buono sviluppo del processo di imprinting. Il fenomeno di *imprintig* è stato descritto per la prima volta negli anatidi (Pageat, 1999; Lorenz, 1935).

Si tratta di un processo di apprendimento del tutto distinto dall' apprendimento associativo convenzionale; è necessario che l' animale si trovi in un periodo sensibile, che corrisponde in effetti ad un momento particolare di sviluppo del SNC, al di fuori del quale l' animale non può essere sensibilizzato (Pageat, 1999).

Le conseguenze dell' *imprinting* sono essenziali, in quanto questo tipo di apprendimento, così particolare, è all' origine dell' identificazione del simile, cioè del partner sociale e sessuale (Pageat, 1999).

Alla nascita, il cucciolo non riconosce in modo innato i membri della sua specie, per cui deve "impararlo" (Dehasse, 1993).

Lorenz (1935), riferisce dalle sue esperienze che le oche che aveva improntato, cercavano di accoppiarsi e di interagire con lui quando raggiungevano la maturità sessuale.

Fisher (1993), provò a reintrodurre un cucciolo allevato in isolamento totale e constatò la sua incapacità ad avere qualsiasi tipo di interazione con i conspecifici.

Al contrario, in un esperimento condotto da Fox (1971), cuccioli di chihuahua allevati con gatti fino alle 16 settimane di età dimostravano preferenze per i gatti e sottomissione o paura nei confronti dei cani. Però, dopo essere stati reintrodotti con altri cani a 16 settimane, recuperarono un comportamento sociale normale nel giro di 2 settimane. Sembra quindi che solamente i cuccioli che hanno potuto attaccarsi e imprintarsi, qualunque sia la specie di appartenenza dell'oggetto di attaccamento, riescono a recuperare.

La durata di questo periodo sensibile sembra estremamente variabile in funzione della specie e della sua posizione nella scala zoologica. Così, nell'anatra, l'imprinting si realizza fra la tredicesima e la sedicesima ora dopo la schiusa, mentre in alcuni mammiferi, si prolunga per diversi giorni, ma anche per mesi o anni. In effetti, esiste una grande differenza tra le specie nidifughe, come gli ungulati, e le specie nidicole, come i carnivori o i primati. Nei primi, i giovani acquisiscono molto rapidamente un'autonomia, che è associata ad un imprinting breve, del tutto analogo a quanto avviene negli uccelli, mentre nei secondi i giovani sono talmente dipendenti dalle cure materne per più settimane o mesi che subiscono un imprinting lento. Infatti, nella specie canina, che appartiene al secondo gruppo, l'imprinting è più progressivo (Pageat, 1999).

### **Periodo di socializzazione:**

Il periodo di socializzazione si tratta senza alcun dubbio del periodo più complesso della vita del cucciolo (Pageat, 1999).

Nel cane tale periodo va dalla quarta alla quattordicesima settimana di vita del cucciolo (Haupt, 2011).

Secondo Colangeli (2004), il periodo di socializzazione inizia dalla terza settimana e ha un termine molto fluttuante: dal sesto mese all'anno di vita. Questo perché in questo periodo viene inglobata anche la fase della pubertà che è variabile per sesso e razza.

E' caratterizzato dall' acquisizione di quattro elementi fondamentali: Gli autocontrolli, la comunicazione, le regole delle vita di gruppo ed il distacco (Pageat, 1999).

Per quanto riguarda l' acquisizione degli autocontrolli, si può considerare che alla fine dei primi tre periodi di sviluppo il cucciolo funzioni essenzialmente secondo lo schema stimolo-risposta; ciò significa che qualunque stimolo di intensità sufficiente determina un' azione (Pageat, 1999).

Si tratta di una modalità molto primitiva, che non permette di aggiustare la risposta in funzione delle reazioni dell' ambiente, cioè delle modificazioni subite dallo stimolo. All' inizio del periodo di socializzazione il cucciolo risponde a qualsiasi stimolo producendo risposte uniche, di durata ed intensità condizionate solo dalle reazioni emozionali scatenate (Pageat, 1999).

La sola regola riguarda la soglia di intensità degli stimoli tattili capaci di indurre una risposta. In effetti, il sistema sensoriale funziona già dal periodo neonatale, l' omeostasi sensoriale tattile si avvia con l' inizio della socializzazione, di conseguenza il cucciolo reagirà solo a stimoli tattili di intensità superiore alla soglia prestabilita ed ignorerà gli altri (Pageat, 1999).

L'omeostasi sensoriale è un equilibrio che si instaura durante lo sviluppo tra un organismo e l'ambiente circostante, e porta all' assenza di risposta emotiva al di sotto del livello di stimolazione media dell'ambiente. La soglia di reazione si stabilisce durante lo sviluppo del sistema nervoso e dipende quindi da una corretta stimolazione sensoriale, che faciliterà l'adattamento della risposta emozionale, e conseguentemente un adattamento della risposta motoria con la messa in funzione dei retrocontrolli motori (Colangeli, 2004).

I giochi, l' esplorazione intorno al luogo di nascita o del corpo della madre consentono ai cuccioli di sviluppare risposte comportamentali organizzate secondo una sequenza regolare (Pageat, 1999).

L' unità funzionale dei comportamenti è l' azione; le azioni vengono associate e articolate per comporre la struttura funzionale elaborata, cioè la sequenza comportamentale. All' interno della sequenza del comportamento, le azioni possono essere eseguite più o meno rapidamente, ripetute con maggiore o minore frequenza o

secondo un ritmo più o meno preciso. Lo stimolo iniziale (S0), viene modificato a partire dall' esecuzione della prima azione nella sequenza, subendo così successive trasformazioni dopo ogni azione; dal punto di vista funzionale si può dire che uno stimolo scatenante sia in effetti percepito attraverso una serie di modificazioni, che accompagnano la trasformazione di questa situazione scatenante da parte dell' animale che reagisce (Pageat, 1999; Truc e Gervet, 1974; Truc e Gervet, 1978).

Quando il cucciolo apprende una nuova sequenza comportamentale, possiamo affermare che tale sequenza sarà incrementata nella memoria sotto questa forma strutturale; l' elaborazione e la memorizzazione di questa struttura coinvolgono direttamente le componenti cognitive dell' animale, cioè le sue capacità di associazione e di organizzazione delle informazioni sensoriali (Pageat, 1999).

L' organizzazione sequenziale implica anche l' esistenza di una fase di arresto, che contrassegna il completamento della sua realizzazione; il suo ruolo è facilmente comprensibile, poiché in sua assenza l' animale continuerebbe a produrre una catena di azioni senza fine, senza interrompersi volontariamente. L' acquisizione del segnale di arresto sembra essere uno degli avvenimenti principali del periodo di socializzazione (Pageat, 1999).

Una delle illustrazioni di questo processo è senza alcun dubbio l' acquisizione dell' inibizione del morso (Pageat, 1999; Vastrade, 1986).

Verso le 5 settimane, i cuccioli iniziano a giocare tra loro, ringhiando e mordendosi; se il cucciolo morsicato grida, quello che ha inflitto il morso interrompe la sequenza della lotta (Pageat, 1999)

Un comportamento che si verifica durante il periodo di socializzazione è quello allelomimetico, che è un comportamento contagioso che influenza un altro individuo a comportarsi nello stesso modo. Mentre all' inizio i cuccioli sono abbastanza indipendenti nelle loro attività, fra la terza e la quarta settimana, cominciano a seguirsi e, verso le 5 settimane, si muovono in gruppo. All' età di 7 settimane, cominciano attraverso il gioco a lottare fra loro formando dei gruppi d' attacco (Scott e Fuller, 1965).

Per quanto concerne l' acquisizione di sistemi di comunicazione, questa è una necessità assoluta per tutte le specie animali ed in particolare per le specie sociali (Pageat, 1999)

Ogni tipo di comunicazione presuppone l' emissione di segnali che stimolano un sistema sensoriale dell' individuo ricevente (vista, tatto, olfatto e udito). Il cucciolo durante il periodo di socializzazione apprende a comunicare utilizzando i diversi canali, per esempio si parlerà di canale visivo per definire quei segnali che sono percepiti dagli occhi ecc. (Pageat, 1999)

Il periodo di socializzazione è segnato da una diminuzione delle vocalizzazioni che sembra sincrona allo sviluppo del canale visivo e quindi all'aumento delle capacità di postura e di mimica.

Durante il periodo di socializzazione, il cucciolo apprende le posture e le mimiche che corrispondono ad un codice (Colangeli, 2004).

Gaultier (2000), riferisce che esse sono eseguite secondo uno schema fisso, la cui ripetizione e strutturazione viene a costituire sequenze comportamentali chiamate rituali, che permettono agli animali di perfezionare la comunicazione all'interno del gruppo. Tra queste si ha: la postura di dominanza, la postura di minaccia, la postura di combattimento, la postura di appagamento, la postura di sottomissione e la postura di gioco.

Per quanto concerne il distacco, questo è un avvenimento determinante nella socializzazione dei cuccioli che coinvolgerebbe diversi meccanismi ormonali, affettivi e cognitivi (Colangeli, 2004).

In natura la madre inizia il distacco (rottura del legame di attaccamento primario) a partire dal periodo in cui erompono i denti: la poppata è dolorosa la cagna comincia a rifiutare i cuccioli. Successivamente, le modificazioni fenotipiche, che esitano nella perdita delle caratteristiche infantili, provocano una drastica riduzione delle cure materne (Colangeli, 2004).

Anche nei primati non umani è presente una fase detta "di separazione" che, come implica il nome, è caratterizzata dal termine graduale del contatto fisico tra la madre ed il cucciolo. In natura la madre può attivamente proteggere il piccolo in caso di emergenza anche dopo la separazione fisica da esso, il che suggerisce un ritardo temporale tra la quasi completa separazione fisica e la completa separazione psicologica dal piccolo. In natura, la separazione fisica tra la madre Rhesus ed il suo piccolo prende posto al momento in cui la madre partorisce un nuovo cucciolo, generalmente un anno dopo la nascita del precedente; nonostante ciò il piccolo allontanato viene osservato stare nelle vicinanze della madre per un periodo addizionale di tempo prima che la separazione psicologica diventi completa (Harlow *et al.*, 1963).

Durante il periodo di socializzazione nel cane inoltre inizia lo svezzamento. Si tratta di un processo graduale che inizia tra la terza e la quarta settimana di vita: la cagna si allontana più spesso e più a lungo dai cuccioli, e rigurgita alimento quando torna al nido. Verso le 5 settimane la madre non permette più facilmente ai cuccioli di avvicinarsi alla mammelle in quanto i loro denti appuntiti provocano dolore durante la poppata. Lo svezzamento ha un termine abbastanza variabile in quanto alcune cagne

smettono di produrre latte già dopo 7 settimane dalla nascita dei piccoli, mentre altre ne producono fino a 10 settimane (Scott e Fuller, 1965).

Lo svezzamento nei giovani di ratto inizia più o meno come nel cane intorno alla terza-quarta settimana dopo il parto; difatti, alla fine della terza settimana il *suckling* diminuisce nel momento in cui il cucciolo inizia a cibarsi con altre fonti di cibo; la disponibilità di cibo gioca dunque un ruolo determinante nella rapidità con cui lo svezzamento procede e si sviluppa un tipo di *feeling* indipendente (Rosenblatt e Lehrman, 1963; Schneirla, 1961).

Anche il comportamento eliminatorio subisce delle modifiche durante questo periodo; difatti il cucciolo lascia il nido per urinare e defecare. All'inizio l'eliminazione avviene in qualsiasi posto, ma verso le 8 settimane e mezzo il cucciolo identifica un luogo particolare per l'eliminazione (Ross, 1950) che, in molti casi, viene scelto il più lontano possibile dall'area di alimentazione (Scott e Fuller, 1965)

### **Periodo giovanile:**

Durante il periodo giovanile il cane aumenta di taglia e perfeziona i suoi moduli comportamentali. I cuccioli cominciano a mostrare un comportamento sessuale intorno ai 4-6 mesi, quando mostrano un'attenzione maggiore per le cagne in estro piuttosto che verso quelle sterilizzate. Questa attrazione aumenta con l'età fino ai 2 anni, età in cui i cani sono completamente maturi (Haupt, 2011; Beach *et al.*, 1983).

### **-2-3: Influenza di esperienze precoci sul comportamento del cucciolo:**

Il sistema nervoso centrale dell'adulto è dotato di connessioni specifiche attraverso le quali vengono percepite e analizzate informazioni sensoriali secondo schemi coerenti di attività che stanno alla base dei comportamenti. Tuttavia, alla nascita queste connessioni non sono complete, in quanto il tipo di connessioni che vengono stabilite nel corso dello sviluppo prenatale, si avvicina solo per approssimazione a quello definitivo. Queste connessioni approssimative vengono rese successivamente più precise mediante meccanismi dipendenti dall'attività neuronale, attraverso i quali i neuroni presinaptici si adeguano con accuratezza alle cellule bersaglio appropriate. Questo processo di adeguamento dipendente dall'attività neuronale può essere modulato da esperienze sensoriali normali o patologiche; perciò, in certe fasi critiche dello sviluppo post-natale l'azione integrativa del sistema nervoso centrale e, a livello cellulare, l'organizzazione delle connessioni cerebrali specifiche dipendono da interazioni particolari tra

l'organismo e l'ambiente in cui vive. Questa influenza dell'ambiente sul sistema nervoso centrale e, di conseguenza, sul comportamento, varia con l'età. In generale, le esperienze ambientali hanno effetti più profondi nelle fasi più precoci dello sviluppo postnatale che nell'età adulta. Più precoce è la stimolazione, maggiore è l'effetto (Thompson e Schaefer, 1961).

L'SNC di un animale sviluppa le proprie funzioni geneticamente predeterminate se esposto quindi ai giusti stimoli ambientali, specialmente nel primo periodo di vita. Un ambiente poco stimolante nel primo periodo di vita comporta lo sviluppo di un animale con percezioni sensoriali anormali. L'animale può non essere in grado di percepire gli stimoli a cui non è stato sottoposto durante lo sviluppo. Un animale costretto in un ambiente ristretto sarà anche emozionalmente instabile e con ridotte capacità di apprendimento e di addestramento (Luescher, 2011; Chapillon *et al.*, 2002).

L'arricchimento ambientale e le manipolazioni post-natali hanno dimostrato di indurre effetti benefici simili che perdurano per tutta la vita dell'individuo. Infatti, entrambi queste stimolazioni sembrano aumentare l'attività e il comportamento esploratorio, ridurre l'emozionabilità, la paura e gli stati ansiosi nell'adulto (Fernandez-Teruel *et al.*, 2002).

Klein e colleghi (1994), hanno dimostrato che ratti allevati in un ambiente arricchito e messi in presenza di un gatto mostrano una chiara diminuzione delle risposte difensive e sono in grado di mettere in atto strategie per fare fronte alla situazione con maggiore rapidità e facilità.

Levine Alpert e Lewis (1969), notarono che gli animali manipolati da neonati mostravano una più precoce maturazione della risposta adrenocorticale allo stress. Questi risultati furono interpretati come indicatori del fatto che l'ambiente del laboratorio non forniva una sufficiente stimolazione per il corretto sviluppo del sistema ormonale degli animali; Ritcher (1970), attraverso i suoi studi evidenziò che in effetti i topi di laboratorio presentavano un deficit nella loro risposta cortico-surrenale rispetto alla varietà selvatica.

Studi effettuati da Melzack (1954), su cani allevati in un ambiente privo di stimolazioni sensoriali hanno mostrato che gli animali diventano anormalmente ipereccitabili quando esposti a situazioni nuove. Anche dopo un anno dalla loro reintegrazione in un ambiente normale, i tracciati encefalografici di tali soggetti indicavano un'estrema eccitazione.

Gli esperimenti effettuati allo scopo di determinare quali fossero gli effetti delle esperienze precoci cominciarono con Levine (1956), che osservò che topi manipolati nella prima settimana o i primi dieci giorni di vita avevano una minore tendenza ad

urinare e defecare in una situazione sconosciuta, imparavano i comportamenti di evitamento più rapidamente e sopravvivevano più a lungo se privati di acqua e di alimento, rispetto ai topi non sottoposti a tale trattamento. Arrivò alla conclusione che la stimolazione precoce rendeva gli animali meno timorosi, più resistenti e con una maggiore capacità di apprendimento, nonché con ridotta inclinazione alla neofobia e una ridotta avversione condizionata (Levine, 1956; Weinberg *et al.*, 1978).

Denenberg (1964), effettuò delle ricerche su ratti di laboratorio che consistevano nel rimuovere il piccolo dalla madre per brevi periodi di tempo (2-3 minuti) durante i quali l'animale riceveva stimolazioni tattili da parte dello sperimentatore che lo trasportava da una gabbia all'altra, lo pesava o lo posizionava su substrati diversi. In seguito, i cuccioli venivano riportati dalla madre. Questo trattamento era ripetuto ogni giorno per tutto il periodo che precedeva lo svezzamento; Denenberg evidenziò che questo tipo di esperienza produceva animali psicologicamente superiori che resistevano meglio a stress fisici, erano meno suscettibili a disturbi emozionali e si potevano adattare meglio a situazioni nuove.

Gli animali manipolati precocemente risultano inoltre più docili da manipolare in seguito in quanto esibiscono una minore reattività emozionale quando vengono catturati (Fernandez-Teruel *et al.*, 1991; Merlo *et al.*, 1999).

Field (1998), riportò attraverso studi effettuati sui ratti gli effetti benefici della stimolazione tattile precoce, che risultavano in un aumento di peso ed un incremento di sviluppo dei piccoli nati prematuri.

Studi condotti sui suini hanno dimostrato come carezze applicate ai neonati rendono l'animale meno pauroso di fronte ad uno sperimentatore umano (Hemsworth *et al.*, 1986; Hemsworth e Barnett, 1992).

Wilson e colleghi (1986), riportano che le manipolazioni neonatali sono in grado inoltre di migliorare le capacità mnemoniche e di apprendimento nei giovani animali attraverso un incremento del potenziamento a lungo termine delle sinapsi a livello ippocampale.

Alcuni anni fa, Levine (1957), Haltmeyer e colleghi (1966), Liu e colleghi (1997), mostrarono che lo sviluppo della risposta dell'HPA allo stress è modificato da precoci stimoli ambientali inclusa la stimolazione infantile (*handling*). Da adulti gli animali sottoposti giornalmente a brevi periodi di manipolazione nelle prime settimane di vita mostrano una minor risposta dell'ACTH e dell'adrenal corticosterone (il principale glucocorticoide nei ratti) allo stress rispetto ad animali non manipolati (Levine, 1957; Meaney *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Cirulli, 2003; Coutellier *et al.*, 2007).

Queste differenze sono apparse dai 24 ai 26 mesi di vita, indicando che gli effetti della

manipolazione precoce sulla funzione dell'HPA persistono per tutta la vita (Meaney *et al.*, 1988; Meaney *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997).

Questi risultati sono legati al fatto che i glucocorticoidi agiscono su diversi siti neurali esercitando un effetto inibitorio attraverso un feed-back negativo sulla sintesi dei fattori di rilascio ipotalamici dell'ACTH, in particolare l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) e la vasopressina (AVP) (Liu *et al.*, 1997). I ratti manipolati in fase post-natale mostrano una maggiore sensibilità ai feedback negativi dei glucocorticoidi rispetto ai ratti non manipolati (Meaney e colleghi, 1989; Liu *et al.*, 1997) e quindi una minore espressione del CRH ipotalamico e dell'mRNA della vasopressina, così come mostrano anche più bassi livelli di immunoreattività sia di CRH che di vasopressina (Plotsky e Meaney, 1993; Liu *et al.*, 1997).

Gli effetti della manipolazione sulla sensibilità al feed-back è mediato da un aumento dell'espressione dei recettori dei glucocorticoidi (GR) nell'ippocampo (O' Donnell *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997), una regione che è strettamente correlata alla regolazione dei feedback negativi dei glucocorticoidi (Jacobson e Sapolsky, 1991; Liu *et al.*, 1997).

L'aumento dell'espressione del gene GR nell'ippocampo è di conseguenza al centro degli effetti della manipolazione sulla risposta dell'HPA allo stress, risultando in un aumento del feed-back inibitorio della sintesi del CRH e della vasopressina e sintesi dell'AVP e riduzione del rilascio di ACTH ipofisario in corso di stress (Liu *et al.*, 1997). Studi condotti su cani hanno dimostrato che alcuni livelli di stress (ad esempio la manipolazione o una bassa temperatura) nel periodo neonatale del cucciolo possono dunque accelerare la crescita, ridurre l'emozionalità più tardi nella vita, accrescere lo status sociale, l'apprendimento, l'addestrabilità e promuovere la resistenza ad alcune malattie. Le sessioni di manipolazione dal primo giorno di vita sono raccomandate perché non solo espongono il cucciolo a un basso livello di stress, ma facilitano anche la socializzazione quando il cucciolo si accresce. In aggiunta alla manipolazione, il cucciolo può essere rimosso dalla cassa parto e essere appoggiato su una superficie fresca per un breve periodo (30 secondi) prima di essere riportato nel calore della cucciolata. Anche luci intermittenti, rumori e movimenti possono essere utilizzati per creare un leggero stress (Leuschner, 2011).

Anche Fox (1972), ha dimostrato come animali come il topo ed il ratto abbiano mostrato i benefici di una stimolazione precoce; difatti, diversi studi mostrano che la rimozione del piccolo dal nido per 3 minuti nei primi 5-10 giorni di vita causa un abbassamento della temperatura corporea al di sotto del normale. Questa leggera forma di stress è sufficiente a stimolare il sistema HPA (Fox, 1972). Quando testati da adulti,

gli stessi animali risultavano più capaci di affrontare lo stress rispetto ai componenti della stessa cucciolata non sottoposti a stress precoce. I primi infatti rispondevano in maniera graduata mentre i secondi avevano una reazione da “tutto o niente”. I risultati mostrano che la stimolazione precoce può avere effetti positivi ma deve essere utilizzata con attenzione (Fox, 1972; Battaglia, 2009).

La tolleranza allo stress può variare da individuo a individuo (Battaglia, 2009).

Newell (1967), riporta attraverso i suoi studi sulla manipolazione precoce nel periodo peri-natale e post-natale, che ci sono differenti effetti nello sviluppo di animali appartenenti a specie o background genetico diversi.

Freeman (1958), riferisce che ci sono differenze anche fra le varie razze e che esistono periodi sensibili in cui uno stimolo ha un effetto maggiore; Denenberg (1964), e Denenberg e Kline (1964), riportano risultati simili attraverso studi su roditori ; Schaefer (1963), utilizzando i ratti e Fox (1972,) utilizzando cuccioli di cane riportano anch' essi risultati simili rispetto agli studi condotti da Freeman nel 1958.

Allo stesso tempo, troppo stress può risultare in avversità patologiche piuttosto che in superiorità fisiologica o psicologica (Denenberg , 1964).

Alcuni studi suggeriscono che sia l'eccessiva stimolazione sensoriale sia la mancanza di stimolazione appropriata in ratti neonati portano a cambiamenti permanenti del comportamento del ratto adulto, ad alterazioni delle risposte ormonali e immunitarie allo stress, associati ad un'alterata espressione dei neurotrasmettitori e dei loro recettori, e/o ad altri meccanismi cellulari (Anand e Scalzo, 2000).

Lo stress cronico è causato da condizioni avverse inevitabili e prolungate. A causa della loro inevitabilità la reazione allo stress non risulta nel superamento dello stesso ma nell'esaurimento delle energie dell'animale. Una forte reazione ad uno stress acuto è in ogni caso desiderabile, in quanto se un animale viene esposto ad uno stimolo improvviso intenso e potenzialmente pericoloso questa potrebbe salvargli la vita mettendo in moto tutte le sue risorse. Quindi una ridotta reazione a stress cronici e una maggiore reazione a stress acuti sono di beneficio all'animale (Leuscher, 2011).

Lo stress durante il periodo prenatale può avere drammatici effetti di ritardo sullo sviluppo del cucciolo (Chapillon *et al.*, 2001).

Studi hanno mostrato difatti che lo stress cronico prenatale induce modifiche a lungo termine dell'asse HPA (Fride e Weinstock, 1984; Henry *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1999), alterazioni fisiologiche e dello sviluppo (Guo *et al.*, 1993), turbamento comportamentale e cognitivo (Batuev *et al.*, 1996; Lordi *et al.*, 2000; Chapillon *et al.*, 2001) nella cucciolata.

Anche se i GC sono ormoni fondamentali nella risposta a stress fisici acuti, una loro eccessiva secrezione, come quella che avviene durante lo stress cronico, può causare a livello del sistema nervoso numerosi effetti deleteri; questi comprendono fenomeni di neurotossicità, inibizione della neurogenesi, alterazione della plasticità neuronale (Sapolsky, 1999). Infatti, è stato dimostrato che l'esposizione cronica ad alti livelli di GC risulta in una perdita di cellule ipocampali e in conseguenti deficit di apprendimento e di memoria (Lupien e Meaney, 1998)

Animali sottoposti ad esperienze dolorose ripetute nei primi 7 giorni di vita mostrano, da adulti, uno stato di ipervigilanza, un comportamento d'evitamento difensivo aumentato e una maggiore aggressività. Inoltre, questi animali presentano una diminuita attività neuronale nella corteccia somatosensoriale in seguito ad esposizione al caldo rispetto a ratti che hanno ricevuto stimolazioni tattili da neonati (Anand e Scalzo, 2000); altri studi condotti dagli stessi autori dimostrano che l'esposizione ad un dolore prolungato (iniezioni ripetute di formalina durante il periodo neonatale) è associato a perdita di peso, diminuzione della sensibilità dolorifica e dell'attività motoria nell'adulto. Questi risultati suggeriscono che il dolore nel neonato porta ad un'aumentata espressione dei recettori per gli oppioidi nell'adulto che è responsabile della diminuita sensibilità dolorifica.

A confermare questi dati, studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che una terapia oppioidea nella madre durante il parto riduceva il rischio di suicidio in età adulta o adolescenziale probabilmente rendendo i bambini meno sensibili agli interventi dolorosi alla nascita (Anand e Scalzo, 2000).

Le tipiche pratiche di allevamento espongono la maggior parte degli animali in cattività alla privazione materna attraverso una separazione precoce oppure a cure materne non adeguate (Latham e Mason, 2007).

La separazione prima del tempo dalla madre può portare ad una immediata emergenza di comportamenti stereotipati immediati, come ad esempio il *belly-nosing* nel porcellino, oppure a comportamenti che emergono diversi mesi più tardi come il camminare avanti e indietro nei visoni e il beccare le piume nei polli. Alcuni di questi comportamenti sono in genere transitori come il *belly-nosing* nel porcellino, mentre altri permangono in età adulta come ad esempio il mordere le sbarre nei topi da laboratorio (Latham e Mason, 2007).

La privazione materna può produrre cambiamenti nel temperamento o nella risposta allo stress che influenzano la risposta comportamentale allo stress per tutta la vita dell'animale oppure può determinare cambiamenti neurali che rendono l'animale incline a

comportamenti ripetitivi inappropriati (Cirulli *et al.*, 2003; Latham e Mason, 2007); è evidente che la serie di cambiamenti che occorrono durante lo svezzamento influenzano il comportamento stereotipato successivo (Latham e Mason, 2007).

Gli effetti della deprivazione materna dipendono sia dall'età del neonato che dal tempo di separazione dalla madre (Van Oers *et al.*, 1998).

Nei primati sia umani che non umani, una completa deprivazione della madre o un abbandono da parte della stessa, determina un incremento della responsività allo stress, danneggia l'abilità cognitiva e riduce il comportamento sociale (Arling e Arlow, 1967; Carlson e Earls, 1997; Glaser, 2000; Champagne, 2007).

Studi condotti da Hsu e Serpell (2003), su cani hanno dimostrato che i cuccioli che venivano separati precocemente dalle loro madri e reinseriti con questa a sei settimane di età, mostravano una risposta iperstressata, un comportamento non sociale ed una aggressività eccessiva. Dunque la separazione di cuccioli di cane dalla propria madre in età precoce incrementa le possibilità di sviluppare un comportamento problematico da adulto (Mogi *et al.*, 2011). Questi risultati sono in accordo con precedenti studi effettuati sempre su cani da parte di Slabbert e Rasa (1993), i quali riscontrarono anche una maggiore insorgenza di malattie e un tasso di mortalità più elevato in quei cuccioli separati precocemente dalle loro madri.

La separazione dei cuccioli dalla madre è conosciuta per avere una grande varietà di effetti biologici nei mammiferi (Coe *et al.*, 1985) e il dato saliente che emerge dai numerosi studi che l'hanno utilizzato come modello sperimentale è che essa induce effetti radicalmente diversi a seconda della durata del trattamento.

Secondo Anand e Scalzo (2000), Caldji e colleghi (2000), Liu e colleghi (2000b), Mogi e colleghi

(2011), gli effetti negativi persistenti della separazione materna giungono quando si supera la soglia giornaliera di 180 minuti nel ratto.

In questo caso si ottengono alterazioni del rilascio dei neurotrasmettitori e sviluppo di esagerate risposte ormonali. Infatti, nell'adulto i livelli plasmatici di corticosterone sia basali che stress-indotti sono molto elevati (Levine *et al.*, 1992; Biagini *et al.*, 1998; Van Oers *et al.*, 1998) e l'efficienza del feed-back negativo operato dai glucocorticoidi è notevolmente diminuita (Biagini *et al.*, 1998; Francis e Meaney, 1999; ). Queste alterazioni sono associate ad accentuazione delle risposte di stress, ad aumentata vulnerabilità ai disturbi ansiosi e agli effetti nocivi dello stress, neofobia, precoce insorgenza di diabete, ipertensione, deficit cognitivi e minor speranza di vita (Anand e Scalzo, 2000).

Precedenti studi hanno dimostrato che la separazione postnatale (MS) può produrre anomalie a lungo tempo nel comportamento emotivo e nella risposta neuroendocrina allo stress nei roditori (De Wilde *et al.*, 1992; Kendler *et al.*, 1995; Dube *et al.*, 2001; Heim e Nemeroff, 2001; Jonson *et al.*, 2002; Millstein e Holmes, 2007).

Studi condotti da Millstein e Homes (2007), hanno esaminato gli effetti di ripetute MS nei topi per 180 minuti al giorno (MS) ; in tutti i ceppi l'MS produceva un aumento delle cure materne nel momento in cui i cuccioli venivano riuniti con la madre, che potrebbero modificare gli effetti dell'MS stessa. I dati dimostrano che le procedure di MS utilizzate non forniscono un valido modello di effetti di stress di vita precoce sui comportamenti legati all'ansia e alla depressione nei vari ceppi di topi testati.

Studi condotti da altri autori hanno dimostrato che la separazione di cuccioli dalla madre e dal nido per più di tre ore al giorno durante le prime due settimane di vita producono un aumento di comportamenti ansiosi e tendenti alla depressione ed una esagerata risposta dell'HPA allo stress nell'adulto (Levine, 2000; Meaney, 2001; Pryce e Feldon, 2003; De Kloet *et al.*, 2005; Millstein e Holmes, 2007).

In ogni caso non tutti gli studi hanno riscontrato effetti di MS sui comportamenti relativi all'emotività (Lehmann e Feldon, 2000). Questa variabilità può essere in parte legata alle differenze metodologiche ma anche alle modifiche legate all'influenza dei fattori genetici (Neumann *et al.*, 2005; Millstein e Holmes, 2007).

Secondo Brodsky e colleghi (2001), Friedman e colleghi (2002), Matza e colleghi (2003), McHolm e colleghi (2003), Millstein e Holmes (2007), individui con una storia di trauma infantile mostrano un carattere più severo e una sintomatologia di ansia maggiore e risultano inclini ad avere disordini sia di tipo neuropsichiatrico che somatico. Carrion e colleghi (2001), Teicher e colleghi (2003), Mathew e colleghi (2004), riferiscono che i traumi infantili sono associati con anomalie strutturali e funzionali nelle regioni del cervello che mediano le emozioni come l'ippocampo, l'amigdala e la corteccia prefrontale.

Per spiegare la relazione esistente tra la funzione del genitore e lo stato di salute nel figlio adulto, Repetti e colleghi (2002), hanno proposto uno *stress-diathesis models*; questo modello suggerisce che una riduzione qualitativa delle cure parentali, altera lo sviluppo del sistema neurale ed endocrino, aumentando la grandezza delle risposte emozionali, autonome ed endocrine allo stress, predisponendo così gli individui a disturbi.

L'interazione sociale tra la madre ed i cuccioli durante l'allevamento ha un effetto significativo sul loro sviluppo comportamentale (Scott e Fuller, 1965; Willson *et al.*,

1986; Champagne, 2007; Masis-Calvo *et al.*, 2013; Sequeira-Cordero, 2013).

Il ruolo delle cure materne nel mediare le variazioni del fenotipo della prole è stato esaminato nei ratti e dimostra che l'interazione madre-cucciolo è fondamentale per indurre cambiamenti comportamentali a lungo termine. L'abilità di trasferire epigeneticamente il fenotipo in risposta a stimoli ambientali precoci produce un meccanismo dinamico per reagire alle modifiche delle condizioni ambientali che conferirebbe un vantaggio di adattamento a ceppi geneticamente divergenti (Champagne *et al.*, 2007).

Nei mammiferi neonati, la madre è la sorgente e il modulatore più importante di stimolazioni (Hofer, 1984) e rappresenta il primo legame fra l'ambiente e il neonato (Francis *et al.*, 1999). E' stato proposto che la regolazione esterna operata dalla madre sullo sviluppo dei sistemi emozionali ancora immaturi del neonato durante particolari periodi critici rappresenta il fattore essenziale che influenza la crescita "esperienza-dipendente" di alcune aree cerebrali, in particolare delle strutture corticolimbiche e subcorticolimbiche, che autoregolano gli stati emozionali (Schoore, 1994).

Questo appare in particolare per quanto riguarda le stimolazioni tattili. In modo naturale la madre effettua una continua stimolazione tattile dei cuccioli attraverso il leccamento, il recupero dei piccoli e l'allattamento; questa attività materna mantiene i livelli di attività dei cuccioli entro certi valori che, in sua assenza, subiscono un notevole aumento. Diversi studi hanno dimostrato che le differenze individuali delle risposte endocrine e comportamentali allo stress sono legate a variazioni delle cure materne durante i primi giorni di vita; infatti, da adulti, i figli di madri che attuano bassi livelli di *licking* e *grooming* alla prole mostrano una maggiore risposta dell'asse HPA in seguito a stimoli stressanti rispetto ai figli di madri che effettuano molte cure parentali (Caldji *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Champagne *et al.*, 2003; Cirulli *et al.*, 2003).

Studi condotti da Caldji e colleghi (1998), riportano che le femmine di ratto con cuccioli mostrano differenze individuali nella frequenza di *licking/grooming* e *arched-back nursing* (LG-ABN) che contribuiscono allo sviluppo di differenze individuali nella risposta comportamentale allo stress dei piccoli; da adulti i cuccioli di madri che mostravano un alto livello di LG-ABN hanno mostrato un comportamento di paura sostanzialmente inferiore in risposta ad una novità, rispetto ai cuccioli di madri con bassi livelli di LG-ABN e una significativamente maggiore densità di recettori centrali delle benzodiazepine nei nuclei centrali, laterali e basolaterali dell'amigdala e nel locus ceruleus, così come un aumento della densità dei adrenorecettori alfa2 nel locus ceruleus e una diminuzione della densità dei recettori del CRH sempre all'interno del

locus ceruleus. Questi studi dimostrano che le cure materne durante l'infanzia servono a "programmare" la risposta comportamentale allo stress nei cuccioli alterando lo sviluppo del sistema neurale che modula la paura.

Nel ratto le variazioni che occorrono naturalmente nella frequenza di *licking/grooming* (LG) da parte della madre nella prima settimana di vita del cucciolo sono associate dunque alle differenti risposte allo stress, all'emotività e alle funzioni cognitive della prole adulta. Da adulti, cuccioli con bassi livelli di LG, mostrano una maggiore risposta HPA allo stress (Liu *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2004; Champagne *et al.*, 2008), maggiore emotività (Caldji *et al.*, 1998; Menard e Hakvoort, 2007; Champagne *et al.*, 2008) e una minore performance nei test sull'apprendimento spaziale e riconoscimento degli oggetti (Bredy *et al.*, 2003, 2004; Toki *et al.*, 2007; Champagne *et al.*, 2008). Questi effetti sono essenzialmente invertiti con esperimenti di cross-fostering, suggerendo un effetto diretto delle cure materne (Francis *et al.*, 1999; Caldji *et al.*, 2003; Champagne *et al.*, 2008).

Vari studi hanno proposto che gli effetti della manipolazione post-natale sono mediati da cambiamenti delle interazioni fra madre e cucciolo; in particolare è stato evidenziato che la manipolazione del cucciolo altera il comportamento della madre e che le differenze nelle interazioni madre-cucciolo mediano gli effetti della manipolazione sullo sviluppo endocrino e sulla risposta agli stress (Thoman e Levine, 1968; Liu *et al.*, 1997). L'importanza della risposta della HPA allo stress nell'animale adulto è strettamente correlato con il *licking* e il *grooming* materni. Queste scoperte supportano le ipotesi per cui l'effetto delle manipolazioni post-natale sullo sviluppo dell'HPA è mediato dall'interazione fra madre e cucciolo (Liu *et al.*, 1997; Cirulli *et al.*, 2003).

Studi su distinti ceppi di ratti hanno dimostrato che le naturali variazioni del *licking/grooming* materni osservati durante la prima settimana post-partum ha un profondo impatto sull'espressione del gene e sul fenotipo comportamentale della prole ed è associato a modifiche epigenetiche dei geni coinvolti nella risposta allo stress e nel comportamento riproduttivo (Champagne *et al.*, 2007).

Sembra quindi che la stimolazione tattile operata dalla madre abbia la funzione di promuovere la crescita e lo sviluppo in quanto, regolando l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale, protegge i piccoli dagli effetti catabolici degli ormoni dello stress (Francis *et al.*, 1999), e accelera il rilascio di ormone della crescita (Schanberg *et al.*, 1984).

Numerosi studi hanno dimostrato che i fattori materni esercitano un forte effetto inibitorio sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale del neonato. Questo può essere

dimostrato rimuovendo la sorgente di regolazione: in seguito a separazione materna prolungata, il neonato mostra un aumento marcato della risposta delle ghiandole surrenali all'ACTH (Kuhn *et al.*, 1990).

E' stato ipotizzato che il contatto materno da solo, cioè non accompagnato da allattamento, non è in grado di indurre un'inibizione dell'asse HPA del piccolo (Cirulli *et al.*, 1992). Quindi l'aspetto importante dell'interazione madre-neonato sembrerebbe derivare dall'alimentazione. Una delle ipotesi proposte per spiegare l'SHRP è che piccoli quantitativi di corticosterone trasferiti dalla madre al neonato attraverso il latte, causerebbero un incremento del feed-back negativo portando alla soppressione del rilascio di ACTH (Sapolsky e Meaney, 1986). Ulteriori studi effettuati su femmine surrenalectomizzate hanno dimostrato che il corticosterone nel latte non può essere l'unico meccanismo alla base di questo fenomeno in quanto i cuccioli di tali femmine non si sono dimostrati significativamente più sensibili all'ACTH esogeno rispetto a figli di madri normali (Cirulli *et al.*, 1992).

Inoltre, si è visto che il fatto di accarezzare i cuccioli separati dalla madre, senza allattarli, può prevenire l'incremento del rilascio di ACTH stress-indotto senza influenzare la concentrazione di corticosterone (Cirulli *et al.*, 1992).

Di conseguenza è probabile che cambiamenti nella relazione madre-cucciolo possano influenzare la funzione, la struttura e l'architettura neurochimica del cervello (Gunsenhausner, 1987); Le variazioni nelle cure materne sono associate difatti agli effetti sulla morfologia, la funzione sinaptica e la responsività al corticosterone dei neuroni CA1 e all'apprendimento dipendente dall'ippocampo in condizioni di stress.

La prole adulta di madri con un alti livelli di cure materne mostrano una maggior lunghezza dei rami dendritici e una maggiore densità spinale (spine density) dei neuroni CA1, una maggiore LTP e una maggiore espressione ippocampale sia dell'MR che del GR (Champagne *et al.*, 2008).

E' stato proposto che gli effetti delle manipolazioni precoci risultino in cambiamenti delle cure materne in seguito ad alterazioni delle caratteristiche degli stimoli provenienti dai piccoli dopo la procedura di manipolazioni (Barnett e Barn, 1967; Levine, 1975; Schreiber *et al.*, 1977; Smotherman e Bell, 1980; Caldji *et al.*, 1998; Mason, 2000; Pryce e Feldon, 2003; Macri e Wurbel, 2006; Weber e Olsson, 2008).

Ad esempio, il fatto di rimuovere il neonato dal nido provoca un abbassamento della sua temperatura corporea e l'emissione di vocalizzazioni tipiche che stimolano il comportamento materno (Branchi *et al.*, 2001). E' stato dimostrato che le madri di cuccioli manipolati dedicano più tempo al *licking* rispetto alle madri di piccoli non

sottoposti alle manipolazioni (Meaney *et al.*, 1996).

Liu e colleghi (1997), hanno inoltre dimostrato che i cuccioli di madri con la tendenza naturale a passare più tempo a dedicarsi al *licking* e al *grooming* durante i primi 10 giorni di vita mostrano una minor secrezione di ACTH e di corticosterone in risposta allo stress, un'aumento dei livelli di RNAm per l'espressione dei recettori ai GC, una maggiore efficienza del feed-back negativo operato dai GC e una diminuzione dei livelli di RNAm per la sintesi di CRH, similmente a quanto osservato nei soggetti manipolati. I risultati di questi studi suggeriscono quindi che i cambiamenti del comportamento materno siano uno dei fattori critici che mediano gli effetti delle manipolazioni.

Masis-Calvo e colleghi (2013), effettuarono degli studi su ratti di razza Sprague-Dawley per valutare se differenti cure materne verso la prole inducessero nella prole stessa risposte comportamentali e neurochimiche diverse: suddivisero quindi le madri in due gruppi, dove il primo era costituito da femmine che presentavano un alto comportamento di *licking-grooming*, mentre il secondo mostrava un basso comportamento di *licking-grooming*. In seguito, i cuccioli furono sottoposti a dei test in vivo e fu valutato inoltre nel postmortem la concentrazione di neurotrasmettitori in tre regioni del cervello, quali l'ippocampo, il nucleo striato ventrale e la corteccia prefrontale. I cuccioli di madri con basso LG mostravano maggiori livelli di ansia rispetto a quelli di madri con alto LG e avevano anche un minor comportamento esploratorio. Questa risposta comportamentale era associata a un incremento della neurotrasmissione di 5-HT nella corteccia frontale, arrivando alla conclusione che condizioni stressanti modulano il sistema serotoninergico (Francis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2010; Masis-Calvo *et al.*, 2013; Sequeira-Cordero *et al.*, 2013; ); i livelli di dopamina riscontrati nei piccoli di ratto di madri con basso LG erano più elevati rispetto a quelli di madri con alto LG (Zhang *et al.*, 2005; Masis-Calvo *et al.*, 2013). Da questi studi è emerso che in effetti variazioni nella qualità delle cure materne hanno conseguenze su molti comportamenti legati all'ansia nella prole, causando significanti effetti sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Liu *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2004; Masis-Calvo *et al.*, 2013), apprendimento e memoria spaziale, morfologia del cervello (Toki *et al.*, 2007; Masis-Calvo *et al.*, 2013), neurotrasmettitori contenuti in molte regioni del cervello, e pattern epigenetici e profili di espressione genica (Weaver *et al.*, 2004; Masis-Calvo *et al.*, 2013); le regioni come la corteccia prefrontale, l'ippocampo, il nucleo ventrale striato del cucciolo, sono dunque influenzati dal comportamento materno (Francis *et al.*, 1999; Champagne *et al.*, 2008; Masis-Calvo *et al.*, 2013).

Van Oers (1998), dopo aver effettuato manipolazioni in ratti neonati tali da mimare

alcuni degli aspetti fondamentali del comportamento materno (l'allattamento e la stimolazione della regione perineale), ha scoperto che essi erano in grado di invertire molti degli effetti della privazione materna. Infatti, cuccioli allattati e stimolati ad eliminare durante il periodo di separazione dalla madre assomigliano strettamente a quelli non privati per quanto riguarda le risposte endocrine e i cambiamenti osservati nel cervello: non mostravano difatti incrementi dei livelli basali e stress-indotti di ACTH e corticosterone.

Inoltre, la sola stimolazione della regione perineale, senza allattamento, inverte la secrezione di ACTH indotta dallo stress ma gli aumenti dei livelli basali e stress-indotti di corticosterone rimangono simili a quelli osservati nei cuccioli totalmente privati (Van Oers *et al.*, 1998)

Di conseguenza, è stato proposto che queste due componenti distinte del comportamento materno regolano elementi diversi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale del neonato:

- L'allattamento riduce la sensibilità delle ghiandole surrenali all'ACTH
- La stimolazione della regione perineale è coinvolta nell'inibizione del rilascio di ACTH (Suchecki *et al.*, 1993).

Altri studi hanno proposto che l'ipotermia indotta dalla separazione dalla madre stimoli, attraverso gli ormoni tiroidei, i sistemi serotoninergici ippocampali e corticali; la stimolazione dei recettori serotoninergici (5-HT)<sub>2A</sub> promuoverebbe poi un aumento del numero di recettori per i GC in queste due regioni cerebrali (Meaney *et al.*, 1994). Questa ipotesi è confermata dal fatto che un blocco dei recettori serotoninergici previene l'aumento del numero dei recettori per i GC nell'ippocampo indotto dalle manipolazioni (Mitchell, 1990).

Caldji e colleghi (1998) e Cirulli e colleghi (2003), hanno ipotizzato che i cuccioli adattino il proprio sistema neurale in risposta alle variazioni del comportamento materno dipendenti dall'ambiente, ad esempio presentando una diversa risposta comportamentale e neuroendocrina alle sfide sociali e ambientali (Meaney, 2001; Macri e La Viola, 2004; Macri e Wurbel, 2007).

Lo studio di Coutellier e colleghi (2007), ha preso in considerazione due gruppi di femmine di topi con le rispettive cucciolate posti in due gabbie composte rispettivamente da due zone, una adibita a nido e una a mangiatoia connesse da un tunnel. Ad un gruppo il cibo era servito alla madre nella zona adibita a nido, mentre all'altro il cibo veniva servito nella zona mangiatoia. È stato rilevato che, nonostante il

tempo passato in contatto fisico con i cuccioli non differisse fra le madri dei due gruppi, le femmine a cui veniva somministrato il cibo nella mangiatoia spendevano meno tempo nel *nursing* attivo rispetto alle altre e che i cuccioli di quest'ultime sono risultati in età adulta dotati di un comportamento maggiormente socio-positivo rispetto a quelli appartenenti all'altro gruppo.

## Capitolo 3: Soggetti, materiali e metodi:

### 3-1: Scopo del progetto:

Lo scopo del progetto è di identificare e quantificare nel cane le cure materne che la madre rivolge a ciascun cucciolo all'interno della cucciolata.

L'interesse di questa ricerca è quello di riscontrare se esistono differenze, sia quantitative che qualitative, nelle cure materne che le madri forniscono ad ogni singolo cucciolo, all'interno delle diverse cucciolate oggetto dello studio durante i loro primi 21 giorni di vita.

In particolare, per quanto concerne le cure materne, analizzeremo se esistono delle differenze di comportamento tra:

-1 madri primipare-madri pluripare

-2 in relazione al numero di cuccioli (maggiore o minore) di cui è composta la cucciolata

-3 Poiché nel campione totale di 10 cucciolate, 3 appartengono alla razza Pastore Belga Groenendael, è stato scelto di valutare se esistesse una differenza nell'espressione delle cure materne in questa razza rispetto al gruppo rappresentato da tutte le altre.

### -3-2: Soggetti:

Sono state prese in esame 10 cucciolate di diverse razze (**tabella 1**), provenienti da allevatori professionisti e privati di differenti parti di Italia. Il campione totale dei soggetti si compone di 58 cuccioli e 10 individui adulti (le madri).

Delle 10 cucciolate, tre appartengono alla stessa razza (Pastore Belga Groenendael) e di queste fanno parte 16 cuccioli corrispondenti a un 27,6% dell'intero campione.

Nella tabella 1 è possibile osservare i dati relativi a ciascuna cucciolata.

L'età delle madri oscilla da 18 a 84 mesi (media  $53,4 \pm 27,48$  mesi).

Il numero dei cuccioli varia dai 3 ai 9 per cucciolata (media di  $5,8 \pm 1,75$ ). Le femmine sono 27 mentre i maschi 31. Il numero delle femmine per cucciolata varia da 0 a 8 (media  $2,7 \pm 2,31$ ), mentre quello dei maschi oscilla tra 1 e 5 (media  $3,1 \pm 1,3$ ).

Nelle dieci cucciolate prese in esame (**tabella 1**), alcuni cuccioli sono nati morti e altri sono deceduti nei primi giorni dopo il parto e per questo motivo non sono stati presi in considerazione nello studio del comportamento materno. In particolare nella cucciolata

3, 8 e 9 sono nati morti rispettivamente due cuccioli e un cucciolo; nella cucciolata 6 è morto un cucciolo durante l'allattamento.

Il numero dei cuccioli morti alla nascita varia tra 0 e 2 per cucciolata (media  $0,6 \pm 0,84$ ) mentre quello dei cuccioli morti durante l'allattamento varia tra 0 e 1 per cucciolata (media  $0,1 \pm 0,31$ ).

Nello studio sono state considerate 5 madri primipare e 5 madri pluripare, al secondo o terzo parto.

L'età delle madri primipare oscilla tra 18 e 72 mesi (media  $32,4 \pm 22,3$  mesi).

L'età delle madri pluripare oscilla tra 60 e 84 mesi (media  $74,4 \pm 10,03$  mesi).

Il numero dei cuccioli nati da madri primipare varia tra 3 e 7 per cucciolata (media  $5 \pm 1,6$ ).

Il numero dei cuccioli nati da madri pluripare varia tra 5 e 9 per cucciolata (media  $6,6 \pm 1,7$ ).

Il numero di cuccioli morti alla nascita sia di madri primipare che pluripare varia da 0 a 1 per cucciolata (media  $0,6 \pm 0,9$ ).

Il numero di cuccioli morti durante l'allattamento di madri primipare è 0.

Il numero di cuccioli morti durante l'allattamento di madri pluripare varia da 0 a 1 per cucciolata (media  $0,1 \pm 0,31$ ).

Il numero dei cuccioli maschi nati da madri primipare varia tra 2 e 5 per cucciolata (media  $3,6 \pm 1,14$ ).

Il numero dei cuccioli maschi nati da madri pluripare varia tra 1 e 4 per cucciolata (media  $2,6 \pm 1,34$ ).

Il numero dei cuccioli femmina nati da madri primipare varia tra 0 and 2 per cucciolata (media  $1,4 \pm 0,9$ ).

Il numero dei cuccioli femmina nati da madri pluripare varia tra 1 and 8 per cucciolata (media  $4 \pm 2,64$ ).

Litter	Mother	Bred	Age (months)	n. parity	n.puppies born already died	n.puppies died during nursing	n.puppies included in the research	males	females	Provenance
Litter 1	Mother 1	a	18	1	0	0	5	3	2	PB

Litter 2	Mother 2	b	72	1	0	0	4	4	0	PB
Litter 3	Mother 3	c	24	1	1	0	3	2	1	NPB
Litter 4	Mother 4	b	72	3	0	0	7	4	3	PB
Litter 5	Mother 5	d	60	3	0	0	5	2	3	PB
Litter 6	Mother 6	b	84	2	0	1	5	4	1	PB
Litter 7	Mother 7	e	72	3	2	0	7	2	5	PB
Litter 8	Mother 8	f	24	1	2	0	7	5	2	PB
Litter 9	Mother 9	g	84	3	1	0	9	1	8	PB
Litter 10	Mother 10	h	24	1	0	0	6	4	2	NPB

**Tabella 1** : caratteristiche delle 10 cucciolate incluse nella ricerca.

Legenda: **a** Weimaraner, **b** Pastore Belga , **c** Meticci , **d** Bassotto Tedesco a pelo corto, **e** Pastore tedesco, **f** Labrador retriever, **g** Boxer, **h** Border collie; **PB**= allevatori professionisti, **NPB**= allevatori non professionisti.

In lilla sono evidenziate le madri primipare.

I cuccioli inclusi nella ricerca sono 31 maschi e 27 femmine e sono stati identificati con dei nastri posti al collo, il cui colore è riportato nella **tabella 2**.

Litter	Breed	n. puppy	sex	ribbon's colour
1	a	1	female	fuchsia
1	a	2	female	violet
1	a	3	male	green
1	a	4	male	red
1	a	5	male	orange
2	b	1	male	red
2	b	2	male	light blue-white
2	b	3	male	lilac
2	b	4	male	tervueren
3	c	1	male	red
3	c	2	male	without ribbon
3	c	3	female	white
4	b	1	female	light yellow
4	b	2	female	pink
4	b	3	female	white
4	b	4	male	red

4	b	5	male	blue
4	b	6	male	light blue
4	b	7	male	yellow
5	d	1	female	merle
5	d	2	female	white
5	d	3	female	red
5	d	4	male	blue
5	d	5	male	chocolate
6	b	1	male	red
6	b	2	male	light blue
6	b	3	male	blue
6	b	4	male	yellow
6	b	5	female	white
7	e	1	male	light blue
7	e	2	male	beige
7	e	3	female	yellow
7	e	4	female	red
7	e	5	female	violet
7	e	6	female	pink
7	e	7	female	green
8	f	1	male	green
8	f	2	male	light blue
8	f	3	male	orange
8	f	4	male	grey
8	f	5	male	yellow
8	f	6	female	red
8	f	7	female	pink
9	g	1	male	blue
9	g	2	female	orange
9	g	3	female	white
9	g	4	female	grey
9	g	5	female	light blue
9	g	6	female	yellow
9	g	7	female	red
9	g	8	female	without ribbon
9	g	9	female	green
10	h	1	male	blue
10	h	2	male	yellow
10	h	3	male	light blue
10	h	4	male	red
10	h	5	female	pink
10	h	6	female	green

**Tabella n° 2** : Dettagli dei cuccioli.

Legenda: **a** Weimaraner, **b** Pastore Belga, **c** Meticci, **d** Bassotti a pelo corto, **e** Pastori tedeschi, **f** Labrador retriever, **g** Boxer, **h** Border collie.

### 3-3: Materiali e metodi:

La ricerca ha come obiettivo quello di osservare e analizzare le cure materne che la madre fornisce ad ogni singolo cucciolo e il comportamento del cucciolo nei confronti della propria madre, prendendo in esame i primi 21 giorni di vita dei cuccioli.

#### Videoriprese dei primi 21 giorni di vita dei cuccioli:

Per osservare le cure materne ed il comportamento dei cuccioli nei confronti della madre,

madre e cuccioli sono video-ripresi quotidianamente, dal 1° al 21esimo giorno di vita (dal periodo neonatale al periodo di transizione), per 15 minuti consecutivi all'interno della cassa parto.

I cuccioli sono identificati attraverso l'uso di diversi nastri colorati (**foto 1 e 2**), applicati per tutto il periodo di osservazione (21 giorni).



**Foto 1 e 2:** nastri colorati usati per differenziare cuccioli di Weimaraner(cucciolata 1)

Le videoregistrazioni dei cuccioli con la madre vengono eseguite sempre al mattino, quando la madre viene fatta rientrare nella cassa parto dopo la prima uscita per urinare e defecare.

La modalità di videoregistrazione si è avvalsa dell'utilizzo di due videocamere fisse (Sony HDR-CX240EB) montate su treppiedi (Manfrotto MKC3-H0/foto 3 e 4) e posizionate nei due lati opposti della cassa parto in modo da riprenderla interamente.



**Foto 3:** Sony HDR-CX240EB Camera



**Foto 4:** Manfrotto MKC3-H01

Agli allevatori è stato chiesto inoltre di compilare un modulo apportando informazioni riguardanti la madre e la cucciolata (segnalamento, numero di parti, numero di cuccioli nati ed eventuali cuccioli nati morti o morti durante l'allattamento, sesso dei cuccioli, peso quotidiano dei cuccioli nei 21 giorni di riprese).

Per determinare le cure materne fornite a ciascun cucciolo e il comportamento di ogni singolo cucciolo nei confronti della propria madre, è stato utilizzato l'etogramma di Rheingold H.L. (1963), il quale è stato parzialmente modificato adattandolo a questo studio e integrandolo con nuovi comportamenti, alcuni dei quali tratti da altre fonti (Pal, 2005).

L'etogramma tiene conto di tre gruppi di comportamenti:

-**COMPORAMENTO MATERNO:** *mother asleep* (tempo trascorso dalla madre a dormire), *mother onside* (postura latero-laterale), *mother on belly* (postura sternale), *mother sitting* (posizione seduta), *mother standing* (posizione quadrupedale), *mother walking* (camminare all' interno della cassa parto), *mother in the welphing box* (tempo trascorso dalla madre nella cassa parto), *movement of mother to pups* (movimenti della

madre verso i cuccioli), *movements of mother away from puppies* (movimenti di allontanamento della madre dai cuccioli), *mother-other* (altre attività svolte dalla madre nella cassa parto), *mother out of sight* (comportamenti della madre espressi fuori campo visivo della telecamera e quindi non visibili), *Behaviour not evaluated-mother* (comportamenti non valutabili perchè parzialmente oscurati dal corpo dei cuccioli).

I comportamenti che fanno parte di questa categoria sono comportamenti specifici della madre, indipendenti dai cuccioli.

-INTERAZIONI MADRE-CUCCIOLI: *contact mother-pup* (contatto madre-cucciolo sia fisico o di altra sorta), *nursing* (allattamento), *licking* (leccamento di tutte le aree del corpo ad eccezione di quella ano genitale), *licking anogenital area* (lecca mento dell'area anogenitale).

I comportamenti che fanno parte di questa categoria sono comportamenti specifici per ogni diade madre-cucciolo.

- COMPORTAMENTI DEL CUCCILOLO: *pup asleep* (tempo che il cucciolo trascorre a dormire), *puppy behaviour non evacuate* (comportamenti dei cuccioli non completamente visibili), *pup's time spent in the whelping box* (tempo che il cucciolo trascorre nella cassa parto), *movements of pup to the mother* (movimenti dei cuccioli verso la madre), *movements of pup to another pup* (movimenti dei cuccioli verso altri cuccioli), *contact pup-pup* (contatti tra cuccioli), *out of sight-puppy* (comportamenti dei cuccioli non visibili), *other-puppy* (altri tipi di comportamento non classificati).

I comportamenti che fanno parte di questa categoria sono comportamenti specifici per ogni singolo cucciolo.

L'etogramma è riportato in dettaglio nella **tabella 3**.

<b>BEHAVIOUR</b>	<b>DEFINITION</b>
<b>Contact mother - pup</b>	Physical contact of any sort between mother and pups within the whelping box.
<b>Nursing</b>	Composed of several components: active suckling, finding a nipple, maintaining the grasp, pushing in of forelegs, pulling up of head, and disposing of rear legs within the whelping box.
<b>Licking</b>	Each occurrence of the mother's licking of the pup excluded anogenital area within the whelping box.
<b>Licking anogenital area</b>	Each occurrence of the mother's licking of the perineal region (areas of anus, urinary opening, belly and rear)

	within the whelping box.
<b>Movements of mother to pups</b>	The mother goes toward the litter within the whelping box.
<b>Movements of pup towards his/her mother</b>	The pup goes to his/her mothers within the whelping box. Loci of attraction: the belly , inguinal region, and head.
<b>Movements of mother away from the pup</b>	The mother separates herself from the litter within the whelping box.
<b>Movements of pup towards a brother/sister</b>	The pup goes toward another pup within the whelping box.
<b>Contact pup - pup</b>	Physical contact of any sort between pups within the whelping box.
<b>Time mother spent in the whelping box</b>	Amount of time the animal spent in the whelping box.
<b>Time pup spent in the whelping box</b>	Amount of time the animal spent in the whelping box.
<b>Maternal postures :</b> - Lying on side - Lying on belly - Sitting - Standing - Walking	Postures assumed during 15-minute period of observation in the whelping box.
<b>Mother asleep</b>	If her eyes are closed, she does not move and her head is laid on the floor in the whelping box.
<b>Pup asleep</b>	If pup's eyes are closed within the whelping box. During the first days the only usable criterion is the absence of movement, except twitching.
<b>Other - pup</b>	The pup is doing other activities in the whelping box.
<b>Other - mother</b>	She is doing other activities in the whelping box.
<b>Behaviour not evaluated - mother</b>	Mother is partially covered by her puppies or part of her body does not appeared and it is not possible to identify her behaviour or it is not possible any more identify if she is doing the same behaviour as before; or there is a doubt between two different behaviours in the whelping box.
<b>Out of sight - mother</b>	Mother is completely out of sight when she is in the whelping box.
<b>Behaviour not evaluated - puppy</b>	Puppy is partially covered by her/his mother or a puppy and it is not possible to identify his/her behaviour or it is not possible any more identify if he/she is doing the same behaviour as before; or there is a doubt between two different behaviours in the whelping box.
<b>Out of sight - puppy</b>	Puppy is completely out of sight within the whelping box (is totally covered by the mother or by an other puppy or he/she is in another part of the whelping box which is not recorded).

**Tabella 3:** etogramma delle cure materne e del comportamento del cucciolo.

Comportamenti osservati durante i 15 minuti di videoregistrazione quotidiana.

*Rheingold H.L Maternal behaviour in mammals, 1963 (modified).*

*Pal S.K. (2005): Parental care in free ranging dogs, Canisi Familiaris. Applied Animal Behaviour Science 90: 31-47 (modified).*



Non tutti gli allevatori hanno eseguito 21 videoriprese corrispondenti ai primi 21 giorni di vita dei cuccioli e talvolta la videoregistrazione è stata interrotta prima del raggiungimento dei 15 minuti richiesti come da protocollo.

In totale pertanto, su 10 cucciolate, sono stati esaminati ed analizzati 198 video della durata complessiva di 176544 secondi, corrispondenti a 49,04 ore (**tabella 6**).

<b>Cucciolate</b>	<b>Numero video (giorni)</b>	<b>Secondi totali</b>
Cucciolata 1	17 video (17 giorni)	15252
Cucciolata 2	20 video (20 giorni)	18000
Cucciolata 3	19 video (19 giorni)	17100
Cucciolata 4	21 video (21 giorni)	18900
Cucciolata 5	20 video (20 giorni)	18000
Cucciolata 6	21 video (21 giorni)	18900
Cucciolata 7	20 video (20 giorni)	17033
Cucciolata 8	20 video (20 giorni)	18000
Cucciolata 9	19 video (19 giorni)	17100
Cucciolata 10	21 video (21 giorni)	18259
<b>10 cucciolate totali</b>	<b>198 video totali</b>	<b>176544 secondi totali</b>

**Tabella 6:** Numero di videoregistrazioni raccolte nel campione totale e durata totale delle videoregistrazioni

Le videoregistrazioni sono state analizzate secondo per secondo (continuous recording), considerando il comportamento della madre, l' interazione madre-cucciolo, ed il comportamento specifico del cucciolo.

Ciascuna videoregistrazione è stata esaminata per un numero totale di volte pari a quello del numero dei cuccioli presenti all' interno della cucciolata (osservazione comportamento specifico del cucciolo e dell' interazione madre-cucciolo), più quello della madre (comportamento specifico madre), quindi ad esempio, se la cucciolata è costituita da 6 cuccioli, il video di un singolo giorno è stato analizzato 6+1 volte.

#### **Analisi statistica:**

Nella presente ricerca è stata utilizzata una statistica parametrica e una statistica non parametrica.

Per valutare se la distribuzione dei dati dei comportamenti materni fosse normale è stato utilizzato il **test di Shapiro Wilk** ( $p < 0,05$ ) applicandolo ai giorni 1-10-19. Poiché la distribuzione è risultata non normale per tutti i comportamenti è stata usata un'analisi statistica non parametrica.

La scelta dell'analisi dei giorni 1, 10 e 19 presenti in tutte e dieci le cucciolate esaminate è stata presa allo scopo di ottenere un andamento dei comportamenti materni durante le prime tre settimane di vita dei cuccioli.

E' stato applicato il **test di Friedman** ( $p < 0,05$ ), considerando l'intero campione (58 cuccioli) sempre nei giorni 1-10-19.

Ai comportamenti risultati statisticamente significativi con il test di Friedman è stato applicato il **test di Wilcoxon** ( $p < 0,05$ ), dopo aver adottato la correzione di Bonferroni a causa dell'aumento delle possibili combinazioni (giorno 1 versus 10, giorno 1 vs 19 e giorno 10 vs 19), prendendo come campione intero quello rappresentato da tutti i 58 cuccioli. Con la correzione di Bonferroni il livello di significatività si è abbassato a  $\alpha = 0,05/3 = 0,0167$ .

Dopo aver considerato il campione intero, sono state analizzate le cucciolate come gruppi indipendenti, confrontandole nei singoli giorni (giorno 1, 10, 19), usando **test di Kruskal Wallis** ( $p < 0,05$ ) per confronti multipli, allo scopo di verificare l'esistenza di differenze fra gruppi (cucciolate).

Per conoscere in quali cucciolate esistessero queste differenze statisticamente significative, si è proceduto con i confronti diretti dove ciascuna cucciolata è stata confrontata con il gruppo comprendente tutte le altre cucciolate, usando il **test di Mann Whitney** ( $p < 0,05$ ).

Successivamente si è proseguito confrontando ogni cucciolata con ogni altra singola cucciolata sempre attraverso il test Mann-Whitney, ma in questo caso il livello di significatività si è abbassato molto poiché le combinazioni possibili erano 45 ( $\alpha = 0,05/45 = 0,001$ ).

E' stato inoltre indagato tramite il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), l'esistenza di una differenza fra cucciolate con un numero di cuccioli minore o uguale a 5 e cucciolate con più di 5 cuccioli.

E' stata poi calcolata in questi due gruppi, tramite il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), la media dei comportamenti materni basandosi sui primi 21 giorni di vita.

Con il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), è stato esaminato inoltre se esistesse una differenza fra cucciolate di madri primipare (gruppo C), e cucciolate di madri non primipare (gruppo D). E' stata anche calcolata in entrambi i gruppi (C e D), sempre tramite il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), la media dei comportamenti materni basandosi sui primi 21 giorni di vita.

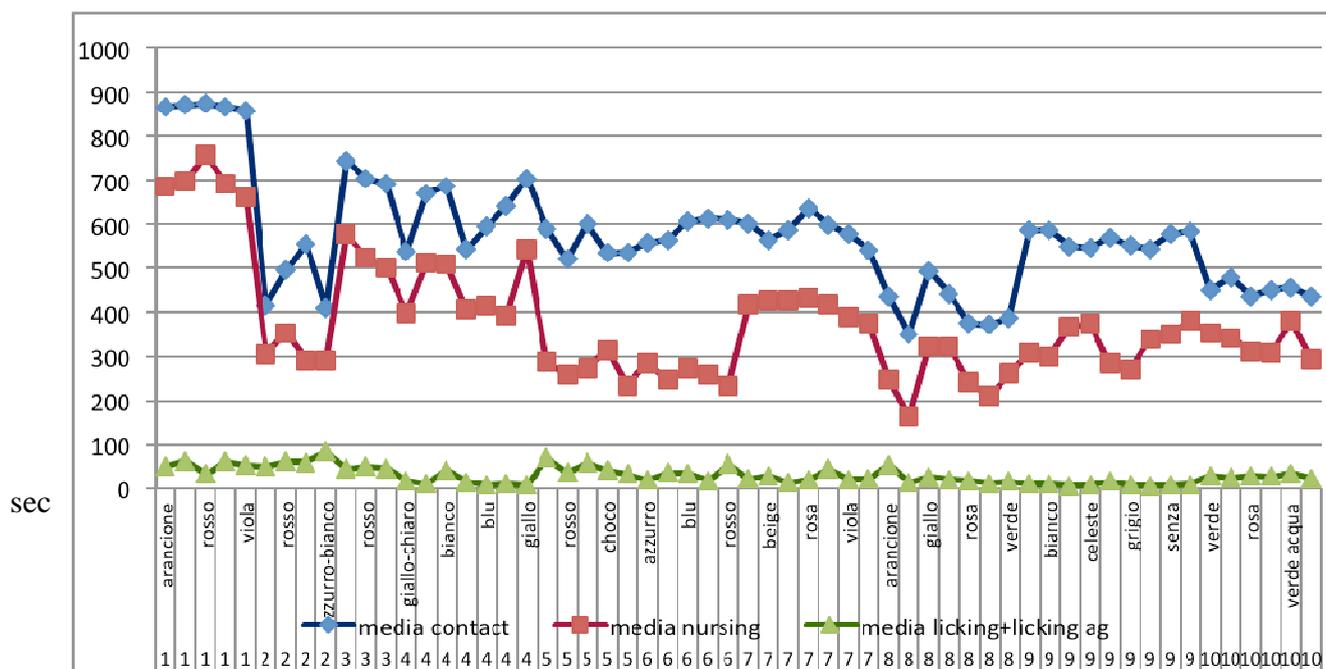
Poiché nel campione totale di 10 cucciolate, 3 appartengono alla razza Pastore Belga Groenendael, si è ricercata un'eventuale differenza nell'espressione delle cure materne

in questa razza rispetto al gruppo rappresentato da tutte le altre usando il test di Mann Withney ( $p < 0,05$ ).

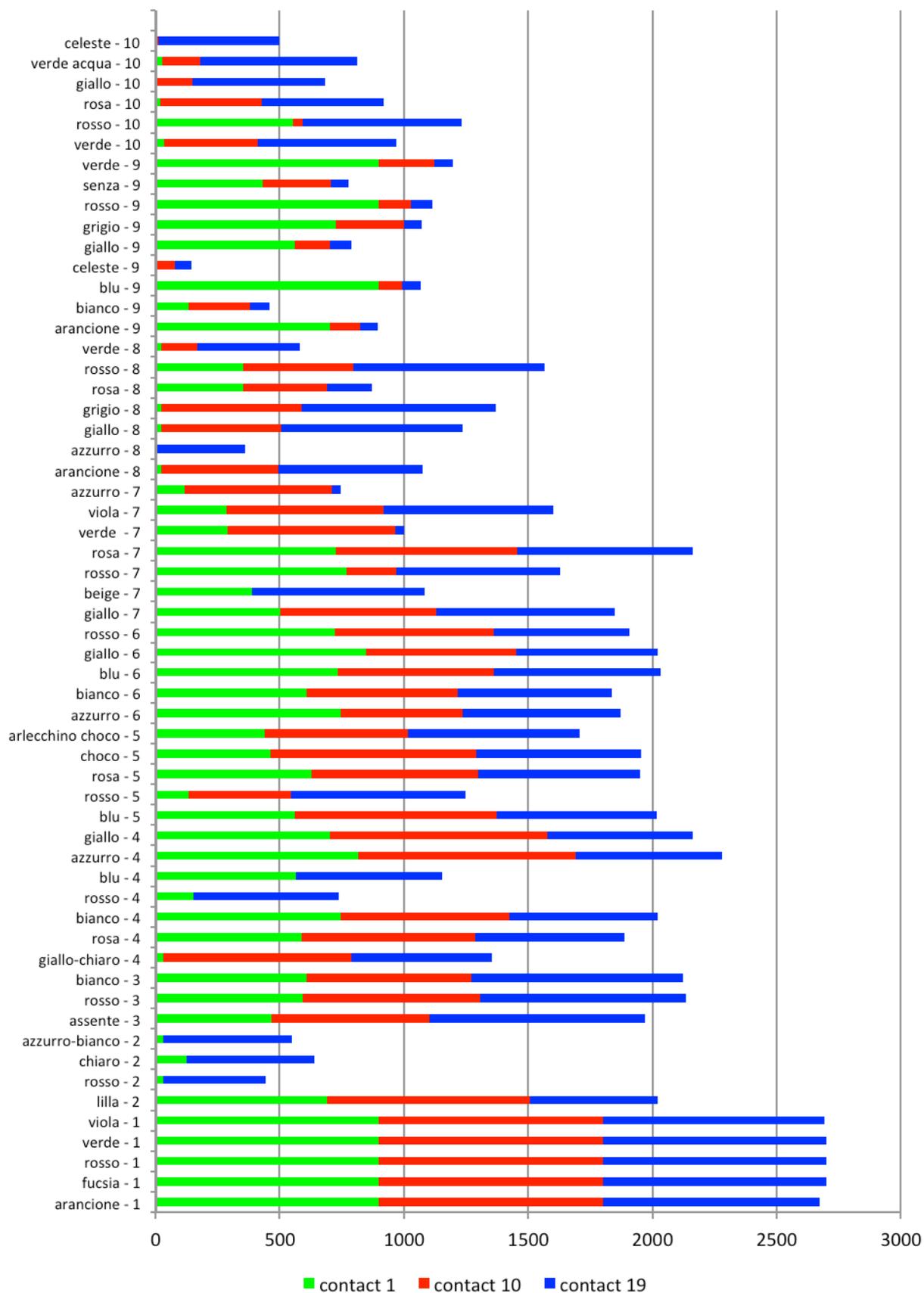
### -3-4: Risultati:

Nel **grafico 1** è riportata la media dei comportamenti *contact*, *nursing*, *licking+licking ag.* nei 21 giorni di osservazione per ciascun cucciolo, rappresentazione della misura della quantità di tempo speso dalla madre ad esprimere questi comportamenti.

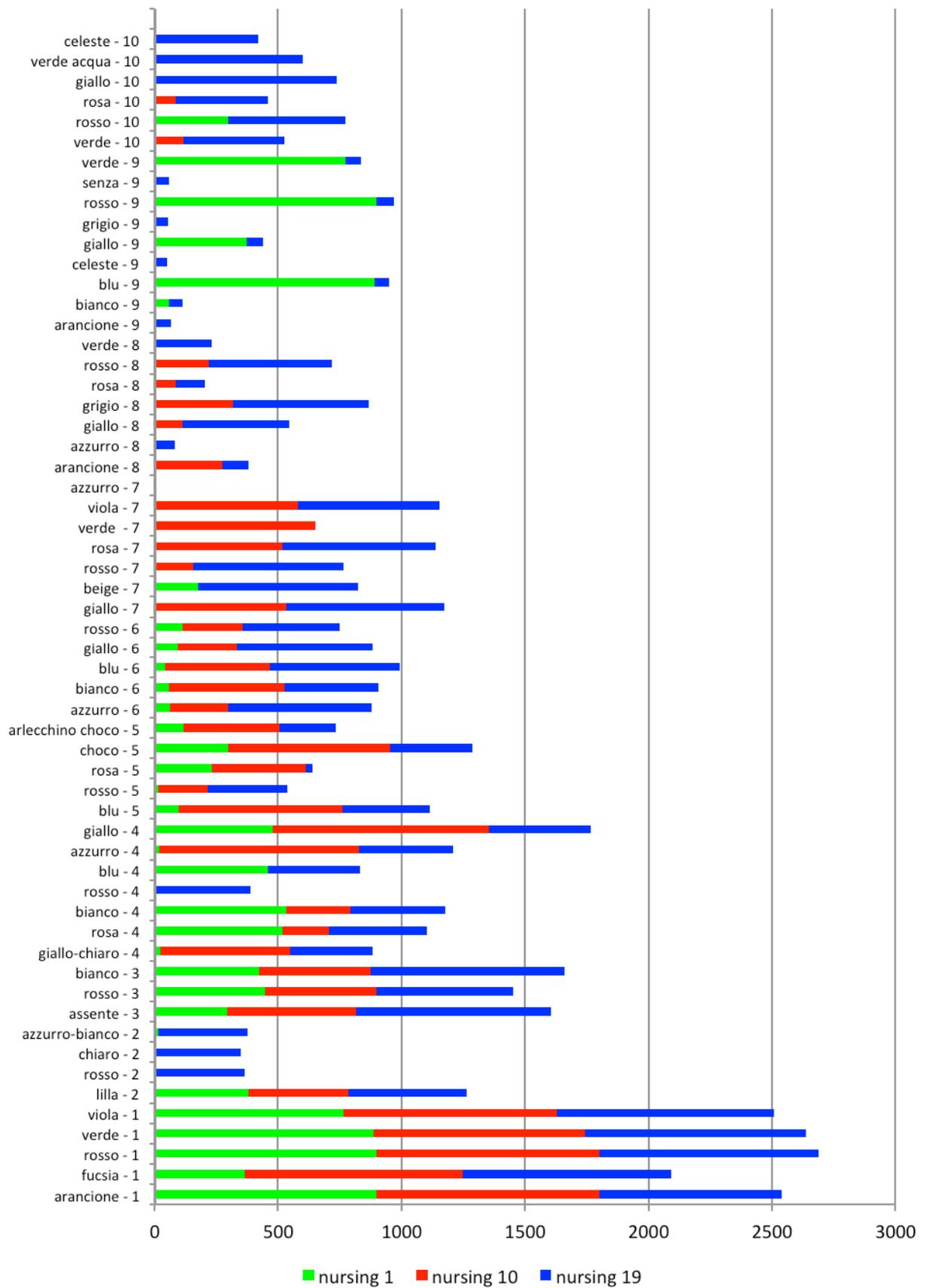
Nei grafici successivi (**grafico 2-7**) sono riportati, per alcuni comportamenti materni (*contact*, *nursing*, *licking anogenital*, *on side*, *standing*, *m.whelp.box*), i valori al giorno 1, 10, 19 nell'intero campione, dalla cucciolata 1 alla cucciolata 10.



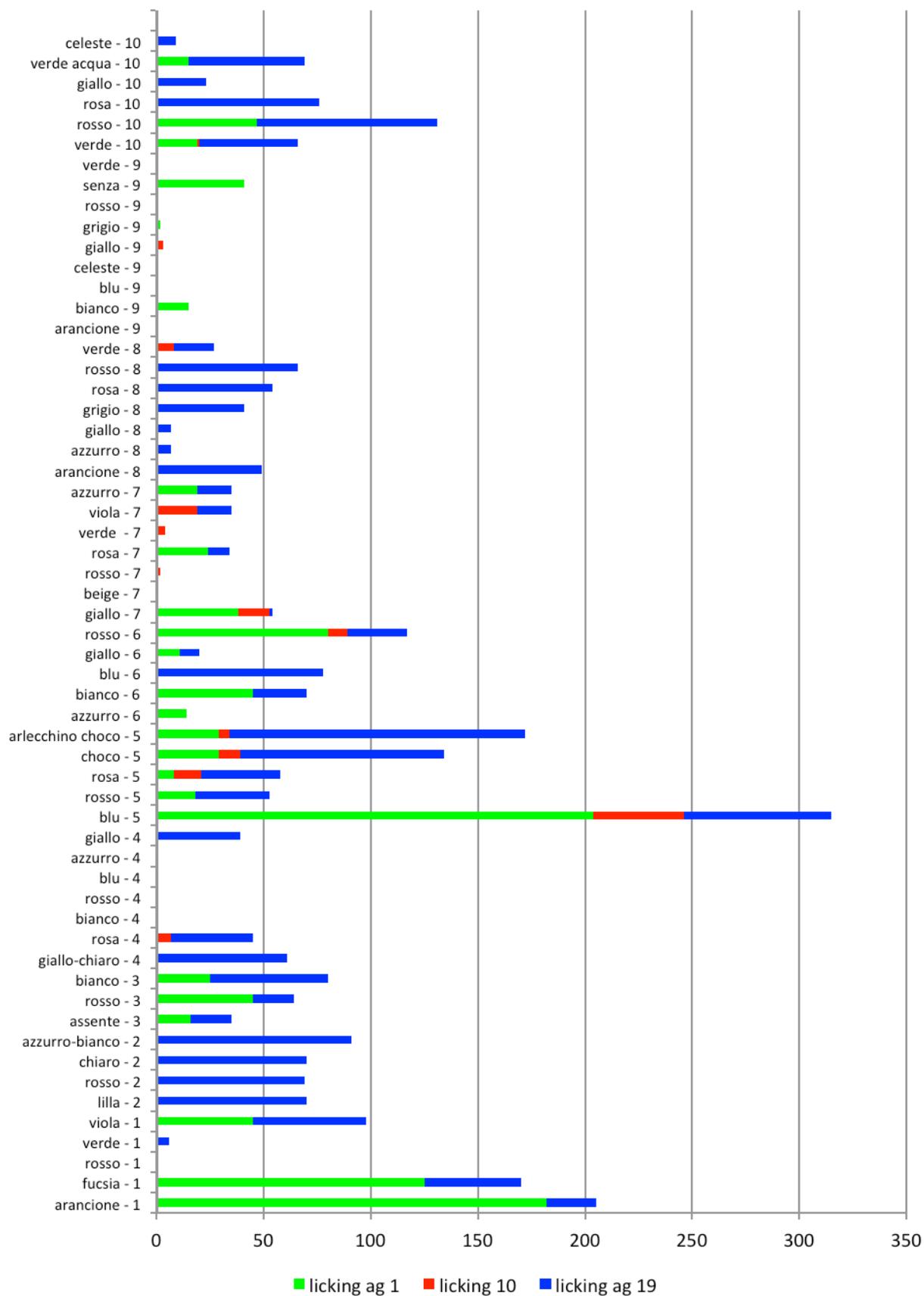
**Grafico 1:** media dei comportamenti materni *contact*, *nursing* e *licking+licking ag.* nei 21 giorni per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10).



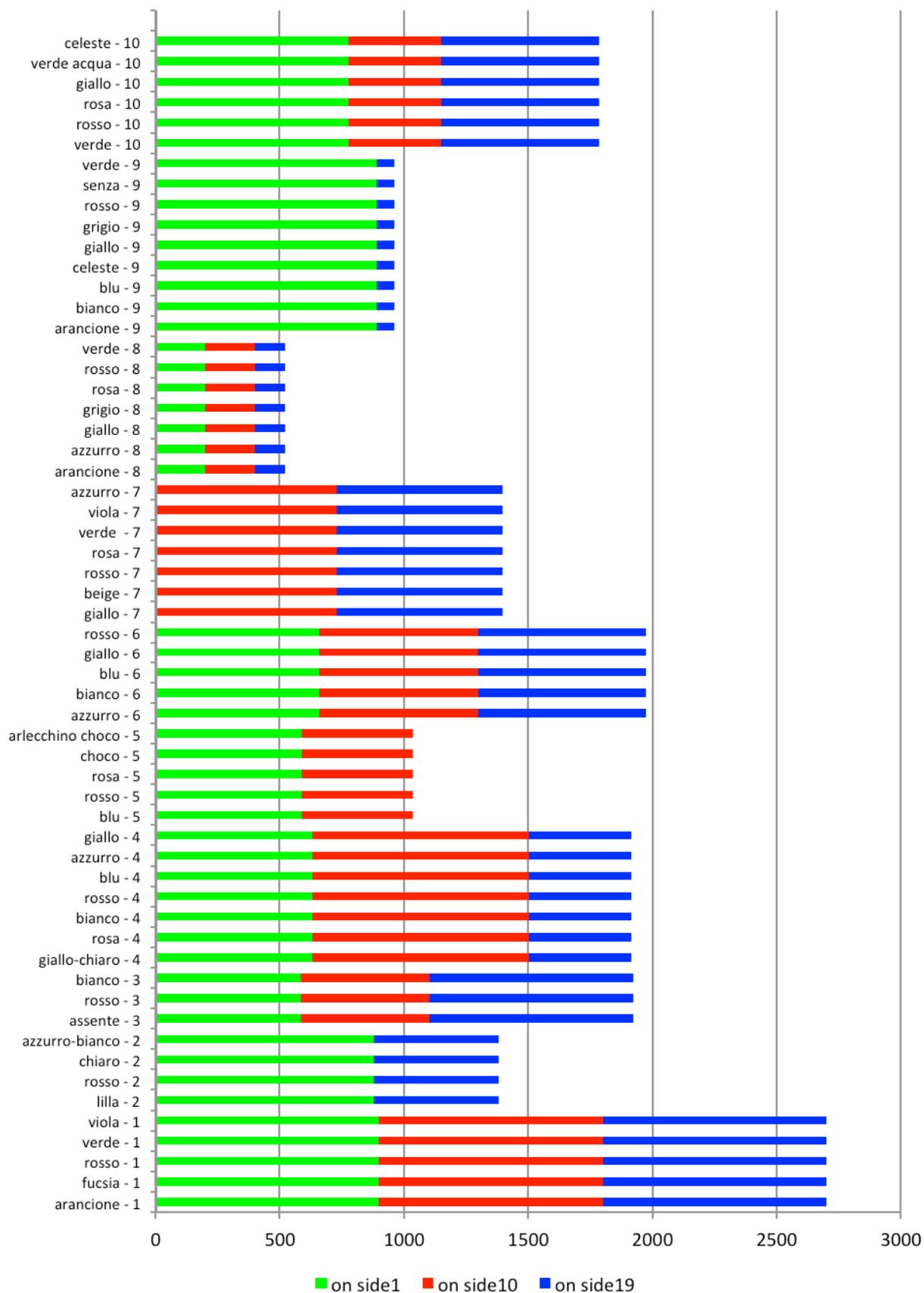
**Grafico 2:** contact al giorno 1, 10 e 19 per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10).



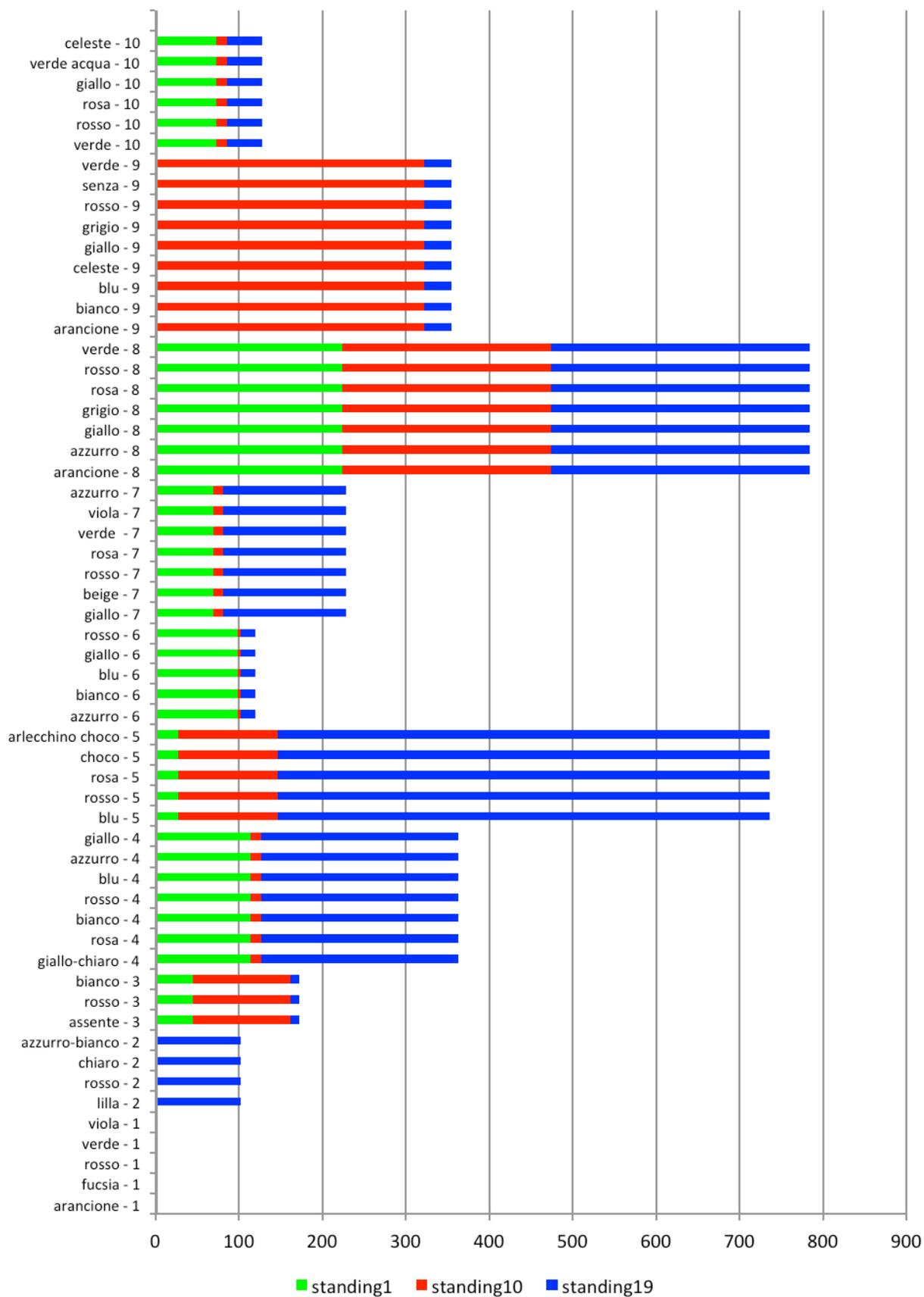
**Grafico 3:** nursing al giorno 1, 10 e 19 per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10).



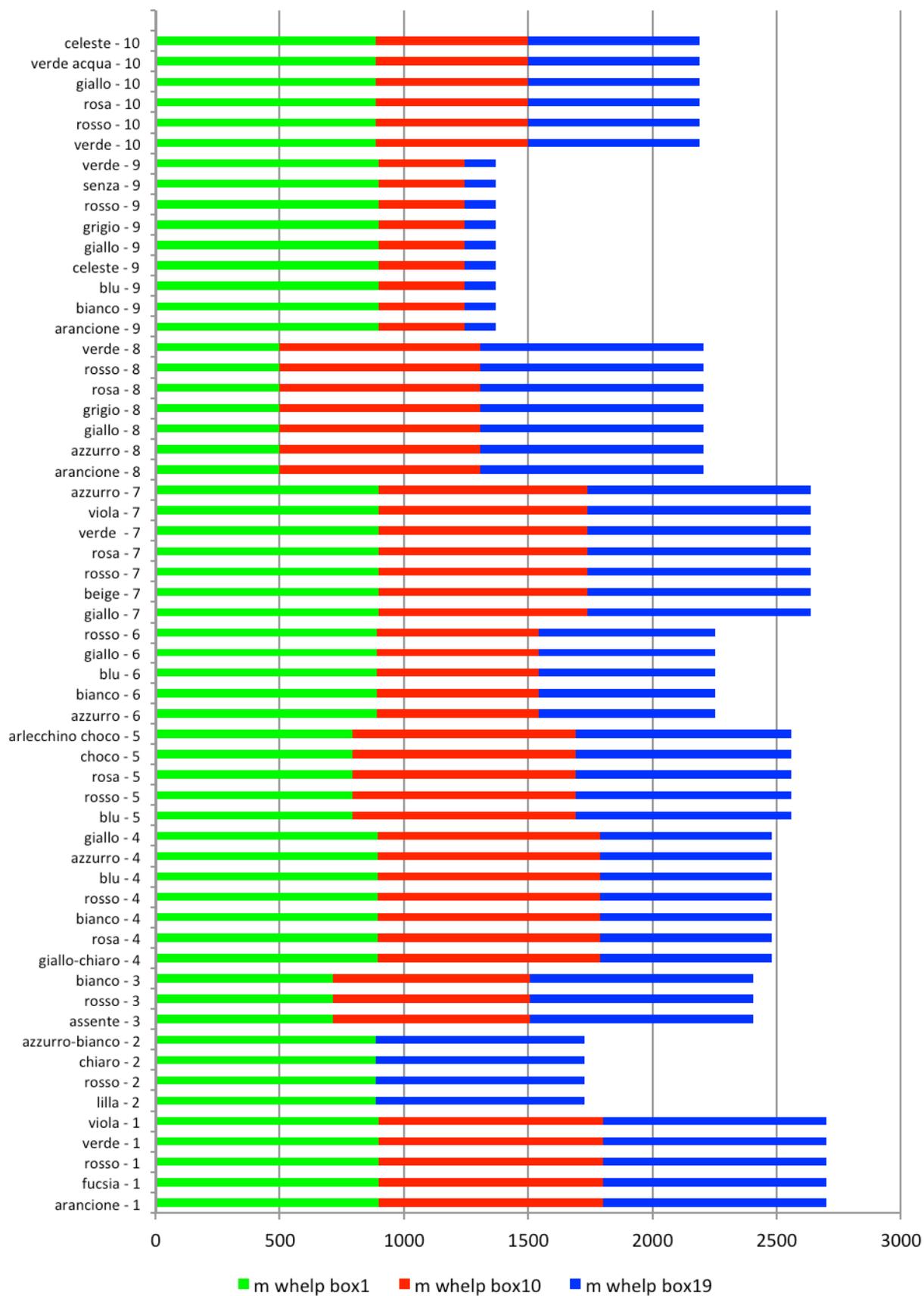
**Grafico 4:** *licking ag.* al giorno 1, 10 e 19 per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10).



**Grafico 5:** *on side* al giorno 1, 10 e 19 per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10).



**Grafico 6:** *standing* al giorno 1, 10 e 19 per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10)



**Grafico 7:** *m.whelp.box* al giorno 1, 10 e 19 per tutti i cuccioli (cucciolate 1-10).

In base ai risultati ottenuti con il test di Shapiro Wilk ( $p < 0,05$ ), tutti i dati analizzati hanno una distribuzione non normale.

Con il test di Friedman ( $p < 0,05$ ), tutti i comportamenti materni ad eccezione del *contact*, *sitting* e *licking*, sono risultati statisticamente significativi (**tabella 1**).

<b>Comportamento materno</b>	<b>Chi-quadrato (<math>\chi^2</math>)</b>	<b>p</b>
Mother asleep	27,347	0,001
Nursing	29,144	0,001
Licking anogenital	9,073	0,011
Mother on side	16,340	0,001
Mother on belly	21,355	0,001
Mother standing	20,642	0,001
Mother walking	22,039	0,001
Mother in the whelping box	7,396	0,025
Mother versus puppy	10,707	0,005
Mother away	19,935	0,001
Mother out of sight	14,000	0,001

**Tabella 1:** test di Friedman ( $p < 0,05$ ). Comportamenti materni statisticamente significativi.

Ai comportamenti materni risultati statisticamente significativi col test di Friedman ( $p < 0,05$ ), è stato applicato il test di Wilcoxon ( $p > 0,05$ ), considerando l'intero campione nelle varie combinazioni tra i giorni 1, 10 e 19. Nelle **tabelle 2a-2m** sono riportate le combinazioni risultate statisticamente significative e le relative mediane.

<b>Test di Wilcoxon</b>	nursing19 - nursing1	nursing19 - nursing10
Z	-4,119	-3,262
p	0,001	0,001

**Tabella 2a:** test di Wilcoxon per il comportamento *nursing*.

	<b>mediana</b>
nursing 1	35
nursing 10	210
nursing 19	386,5

<b>Test di Wilcoxon</b>	licking ag19 - licking ag1
Z	-2,503
p	0,012

**Tabella 2b:** test di Wilcoxon per il comportamento *licking ag*.

	<b>mediana</b>
licking ag 1	0
licking ag 19	19

Test di Wilcoxon	m asleep10 - m asleep1	m asleep19 - m asleep1	m asleep19 - m asleep10
Z	-4,330	-2,425	-3,464
p	0,001	0,015	0,001

**Tabella 2c:** test di Wilcoxon per il comportamento *m.asleep*.

	mediana
m asleep 1	0
m asleep 10	0
m asleep 19	0

Test di Wilcoxon	on side10 - on side1	on side19 - on side1
Z	-2,559	-2,949
p	0,011	0,003

**Tabella 2d:** test di Wilcoxon per il comportamento *on side*.

	mediana
on side1	644,5
on side10	450
on side19	502

Test di Wilcoxon	on belly19 - on belly1	on belly19 - on belly10
Z	-4,511	-2,762
p	0,001	0,006

**Tabella 2e:** test di Wilcoxon per il comportamento *on belly*.

	mediana
on belly1	0
on belly10	0
on belly19	0

Test di Wilcoxon	standing19 - standing1
Z	-4,466
p	0,001

**Tabella 2f:** test di Wilcoxon per il comportamento *standing*.

	mediana
standing1	69
standing10	13
standing19	100

Test di Wilcoxon	walking19 - walking1	walking19 - walking10
Z	-3,334	-5,274
p	0,001	0,001

**Tabella 2g:** test di Wilcoxon per il comportamento *walking*.

	mediana
walking1	8
walking10	11

walking19	23
-----------	----

Test di Wilcoxon	m vs p10 - m vs p1
Z	-3,568
p	0,001

**Tabella 2h:** test di Wilcoxon per il comportamento *m.vs.p.*

	mediana
m vs p 1	0
m vs p 10	0

Test di Wilcoxon	m away10 - m away1	m away19 - m away1
Z	-3,391	-3,895
p	0,001	0,001

**Tabella 2i:** test di Wilcoxon per il comportamento *m.away.*

	mediana
m away 1	0
m away 10	0
m away 19	0

Test di Wilcoxon	m whelp box10 - m whelp box1	m whelp box19 - m whelp box1
Z	-2,488	-2,568
p	0,013	0,010

**Tabella 2l:** test di Wilcoxon per il comportamento *m.whelp.box.*

	mediana
m whelp box1	892
m whelp box10	808
m whelp box19	838

Test di Wilcoxon	m FCV10 - m FCV1	m FCV19 - m FCV10
Z	-2,646	-2,646
p	0,008	0,008

**Tabella 2m:** test di Wilcoxon per il comportamento *m.FCV.*

	mediana
m FCV1	0
m FCV10	0
m FCV19	0

Come si può osservare dalla **tabella 2a**, il comportamento *nursing* è statisticamente maggiore nell'intero campione nel giorno 19 rispetto al giorno 1 e al giorno 10.

In figura 8 è riportato il risultato relativo al comportamento di *nursing*, per il quale il test di Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) ha rilevato una differenza statisticamente significativa, con *nursing* al giorno 19 statisticamente maggiore di *nursing* al giorno 1 ( $Z = -4,119$ ,

$p=0,001$ ), e statisticamente maggiore di *nursing* al giorno 10 ( $Z=-3,262$ ,  $p=0,001$ ).

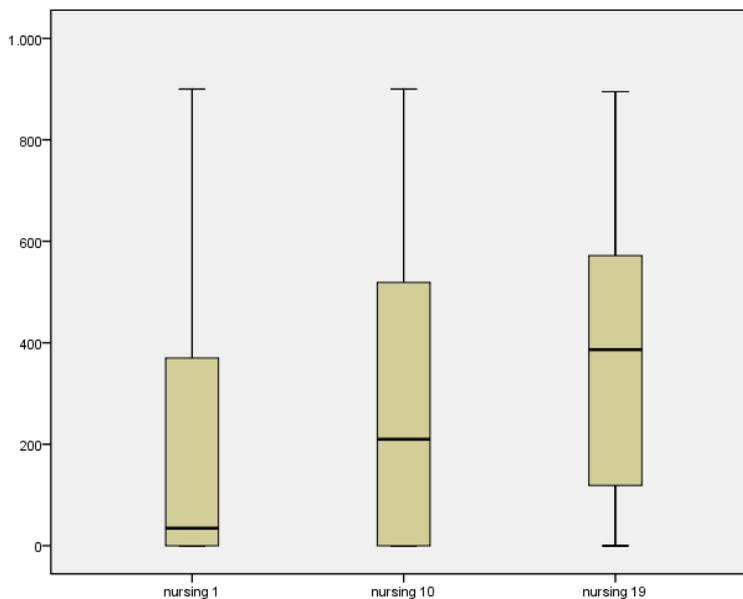
In **figura 9** è riportato inoltre il risultato di *licking ag*, per il quale il test di Wilcoxon ( $p<0,05$ ) ha rilevato una differenza statisticamente significativa, con *licking ag*. al giorno 19 statisticamente maggiore di *licking ag*. al giorno 1 ( $Z=-2,503$ ,  $p=0,012$ ).

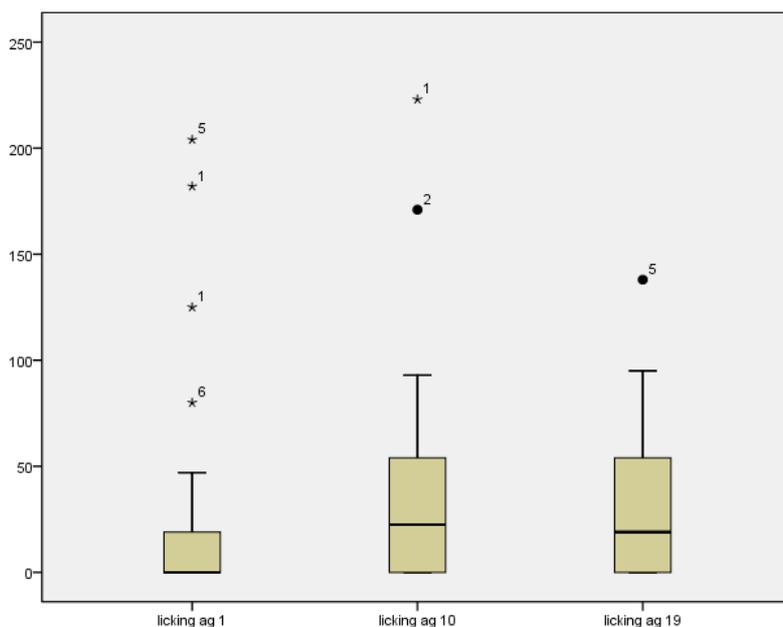
La postura *on side* che indica la disponibilità ad allattare, è risultata nel test di Wilcoxon ( $p<0,05$ ) statisticamente maggiormente nel giorno 1 rispetto al giorno 10 ( $Z=-2,559$ ,  $p=0,011$ ), e rispetto al giorno 19 ( $Z=-2,949$ ,  $p=0,003$ ); la postazione quadrupedale (*standing*), che acconsente meno facilmente l'allattamento, è risultata statisticamente maggiore al giorno 19 rispetto al giorno 1 ( $Z=-4,466$ ,  $p=0,001$ ).

Il comportamento *walking* risulta nel test di Wilcoxon ( $p<0,05$ ), statisticamente maggiore al giorno 19 rispetto al giorno 1 ( $Z=-3,334$ ,  $p=0,001$ ) e rispetto al giorno 10 ( $Z=-5,274$ ,  $p=0,001$ ).

Al contrario, *m.vs.p.* è statisticamente maggiore nel test di Wilcoxon ( $p<0,05$ ), al giorno 1 rispetto al giorno 10 ( $Z= -3,568$ ,  $p=0,001$ ).

Un altro dato interessante riguarda la quantità di tempo speso dalla madre all'interno della cassa parto (*m.whelp.box*), infatti dal test di Wilcoxon ( $p<0,05$ ) emerge che al giorno 1 il comportamento è statisticamente maggiore rispetto al giorno 10 ( $Z=-2,488$ ,  $p=0,013$ ) e rispetto al giorno 19 ( $Z=-2,568$ ,  $p=0,010$ ).





Dopo aver considerato il campione intero, sono state analizzate le cucciolate confrontandole nei singoli giorni (giorno 1, 10, 19) con il test di Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Di seguito (**tabella 3**) sono riportati i risultati statisticamente significativi con il test di Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ), che indicano l'esistenza di una differenza tra cucciolate in alcuni comportamenti materni di uno o più dei tre giorni presi in esame.

Comportamenti materni	giorni	Chi-quadrato( $\chi^2$ )	p
<b>Contact</b>			
	1	33,515	0,001
	10	30,907	0,001
	19	38,437	0,001
<b>Nursing</b>			
	1	32,116	0,001
	10	36,077	0,001
	19	38,042	0,001
<b>Licking</b>			
	1	23,487	0,005
	10	20,596	0,015
<b>Licking ag.</b>			
	1	26,894	0,001
	19	34,822	0,001
<b>M.asleep</b>			
	1	57	0,001
	19	57	0,001
<b>On side</b>			
	1	57	0,001

	10	57	0,001
	19	56,926	0,001
<b>On belly</b>			
	1	57	0,001
	10	57	0,001
	19	57	0,001
<b>Sitting</b>			
	1	57	0,001
	10	57	0,001
	19	57	0,001
<b>Standing</b>			
	1	57	0,001
	10	56,935	0,001
	19	57	0,001
<b>Walking</b>			
	1	56,962	0,001
	10	57	0,001
	19	57	0,001
<b>M.whelp.box</b>			
	1	57	0,001
	10	56,925	0,001
	19	56,982	0,001
<b>m.vs.p</b>			
	1	52,623	0,001
	10	57	0,001
	19	57	0,001
<b>M.away</b>			
	10	57	0,001
	19	57	0,001
<b>M.FCV.</b>			
	10	57	0,001

**Tabella 3:** test Kruskal Wallis. Comportamenti materni statisticamente significativi( $p < 0,05$ ).

Usando il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), ciascuna cucciolata è stata successivamente confrontata con il gruppo comprendente tutte le altre cucciolate.

Nelle tabelle sottostanti (**tabelle 4a-4l**), sono riportati per ciascuna cucciolata i comportamenti materni che risultano essere statisticamente significativi rispetto agli stessi del gruppo contenente tutte le altre cucciolate.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
Contact1	1	5	900	7,500	0,001
	tutte eccetto la 1	53	462		
Contact10	1	5	900	0,000	0,001
	tutte	53	444		

	eccetto la 1				
Contact19	1	5	900	0,000	0,001
	tutte eccetto la 1	53	583		
Nursing1	1	5	888	17,000	0,001
	tutte eccetto la 1	53	17		
Nursing10	1	5	882	2,000	0,001
	tutte eccetto la 1	53	157		
Nursing19	1	5	879	2,000	0,001
	tutte eccetto la 1	53	378		
Licking ag.10	1	5	23	62,500	0,048
	tutte eccetto la 1	53	0		

**Tabella 4a:** test di Mann Whitney. Cucciolata 1 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Licking ag.19	2	4	0	17,500	0,005
	tutte eccetto la 2	54	17,5		

**Tabella 4b:** test di Mann Whitney. Cucciolata 2 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Contact19	3	3	852	15,000	0,018
	tutte eccetto la 2	55	585		
Nursing19	3	3	785	21,000	0,031
	tutte eccetto la 2	55	380		
Licking ag.1	3	3	25	31,500	0,045
	tutte eccetto la 2	55	0		

**Tabella 4c:** test di Mann Whitney. Cucciolata 3 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Licking ag.1	4	7	0	94,500	0,025
	tutte eccetto la 4	51	0		

**Tabella 4d:** test di Mann Whitney. Cucciolata 4 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Licking1	5	5	8	17,000	0,001
	tutte eccetto la 5	53	0		

Licking10	5	5	10	41,000	0,001
	tutte eccetto la 5	53	0		
Licking ag.1	5	5	29	48,500	0,009
	tutte eccetto la 5	53	0		
Licking ag.10	5	5	10	62,500	0,048
	tutte eccetto la 5	53	0		
Licking ag.19	5	5	69	44,500	0,013
	tutte eccetto la 5	53	16		

**Tabella 4e:** test di Mann Whitney. Cucciolata 5 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Contact1	6	5	733	60,500	0,046
	tutte eccetto la 6	53	462		

**Tabella 4f:** test di Mann Whitney. Cucciolata 6 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Nursing1	7	7	0	82,000	0,017
	tutte eccetto la 7	51	59		
Licking10	7	7	2	109,500	0,032
	tutte eccetto la 7e	51	0		
Licking19	7	7	3	99,000	0,006
	tutte eccetto la 7	51	0		
Licking ag.19	7	7	1	90,000	0,031
	tutte eccetto la 7	51	25		

**Tabella 4g:** test di Mann Whitney. Cucciolata 7 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Contact1	8	7	22	49,000	0,002
	tutte eccetto la 8	51	566		
Nursing1	8	7	0	56,000	0,003
	tutte eccetto la 8	51	63		
Licking ag.1	8	7	0	94,500	0,025
	tutte eccetto la 8	51	0		

**Tabella 4h:** test di Mann Whitney. Cucciolata 8 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Contact19	9	9	75	18,000	0,001
	tutte eccetto la 9	49	631		
Nursing10	9	9	0	58,500	0,001
	tutte eccetto la 9	49	259		
Nursing19	9	9	60	27,000	0,001
	tutte eccetto la 9	49	412		
Licking ag.19	9	9	0	45,000	0,001
	tutte eccetto la 9	49	28		

**Tabella 4i:** test di Mann Whitney. Cucciolata 9 vs tutte.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code
Contact1	10	6	22,5	44,000	0,004
	tutte eccetto la 10	52	564,5		
Contact10	10	6	152,5	78,000	0,046
	tutte eccetto la 10	52	583,5		
Nursing1	10	6	0	80,500	0,046
	tutte eccetto la 10	52	59		
Nursing10	10	6	0	75,000	0,033
	tutte eccetto la 10	52	241,5		
Licking19	10	6	50	101,000	0,040
	tutte eccetto la 10	52	17,5		

**Tabella 4l:** test di Mann Whitney. Cucciolata 10 vs tutte.

Osservando le **tabelle 4a-4c-4f**, secondo il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), le madri delle cucciolate 1, 3 e 6, trascorrono statisticamente più tempo in contatto con i cuccioli (*contact*) rispetto al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate. In dettaglio, nella cucciolata 1 il *contact* è statisticamente maggiore sia al giorno 1 ( $U=7,500$ ,  $p=0,001$ ), sia al giorno 10 ( $U=0,000$ ,  $p=0,001$ ), sia al giorno 19 ( $U=0,000$ ,  $p=0,001$ ) rispetto a quello del gruppo delle altre cucciolate.

Nella cucciolata 3 il *contact* è statisticamente maggiore rispetto allo stesso del gruppo

delle altre cucciolate al giorno 19 ( $U=15,000$ ,  $p=0,018$ ).

Nella cucciolata 6 il *contact* è statisticamente maggiore rispetto a quello del gruppo delle altre cucciolate al giorno 1 ( $U=60,500$ ,  $p=0,046$ ).

Riguardo al *nursing*, la madre della cucciolata 1 allatta per un tempo statisticamente maggiore in tutti e tre i giorni presi in considerazione (1,10,19) rispetto al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate.

In dettaglio: nella cucciolata 1 il *nursing* è statisticamente maggiore sia al giorno 1 ( $U=17,000$ ,  $p=0,001$ ) sia al giorno 10 ( $U=2,000$ ,  $p=0,001$ ) sia al giorno 19 ( $U=2,000$ ,  $p=0,001$ ) rispetto a quello del gruppo delle altre cucciolate.

Nella cucciolata 3 il *nursing* al giorno 19 è statisticamente maggiore ( $U=21,000$ ,  $p=0,031$ ) rispetto al *nursing* del gruppo di cui fanno parte tutte le altre cucciolate.

Nella cucciolata 5 la madre trascorre statisticamente più tempo a leccare la zona anogenitale dei propri cuccioli in tutti i tre giorni presi in esame rispetto al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate.

In dettaglio: nella cucciolata 5 il *licking ag* è statisticamente maggiore sia al giorno 1 ( $U=48,5000$ ,  $p=0,009$ ), sia al giorno 10 ( $U=62,500$ ,  $p=0,48$ ) sia al giorno 19 ( $U=44,500$ ,  $p=0,013$ ) rispetto al gruppo delle altre cucciolate. Sempre nella cucciolata 5 il *licking* è statisticamente maggiore al giorno 1 ( $U=17,000$ ,  $p=0,001$ ) e al giorno 10 ( $U=41,000$ ,  $p=0,001$ ) rispetto al *licking* del gruppo delle altre cucciolate.

Riguardo al comportamento del *licking ag*, la cucciolata 1 al giorno 10 lo manifesta in maniera statisticamente maggiore ( $U=62,500$ ;  $p=0,048$ ) rispetto al gruppo delle altre cucciolate.

Lo stesso si verifica per la cucciolata 3 ma al giorno 1 ( $Z=31,500$ ;  $p=0,045$ ).

Riguardo al comportamento materno del *licking*, la cucciolata 7 al giorno 19 ( $U=109,500$ ,  $p=0,032$ ) e al giorno 10 ( $U=99,000$ ,  $p=0,006$ ) lo manifesta in maniera statisticamente maggiore rispetto al gruppo delle altre cucciolate. Nella cucciolata 10, il *licking* al giorno 19 è statisticamente maggiore ( $U=101,000$ ,  $p=0,040$ ) rispetto a quello del gruppo delle altre cucciolate.

Attraverso il test Mann-Whitney ( $p<0,05$ ) si è poi preceduto a confrontare ogni singola cucciolata con ogni altra cucciolata. I comportamenti materni statisticamente

significativi emersi sono stati principalmente il *nursing* e il *licking anogenital* e sono riportati in dettaglio nelle tabelle sottostanti (tabelle 5a-5m).

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
nursing1	1	5	888	0,001	0,001
	8	7	0		

**Tabella 5a:** test di Mann Whitney: Cucciolata 1 vs 8.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
nursing10	1	5	882	0,001	0,001
	9	9	0		

**Tabella 5b:** test di Mann Whitney. Cucciolata 1 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
licking ag.19	2	4	70	0,001	0,001
	9	9	0		

**Tabella 5c:** test di Mann Whitney. Cucciolata 2 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
nursing10	3	3	454	0,001	0,001
	9	9	0		
licking ag.19	3	3	19	0,001	0,001
	9	9	0		

**Tabella 5d:** test di Mann Whitney. Cucciolata 3 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
licking ag.1	4	7	0	0,001	0,001
	5	5	29		

**Tabella 5e:** test di Mann Whitney. Cucciolata 4 vs 5.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
nursing19	4	7	386	0,001	0,001
	9	9	60		

**Tabella 5f:** test di Mann Whitney. Cucciolata 4 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
licking ag.1	5	5	29	0,001	0,001
	8	7	0		

**Tabella 5g:** test di Mann Whitney. Cucciolata 5 vs 8.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
nursing10	5	5	390	0,001	0,001
	9	9	0		
licking1	5	5	8	0,001	0,001
	9	9	0		
licking ag.19	5	5	69	0,001	0,001
	9	9	0		

**Tabella 5h:** test di Mann Whitney. Cucciolata 5 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
nursing10	6	5	245	0,001	0,001
	9	9	0		

**Tabella 5i:** test di Mann Whitney. Cucciolata 6 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
contact19	8	7	581	0,001	0,001
	9	9	75		
nursing19	8	7	232	0,001	0,001
	9	9	60		
licking ag.19	8	7	41	0,001	0,001
	9	9	0		

**Tabella 5l:** test di Mann Whitney. Cucciolata 8 vs 9.

Comportamento materno	Cucciolata	numero cuccioli	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
contact19	9	9	75	0,001	0,001
	10	6	545,5		
nursing19	9	9	60	0,001	0,001
	10	6	446,5		
licking ag.19	9	9	0	0,001	0,001
	10	6	50		

**Tabella 5m:** test di Mann Whitney. Cucciolata 9 vs 10.

Secondo il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), nella cucciolata 1 il *nursing* al giorno 1 è statisticamente maggiore ( $U=0,001$ ,  $p=0,001$ ) rispetto alla cucciolata 8 e il *nursing* al giorno 10 è statisticamente maggiore ( $U=0,001$ ,  $p=0,001$ ) rispetto alla cucciolata 9.

Anche per la cucciolata 3, 5 e 6, il *nursing* al giorno 10 è statisticamente maggior ( $U=0,001$ ,  $p=0,001$ ) rispetto alla cucciolata 9.

Interessante è la presenza costante della cucciolata 9 (cucciolata di boxer) nei confronti diretti.

Nella cucciolata 2, 3, 5, 8 e 10, il *licking ag* al giorno 19 è statisticamente più espresso ( $U=0,001$ ,  $p=0,001$ ) rispetto alla cucciolata 9.

Nella cucciolata 5 il *licking ag* al giorno 1 è statisticamente maggiore (U=0,001, p=0,001) rispetto al *licking ag* 1 della cucciolata 4 e della cucciolata 8. Sempre nella cucciolata 5, il *licking* al giorno 1 è statisticamente più esibito (U=0,001, p=0,001) rispetto allo stesso nella cucciolata 9.

Nella cucciolata 4, 8 e 10, il *nursing* al giorno 19 è statisticamente più alto (U=0,001, p=0,001) rispetto allo stesso nella cucciolata 9.

Nella cucciolata 8 e 10, il *contact* al giorno 19 è statisticamente maggiore (U=0,001, p=0,001) rispetto al *contact* 19 nella cucciolata 9.

In un secondo momento sono state confrontate con il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ) le cucciolate con un numero di cuccioli minore o uguale a 5 (gruppo A), e quelle con più di 5 cuccioli (gruppo B). Sono emerse interessanti differenze statisticamente significative di seguito riportate (**tabella 6**).

Comportamento materno	Gruppo	numero cuccioli totali	mediane	U di Whitney	Mann-Sig. Asint. a 2 code (p)
contact1	A	22	618,5	233,00	0,009
	B	36	352		
contact10	A	22	650,5	204,500	0,002
	B	36	274,5		
contact19	A	22	667,5	179,000	0,001
	B	36	562,5		
nursing1	A	22	174	185,000	0,001
	B	36	0		
nursing10	A	22	436,5	182,500	0,001
	B	36	0		
nursing19	A	22	503,5	247,500	0,017
	B	36	375		
licking ag.1	A	22	17	205,500	0,001
	B	36	0		
licking ag.10	A	22	0	270,000	0,039

	B	36	0		
licking ag.19	A	22	41	198,500	0,001
	B	36	7		
m.asleep19	A	22	0	301,000	0,048
	B	36	0		
on side19	A	22	677	232,000	0,008
	B	36	411		
on belly1	A	22	0	281,000	0,041
	B	36	14		
on belly19	A	22	0	342,000	0,024
	B	36	0		
Standing1	A	22	27	222,500	0,005
	B	36	73		
Standing10	A	22	4	160,000	0,001
	B	36	13		
Standing19	A	22	17	240,000	0,012
	B	36	147		
walking10	A	22	0	69,000	0,001
	B	36	13		
walking19	A	22	14	151,000	0,001
	B	36	25		
m.whelp.box19	A	22	866	224,000	0,005
	B	36	690		
m.vs.p.10	A	22	0	319,000	0,029
	B	36	0		
m.vs.p.19	A	22	0	297,000	0,011
	B	36	0		

**Tabella 6:** test di Mann Whitney. Confronto tra cucciolate con numero di cuccioli  $\leq$  a 5 (A) e  $>$  di 5 (B).

Osservando la **tabella 6**, si nota che alcuni comportamenti materni nelle cucciolate meno numerose (numero di cuccioli  $\leq 5$ ), con il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), sono statisticamente espressi in misura maggiore in tutti i tre giorni presi in esame (giorno 1, 10,19), rispetto agli stessi nelle cucciolate numerose. Come ad esempio il *contact* al giorno 1 ( $U=233,000$ ,  $p=0,009$ ), al giorno 10 ( $U=204,500$ ,  $p=0,002$ ), e al giorno 19 ( $U=179,000$ ,  $p=0,001$ ); il *nursing* al giorno 1 ( $U=185,000$ ,  $p=0,001$ ), al giorno 10 ( $U=182,500$ ,  $p=0,001$ ), e al giorno 19 ( $U=247,500$ ,  $p=0,017$ ); il *licking anogenital* al giorno 1 ( $U=205,500$ ,  $p=0,001$ ), al giorno 10 ( $U=270,000$ ,  $p=0,039$ ) e al giorno 19 ( $U=198,500$ ,  $p=0,001$ ).

Il decubito laterale (*on side*), che consente un facile accesso alla linea mammaria, è statisticamente più presente al giorno 19 ( $U=232,000$ ,  $p=0,008$ ) nelle cucciolate meno numerose rispetto a quelle più numerose. La postazione quadrupedale (*standing*), che rende difficile o impedisce l'allattamento, è espressa in misura statisticamente minore nelle cucciolate meno numerose rispetto alle cucciolate con un numero di cuccioli  $> 5$  al giorno 1 ( $U=222,500$ ,  $p=0,005$ ), al giorno 10 ( $U=160,00$ ,  $p=0,001$ ), e al giorno 19 ( $U=240,000$ ,  $p=0,012$ ).

Il camminare all'interno della cassa parto (*walking*), è nel giorno 10 ( $U=69,000$ ,  $p=0,001$ ), e 19 ( $U=151,000$ ,  $p=0,001$ ), statisticamente più presente nelle cucciolate numerose rispetto a quelle meno numerose.

Le madri delle cucciolate meno numerose al giorno 19 permangono statisticamente più tempo ( $U=224,000$ ,  $p=0,005$ ) all'interno della cassa parto (*m.whelp.box*), rispetto alle stesse delle cucciolate più numerose.

E' stata inoltre calcolata con il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ) in entrambi i gruppi (A e B) la media dei comportamenti materni basandosi su tutti i primi 21 giorni di vita e, i dati statisticamente significativi emersi, confermano quelli osservati nell'analisi precedente (**tabella 7**).

Media del comportamento materno	Gruppo	numero cuccioli totali	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
Contact	A	25	602,06	234,00	0,009
	B	33	546,95		
Licking	A	25	2,59	272,500	0,048
	B	33	0,78		
licking ag.	A	25	50,20	47,500	0,001
	B	33	14,73		
licking+licking ag	A	25	48,88	58,500	0,001

	B	33	15,95		
m. asleep	A	25	49,90	221,000	0,005
	B	33	117,05		
on belly	A	25	11,33	268,500	0,039
	B	33	13,95		
m. whelp.box	A	25	823,76	256,000	0,024
	B	33	801,10		
m. vs.p.	A	25	0,00	254,000	0,017
	B	33	0,24		

**Tabella 7:** test di Mann Whitney. Confronto tra la media dei comportamenti materni nelle cucciolate con numero di cuccioli  $\leq 5$  e  $> 5$ .

A = insieme di cucciolate con un numero di cuccioli ciascuna  $\leq 5$

B = insieme di cucciolate con un numero di cuccioli ciascuna  $> 5$

Le madri delle cucciolate meno numerose esibiscono nell'arco dei 21 giorni un *contact* ( $U=234,000$ ,  $p=0,009$ ), un *licking* ( $U=272,500$ ,  $p=0,48$ ), un *licking ag* ( $U=47,500$ ,  $p=0,001$ ), un *licking+licking ag* ( $U=58,500$ ,  $p=0,001$ ) e un *m.whelp.box* ( $U=256,00$ ,  $p=0,024$ ) statisticamente maggiore rispetto alle madri delle cucciolate più numerose.

Con il test di Mann Whitney ( $p<0,05$ ), è stato indagato se esistesse una differenza fra cucciolate di madri primipare (gruppo C) e cucciolate di madri non primipare (gruppo D). Anche in questo confronto sono emerse numerose differenze statisticamente significative e sono riportate nella tabella sottostante (**tabella 8**).

Comportamento materno	Gruppo	numero cuccioli totali	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
contact1	C	25	126	269,500	0,025
	D	33	588		
contact19	C	25	631	283,000	0,042
	D	33	586		
nursing19	C	25	478	212,000	0,002
	D	33	352		
licking ag.19	C	25	46	199,500	0,001
	D	33	0		
on side19	C	25	634	253,000	0,012
	D	33	411		
on belly1	C	25	0	259,000	0,007
	D	33	14		
on belly10	C	25	0	264,000	0,001
	D	33	0		
on belly19	C	25	0	363,000	0,043
	D	33	0		
walking1	C	25	2	280,000	0,035
	D	33	18		
walking10	C	25	5	222,500	0,003
	D	33	11		

walking19	C	25	22	175,000	0,001
	D	33	25		
m.whelp.box1	C	25	886	171,000	0,001
	D	33	893		
m.whelp.box19	C	25	900	297,000	0,001
	D	33	710		
m.vs.p.10	C	25	0	325,000	0,015
	D	33	0		
m.vs.p.19	C	25	0	300,000	0,005
	D	33	0		

**Tabella 8:** test di Mann Whitney. Confronto tra cucciolate di madri primipare e madri pluripare.

C = insieme delle madri primipare

D = insieme delle madri pluripare

Con il test di Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), nelle madri primipare è emerso che il *licking ag* ( $U=199,500$ ,  $p=0,001$ ), così come il *contact* ( $U=283,000$ ,  $p=0,042$ ), il *nursing* ( $U=212,000$ ,  $p=0,002$ ), *on side* ( $U=253,000$ ,  $p=0,012$ ), e *m.whelp. box* ( $U=297,000$ ,  $p=0,001$ ), sono statisticamente maggiori al giorno 19 rispetto agli stessi nel gruppo delle madri pluripare.

Il decubito sternale (*on belly*) è statisticamente meno espresso al giorno 1 ( $U=259,000$ ,  $p=0,007$ ), ma lo è maggiormente al giorno 10 ( $U=264,000$ ,  $p=0,001$ ) e 19 ( $U=363,000$ ,  $p=0,043$ ) nelle madri primipare rispetto alle pluripare.

Inoltre, il *walking* e il *m.vs.p.* sono comportamenti statisticamente meno esibiti dalle madri primipare in tutti e tre i giorni presi in esame, come si può osservare nella **tabella 8**.

Riguardo il *m.whelp.box*, al giorno 19, le primipare lo manifestano in maniera statisticamente più marcata ( $U=297,000$ ,  $p=0,001$ ) rispetto alle pluripare che invece restano più tempo in cassa parto al giorno 1 ( $U=171,000$ ,  $p=0,001$ ).

E' stata inoltre calcolata in entrambi i gruppi (C e D) la media dei comportamenti materni basandosi su tutti i primi 21 giorni di vita e i risultati sono tutti statisticamente significativi e riportati nella tabella sottostante (**tabella 9**).

Emerge infatti che le madri primipare in media esibiscono un comportamento di *licking* e di *licking anogenital* statisticamente maggiore ( $U=205.500$ ;  $p=0.001$ ) rispetto alle madri pluripare. Le madri pluripare trascorrono statisticamente più tempo in posizione sternale (*on belly*) rispetto alle madri primipare ( $U=230.500$ ;  $p=0.004$ ) e camminano di più all' interno della cassa parto (*walking*) rispetto alle primipare ( $U=141.000$ ;  $p=0.001$ ). Madri pluripare esibiscono un *contact* con i loro cuccioli statisticamente maggiore ( $U=273.00$ ;  $p=0.028$ ) rispetto alle madri primipare; madri primipare esibiscono un

comportamento di *m. asleep*

statisticamente maggiore (U=286.000; p=0.046) rispetto alle madri pluripare; madri primipare esibiscono la posizione di *sitting* in maniera statisticamente maggiore (U=265.000; p=0.020) che le madri pluripare; *m. vs p.* è esibito in modo statisticamente maggiore dalle madri pluripare (U=164.000; p=0.001); *m. away* e un comportamento espresso in modo statisticamente maggiore nelle madri primipare (U=283.00; p=0.040).

Media del comportamento materno	Gruppo	numero cuccioli totali	mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
Contact	C	25	455,62	273,00	0,028
	D	33	584,21		
Licking	C	25	2,10	275,500	0,031
	D	33	0,71		
licking ag.	C	25	38,65	190,500	0,001
	D	33	16,26		
licking+licking ag	C	25	33,05	202,500	0,001
	D	33	16,81		
m. asleep	C	25	67,64	286,000	0,046
	D	33	50,00		
on belly	C	25	0,35	230,500	0,004
	D	33	13,95		
Sitting	C	25	71,19	265,000	0,020
	D	33	35,00		
Walking	C	25	6,35	141,000	0,001
	D	33	20,29		
m. vs.p.	C	25	0,00	164,000	0,001
	D	33	0,24		
m. away	C	25	0,90	283,00	0,040
	D	33	0,14		

**Tabella 9:** test di Mann Whitney. Confronto tra la media dei comportamenti materni nelle cucciolate di madri primipare e di madri pluripare.

C = insieme delle madri primipare

D = insieme delle madri pluripare

Poiché nel campione totale di 10 cucciolate, 3 appartengono alla razza Pastore Belga Groenendael, si è scelto di valutare se in questi dati iniziali esistesse una differenza nell'espressione delle cure materne in questa razza rispetto al gruppo rappresentato da tutte le altre. E' stata quindi calcolata in entrambi i gruppi (gruppo "P.B." e gruppo "tutte"), tramite il test di Mann Withney ( $p < 0,05$ ), la media dei comportamenti materni basandosi su tutti i primi 21 giorni di vita e i risultati statisticamente significativi sono riportati nella tabella sottostante (**tabella 10**).

Si può osservare che *m. vs.p* (U=225,000, p=0,043), *walking* (U=172,000, p=0,004) e

*m.whelp.box* (U=237,00, p=0,035), sono comportamenti materni statisticamente maggiori nell'arco dei 21 giorni nel gruppo costituito dalle cucciolate di Pastore Belga Groenendael rispetto al gruppo costituito da tutte le altre.

Media comportamento materno	Gruppo	Numero cuccioli totali	Mediana	U di Mann-Whitney	Sig. Asint. a 2 code (p)
Walking	P.B.	16	20,29	172,00	0,004
	tutte	42	8,10		
<i>m.whelp.box</i>	P.B.	16	816,81	237,000	0,035
	tutte	42	801,10		
<i>m.vs.p.</i>	P.B.	16	0,24	225,000	0,043
	tutte	42	0		
<i>m.away</i>	P.B.	16	0,14	172,500	0,004
	tutte	42	0,26		

**Tabella 10:** test di Mann Whitney. Confronto tra la media dei comportamenti materni nelle cucciolate di pastore belga e in quelle appartenenti ad altre razze.

P.B.: gruppo costituito dalle cucciolate appartenenti alla razza pastore belga Groenendael

tutte: gruppo costituito da tutte le altre cucciolate

## Capitolo 4: Discussione:

I risultati ottenuti indicano che in generale, nell'intero campione esaminato, la maggior parte delle differenze nei comportamenti materni tra cucciolate riguardano il giorno 19 e questo fa pensare che con il trascorrere del tempo certe differenze diventino più evidenti.

Il comportamento di allattamento e di leccamento anogenitale sembra aumentare nell'arco dei giorni, essendo verso la fine delle tre settimane di osservazione maggiore rispetto all'immediato post-partum. Il decubito laterale, che indica la disponibilità ad allattare da parte della madre, è risultato molto alto nei primi giorni di vita delle cucciolate, mentre la postazione quadrupedale, che acconsente meno facilmente l'allattamento, è risultata statisticamente maggiore verso la fine del periodo di videoriprese.

Un altro dato interessante riguarda la quantità di tempo speso dalle madri all'interno della cassa parto che sembra essere maggiore nei primi giorni di vita dei cuccioli, sempre considerando l'intero campione.

In generale, col passare dei giorni, le madri trascorrono meno tempo all'interno della cassa parto, si allontanano di più dai cuccioli, camminando e rimanendo più tempo in posizione quadrupedale.

Nel confronto tra cucciolate sono emerse delle differenze statisticamente significative in alcuni comportamenti della madri che sembrerebbero indicare che nelle cucciolate meno numerose le cure materne sono più intense: le madri restano statisticamente più tempo in contatto con la cucciolata e all'interno della cassa parto, allattano e dedicano maggiore tempo al leccamento anogenitale dei cuccioli, assumendo posizioni che facilitano l'accesso alla linea mammaria.

Sono emerse informazioni interessanti anche riguardo le madri primipare che, rispetto alle madri che hanno avuto esperienze riproduttive precedenti, dedicano mediamente più tempo al leccamento dei cuccioli e, specialmente nella terza settimana di vita, restano più tempo nella cassa parto in contatto con i cuccioli, leccandoli e allattandoli e assumendo posizioni che facilitano l'allattamento.

Nella razza di Pastore Belga Groenendael, particolarmente rappresentata in questa ricerca, le madri sembrano trascorrere un tempo maggiore nella cassa parto rispetto alle altre razze, muovendosi in maniera più marcata in direzione dei cuccioli all'interno della cassa parto.

Nella presente ricerca è stato analizzato il comportamento materno sull'intero campione oggetto dello studio, in tre giorni specifici (1-10-19), equamente distanziati tra loro e col massimo tempo tra loro, per ottenere un andamento dei comportamenti materni durante le prime tre settimane di vita dei cuccioli.

Un dato interessante riguarda la quantità di tempo speso dalla madre all'interno della cassa parto

(*m.whelp.box*), comportamento che al giorno 1 è risultato statisticamente maggiore rispetto al giorno 10 e rispetto al giorno 19, così come il comportamento di camminare verso i cuccioli da parte della madre (*m.vs.p.*), che è risultato statisticamente maggiore al giorno 1 rispetto al giorno 10, in accordo con quanto riportato da Bleicher (1962) e Beaver (2009), i quali riferiscono che le madri, nelle prime 24 ore del post-partum, rimangono a contatto con i cuccioli nella cassa parto, allontanandosi di rado da essi.

Tutte le madri hanno trascorso dunque molto tempo in contatto corporeo con i cuccioli soprattutto nei primi giorni dopo il parto, poi il contatto ha iniziato a ridursi gradatamente man mano che i cuccioli crescevano, in accordo con studi precedenti condotti sui ratti (Rosenblatt e Lehrman, 1963; Bolles e Woods, 1964; Grotta e Ader, 1969), nei golden hamsters (Swanson e Campbell, 1979; Guerra e Vieira, 1990; Guerra *et al.*, 1991), e nei cani (Rheingold, 1963; Pal, 2005).

Nello studio condotto da Rheingold (1963), su 5 cani da laboratorio di diverse razze, il contatto tra le madri ed i cuccioli nel periodo compreso tra il 1-3 e il 13-15esimo giorno, tendeva rapidamente a ridursi e la madre lasciava soli i cuccioli sempre più spesso; questa poteva restare anche con loro all'interno della cassa parto, ma non a contatto con essi, oppure uscire proprio dalla cassa parto, in accordo con i risultati della nostra ricerca. A partire dal 15esimo giorno, il contatto (*contact*), sempre nello studio di Rheingold, subiva un nuovo incremento in relazione al fatto che i cuccioli, avendo acquisito una maggiore competenza visiva e locomotoria, propria del periodo di transizione, si muovevano maggiormente verso la madre.

Nel nostro studio è emerso che in effetti le madri, dopo una riduzione di permanenza nella cassa parto al 10 giorno, al 19 giorno, e quindi alla terza settimana, hanno incrementato lievemente il tempo speso all'interno della stessa, nonostante la postura di *standing* (stazione quadrupedale) e *walking* (camminare all'interno della cassa parto) siano le più manifestate in questo periodo, considerando sempre l'intero campione.

Nello studio condotto da Rheingold (1963), ciascuna madre con la sua cucciolata è stata osservata durante 4 sessioni di 15 minuti al giorno, tra le otto di mattina e le sei del

pomeriggio; le madri ed i piccoli erano in contatto per quasi tutti e quindici minuti di osservazione durante la prima settimana di vita delle cucciolate, constatazione in accordo con quanto riportato da MacDonald e Carr (1995), i quali riferiscono che in effetti il contatto tra la madre ed i cuccioli è massimo durante la prima settimana post-partum. La frequenza e la durata del contatto durante le sessioni di osservazione si riduceva poi a partire dalla 4° settimana (Rheingold, 1963).

Anche lo studio condotto da Pal (2005), è in accordo con i risultati della nostra ricerca; l' autore ha studiato le cure parentali in cani randagi a Katwa town, in India. Sei cagne in lattazione sono state studiate per 13 settimane dal post-partum, e ciascuna cagna è stata osservata tre volte al giorno con periodi di osservazione di 30 minuti ciascuno; nel suddetto studio è stata osservata una correlazione negativa tra la durata del contatto tra madre e prole in qualsiasi sessione di osservazione e l' età dei cuccioli, in accordo con la nostra ricerca. Le femmine nello studio di Pal (2005), sono risultate in contatto con i loro piccoli per quasi tutti e trenta minuti di osservazione durante la prima settimana dopo il parto; esse riposavano anche con i loro cuccioli, comportamento che aiuta la prole a mantenere la temperatura corporea, dal momento in cui essi inizialmente sono incapaci di farlo (Jensen e Ederstrom, 1955; Rheingold, 1963; Carlson, 2001; Pal, 2005; Broom e Fraser, 2007) . Il contatto madre-prole è stato osservato per un tempo maggiore rispetto che nello studio di Rheingold (1963); difatti nello studio di Pal (2005), è stato presente fino alla sesta settimana di vita dei cuccioli, per poi ridursi gradatamente a partire dalla settima settimana; questa modifica nel comportamento può essere legata sia a fattori ormonali che a modifiche nell' aspetto dei cuccioli (Pal, 2005).

Czerwinski e colleghi (2014), in uno studio pilota hanno videoripreso per quattro settimane in sessioni di 15 minuti una cucciolata di tre Labrador retrievers con la loro madre; gli autori riportano che la madre spendeva circa il 48% del tempo totale osservato all'interno della cassa parto e che l' ammontare del tempo speso con i cuccioli all' interno della stessa si è ridotto drammaticamente dalla prima settimana (95%) alla quarta settimana (2%) del post-partum, in accordo con i risultati della nostra ricerca.

Anche Konig e Marki (1987), in uno studio condotto su *Mus domesticus* riportano che inizialmente la madre trascorrevva quasi tutto il suo tempo a contatto con i cuccioli nel nido (Williams e Scott, 1953; Ewer, 1968) e non rimaneva senza contatto corporeo con i cuccioli fino al 9° giorno post-partum (Konig e Marki, 1987).

L'allattamento (*nursing*) è una attività strettamente correlata al contatto; il contatto è una condizione necessaria affinché il *nursing* avvenga (Cowie *et al.*, 1951; Rheingold,

1963).

In particolare, analizzando l'intero campione, è emerso che il comportamento di allattamento (*nursing*) è risultato statisticamente maggiore al giorno 19 rispetto al giorno 1 e al giorno 10, nonostante il decubito laterale della madre (*on side*), che espone al massimo i capezzoli e facilita il *nursing* (Rheingold, 1963), sia risultato statisticamente maggiore al giorno 1 e 10 rispetto al giorno 19. Inoltre, la posizione quadrupedale ed il camminare all'interno della cassa parto (*standing* e *walking*), che rendono meno accessibile la regione mammaria delle femmine, hanno subito un incremento con l'accrescersi dei cuccioli, in accordo con quanto riferito da Korda e Brewinska (1977). Tali autori riportano che in effetti la posizione seduta (*sitting*) nelle cagne oggetto del loro studio, ha iniziato a manifestarsi a partire dal 13esimo giorno in poi.

Probabilmente questi risultati potrebbero essere nel complesso legati ad un allattamento (*nursing*) più attivo da parte dei cuccioli, piuttosto che una volontà di allattare da parte delle madri; Rheingold (1963), riporta che in effetti a partire dal 13-15esimo giorno dopo il parto, erano molto più frequentemente i cuccioli a ricercare il contatto con la madre e a muoversi verso di essa; Rosenblatt e Lehrman (1963), e Schneirla (1961), riferiscono attraverso studi condotti sui ratti, che durante la fase neonatale, fino al 12-14esimo giorno dopo il parto, era la madre a richiamare i piccoli al *nursing*, esponendogli la regione mammaria per facilitare l'allattamento, mentre durante il periodo di transizione, erano anche i cuccioli a muoversi verso la madre per nutrirsi.

Il comportamento materno di *Mus domesticus* è stato quantitativamente analizzato da Konig e Marki (1987), osservando le femmine con la loro prole durante l'intero periodo di allattamento di 28 giorni; durante le prime tre settimane il *nursing* (allattamento) occupò il 92% del comportamento materno, ed inizialmente era la madre a dare l'avvio all'attività di *nursing*; il *nursing* iniziò ad essere avviato dai cuccioli a partire dal 13esimo giorno, e sempre più frequentemente dal 17esimo-22esimo giorno. in accordo con i risultati della nostra ricerca.

Nello studio condotto da Pal (2005), su cani femmine randagie in India era emerso che l'alimentazione latte da parte della madre era stata continua per 10-11 settimane (mentre nello studio di Rheingold (1963), il *nursing* volse al termine più precocemente, intorno alla 7° settimana) e la durata del *nursing* in ciascuna sessione di osservazione di 30 minuti aveva raggiunto un massimo di 27,54 minuti durante la prima settimana, similmente a quanto precedentemente osservato da Rheingold (1963), mentre dalla

nostra ricerca è emerso che l'attività di *nursing* è invece maggiore al 19esimo giorno di osservazione; le cure materne nel nostro studio si sono dimostrate essere dunque tendenzialmente più lunghe nel tempo rispetto allo studio di Rheingold.

Anche in studi condotti sui cani da Korda e Brewinska (1977), è emerso che l'attività di *nursing* subiva un decremento a partire dal 15-16esimo giorno di vita dei cuccioli, diversamente da quanto osservato nella nostra ricerca, e che solo sostituendo i cuccioli della cagna con altri più giovani, tale attività subiva un nuovo incremento.

La conformazione del corpo della madre e specialmente le posture assunte, hanno fatto sì che l'allattamento (*nursing*) potesse avvenire più facilmente o più difficilmente; con la madre in posizione *sitting* (seduta) era più difficile per i cuccioli nutrirsi piuttosto che con la madre in posizione *on side* (decubito laterale).

Secondo Rheingold (1963), durante l'allattamento le madri potevano modificare la loro posizione in relazione a spinte o pianti dei cuccioli; esse potevano dunque sdraiarsi, posizionarsi ulteriormente su di un fianco, allungarsi o alzare o estendere una zampa; come risultato, i cuccioli avevano un accesso più facilitato alla regione mammaria.

La posizione adottata da una cagna o da una gatta è quella che consente un accesso confortevole ai capezzoli da parte di neonati relativamente immobili (Hartsock e Graves, 1976; Broom e Fraser, 2007).

Per rendere invece meno favorevole l'allattamento, la cagna può assumere posizioni del corpo in cui i capezzoli risultino più difficili da raggiungere e che creino maggiore sforzo ai cuccioli per l'attività di allattamento (*nursing*) (Rheingold, 1963; Mech, 1970; Packard *et al.*, 1992; Malm e Jensen, 1996).

Per quanto riguarda il risultato di leccamento della zona anogenitale del cucciolo (*licking ag*), il test di Wilcoxon ( $p < 0,05$ ) ha rilevato una differenza statisticamente significativa, con *licking ag.* al giorno 19 statisticamente maggiore di *licking ag.* al giorno 1.

Il leccamento della zona anogenitale del cucciolo (*licking anogenital*) è stato presente dunque dal primo giorno di vita della cucciolata, e tale attività è andata progressivamente aumentando con il passare dei giorni, con un *licking* statisticamente maggiore alla fine del periodo analizzato.

Il *licking* è dimostrato assolvere svariate funzioni: stimolare il riflesso perineale dei cuccioli (*licking anogenital*) (Rheingold, 1963; Dunbar e colleghi, 1981; Houpt, 2011), determinando l'escrezione di urine e feci e la loro ingestione da parte della madre può non essere vista (la sua lingua è grande, i cuccioli sono piccoli ed anche le loro escreta

probabilmente sono di piccole dimensioni) (Reinghold, 1963; Dunbar *et al.*, 1981), svegliare i cuccioli dal sonno, stimolare l' allattamento, recuperarli e riportarli nel nido (Rheingold, 1963; Dunbar *et al.*, 1981; Houpt, 2011). In generale, la regione perineale che comprende la zona dell' ano, lo sbocco dell' apparato urinario, l'addome e la parte posteriore del corpo, è stata leccata dalla madre (*licking anogenital*) più spesso rispetto ad altre zone come la schiena o la testa (*licking*) (Rheingold, 1963; Dunbar *et al.*, 1981). L'immaturità del sistema neurovegetativo del cucciolo alla nascita fa sì che le funzioni escrettrici non siano autonome e che il cucciolo debba essere stimolato dalla madre (Pageat, 1999).

Secondo Reinghold (1963) e Dunbar e colleghi (1981), il *licking anogenital* nella cagna è presente dal primo giorno di vita della prole, in accordo con la nostra ricerca, raggiunge il picco durante il 4-6° giorno, diversamente da quanto emerso nel nostro studio, poi si riduce gradatamente fino a comparire non frequentemente a partire dal 42° giorno post partum.

Nello studio pilota su cani Labrador retrievers condotto da Czerwinski e colleghi (2014), è emerso che la madre spendeva gran parte del tempo (circa il 20%) all' interno della cassa parto a leccare i cuccioli (sia *licking anogenital* che *licking*) durante le prime quattro settimane post-partum, similmente a quanto riscontrato nella nostra ricerca.

Dunbar e colleghi (1981) e Ranson (1981), riferiscono che il leccamento della zona anogenitale del cucciolo (*licking anogenital*) nella cagna si riduce rapidamente a partire dal ventesimo giorno post-partum per poi scomparire intorno a trentesimo giorno dalla nascita dei piccoli. La riduzione dell' attività di *licking anogenital* da parte della madre coincide con l' acquisizione della capacità di urinare e defecare da soli dei cuccioli.

Dopo aver considerato il campione intero, sono state analizzate le cucciolate confrontandole nei singoli giorni (giorno 1, 10, 19), per poi confrontare ogni singola cucciolata con ogni altra cucciolata.

Dalla prima analisi sono risultate delle evidenti differenze nelle cure materne apportate dalle diverse madri alle rispettive cucciolate; difatti, le madri delle cucciolate 1, 3 e 6, trascorrono statisticamente più tempo in contatto con i cuccioli (*contact*) nei tre giorni presi in esame (giorno 1, 10 e 19), rispetto al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate.

Riguardo al *nursing* (allattamento), la madre della cucciolata 1 allatta per un tempo statisticamente maggiore in tutti e tre i giorni presi in considerazione (1,10,19) rispetto

al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate.

Nella cucciolata 5 invece, la madre trascorre statisticamente più tempo a leccare la zona anogenitale dei propri cuccioli in tutti i tre giorni presi in esame rispetto al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate.

Per quanto riguarda il comportamento materno di *licking*, pur essendo presenti delle differenze statisticamente significative tra alcune femmine (cucciolata 7 e 10), rispetto al gruppo composto dalle madri delle altre cucciolate, queste differenze non sono evidenti in tutti e tre i giorni presi in esame.

Dal confronto di ogni singola cucciolata con ogni altra cucciolata, i comportamenti materni statisticamente significativi emersi sono stati principalmente il *nursing* (allattamento) e il *licking anogenital* (leccamento della zona anogenitale del cucciolo).

Dai risultati è possibile evidenziare la presenza di una grande variabilità comportamentale tra madre e madre, ma anche la presenza di differenze da un giorno all'altro nella stessa madre, come riportato anche da Rheingold (1963), e Pal(2005).

Interessante è la presenza costante della cucciolata 9 (cucciolata di boxer) nei confronti diretti,

in cui la madre sembra manifestare minori cure materne rispetto alle altre cucciolate.

Broom e Fraser (2007), riferiscono che in effetti il comportamento materno è un fenomeno estremamente complesso, e che può esistere un alto grado di variabilità sia tra madri di differenti specie, sia tra madri appartenenti alla stessa specie.

Questo è in accordo con quanto riportato da uno studio condotto sulle variazioni naturali nelle cure materne in ratti Long- Evans (Meaney,2001; Champagne, 2008). In questo studio in particolare veniva valutata la frequenza con la quale le femmine si impegnavano nell' LG (*licking-grooming*), che variava notevolmente tra gli individui (Champagne *et al.*, 2003; Champagne, 2008). Così, le femmine possono essere classificate come impegnate in alti, medi, o bassi livelli di LG materno (Francis *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 2002; Champagne *et al.*, 2003; Champagne, 2008).

In particolare, secondo Champagne e colleghi (2003), le differenze individuali nel comportamento di *licking-grooming* sono stabili nelle cucciolate successive e non sono associate a differenti dimensioni delle cucciolate, al peso allo svezzamento dei cuccioli né al genere nella composizione della cucciolata (maschi vs. femmine); nel complesso questi risultati indicano notevoli, normali variazioni nel *licking-grooming* nel ratto che sono stabili e individuali caratteristiche delle madri di ratto.

Il fatto che esistono delle differenze individuali nel comportamento materno in diverse

specie sembrerebbe contraddire l'idea che il comportamento materno è necessariamente la conseguenza inevitabile degli ormoni della gestazione in combinazione con la presenza del neonato; nelle scimmie ad esempio le differenze individuali nel comportamento materno, secondo alcuni autori, sono stabili e sono comunemente trasmesse da madre a figlia (Fairbanks, 1989; Berman, 1990; Champagne *et al.*, 2003). Fairbanks (1996), notò che anche se un particolare pattern di cure materne di una scimmia femmina poteva essere influenzato da variabili sociali ed ecologiche, le differenze individuali nel pattern di cure materne tra le varie femmine risultavano relativamente costanti quando le femmine esaminate si trovavano in condizioni simili. Anche Pal (2005), nel suo studio su femmine randagie in India, riporta delle differenze individuali nell'espressione del comportamento materno da parte delle madri oggetto dello studio, soprattutto per quanto riguarda il *contact* con i cuccioli, mentre per quanto concerne in *nursing*, le differenze nella frequenza di tale comportamento più che individuali erano legate ad un fattore temporale.

Rheingold (1963), nella sua ricerca ha evidenziato un'elevata variabilità di comportamento, sia tra le madri oggetto dello studio, sia da un giorno all'altro per la stessa madre, non considerando però né gli effetti della razza (le femmine oggetto dello studio appartenevano a razze diverse, quali Cocker spaniel, Sheltie brown, Sheltie black, Sheltie merle e Beagle), né le dimensioni delle cucciolate, né l'età della madre o il numero di parti, sulle differenze riscontrate.

Dunque secondo questi autori esistono effettivamente delle differenze individuali nell'espressione delle cure materne, in accordo con i risultati della nostra ricerca.

Le cure materne sono state successivamente valutate in relazione al fatto che le madri fossero primipare o pluripare (secondo o terzo parto); nella nostra ricerca erano presenti 5 madri primipare e 5 madri pluripare.

Dai risultati emersi, le madri primipare, rispetto alle pluripare trascorrono più tempo all'interno della cassa parto al giorno 19, a contatto con i cuccioli, allattandoli e leccando la zona anogenitale, ed assumendo posture che facilitano l'accesso alla regione mammaria. Nelle madri primipare, la postura *on belly* (decubito sternale) che rende molto difficile l'allattamento, è statisticamente meno espressa al giorno 1 ma più presente al giorno 10 e al giorno 19.

Inoltre, il muoversi verso i cuccioli (*m.vs.p.*) e il camminare all'interno della cassa parto (*walking*) sono stati esibiti statisticamente meno nelle madri primipare nei tre giorni

considerati rispetto alle madri pluripare.

E' stata inoltre calcolata in entrambi i gruppi la media dei comportamenti materni basandosi su tutti i primi 21 giorni di vita, ed emerge infatti che le madri primipare in media esibiscono un comportamento di *licking* e di *licking anogenital* statisticamente maggiore rispetto alle madri pluripare. Le madri pluripare trascorrono statisticamente più tempo in posizione sternale (*on belly*) rispetto alle madri primipare e camminano di più all' interno della cassa parto (*walking*) rispetto alle primipare.

Le madri pluripare esibiscono mediamente un *contact* con i loro cuccioli ed un *m. vs. p.* (muoversi verso i cuccioli) statisticamente maggiori rispetto alle madri primipare; le primipare esibiscono un comportamento di *m. asleep* (dormire nella cassa parto), di *sitting* (postura seduta) e di *m. away* (allontanarsi dai cuccioli all'interno della cassa parto), statisticamente maggiori rispetto alle madri pluripare.

Questi risultati preliminari suggeriscono interessanti differenze nel comportamento materno tra madri primipare e madri pluripare nella specie canina.

Le femmine primipare si differenziano dunque per il loro comportamento materno nel post-partum dalle femmine pluripare?

Pochi studi sono stati condotti sulla specie canina per descrivere le cure materne da un punto di vista quantitativo e qualitativo nelle prime settimane post-partum (Reinghold, 1963; Pal, 2005; Czerwinski, 2014), e nessuno di questi ha preso in considerazione l' esperienza riproduttiva della femmina.

Può avere senso ipotizzare che un'esperienza materna iniziale abbia un impatto sulla futura competenza ed efficienza materna, dal momento in cui una madre con esperienza dovrebbe aver imparato come gestire al meglio il proprio neonato (Numan e Insel, 2004; Poindron, 2005).

Broom e Fraser (2007), riferiscono che certi aspetti delle cure materne mostrano dei miglioramenti con i parti successivi.

Un miglioramento nel comportamento materno tra il primo parto ed il successivo è stato ben documentato nelle pecore (Poindron, 1995; Houpt, 2011); questi autori riportano infatti che problemi comportamentali materni al momento del parto possono essere osservati nel 50% o più delle pecore primipare.

Houpt (2011), riferisce che pecore primipare sottoposte a taglio cesareo, rifiutano sistematicamente i loro agnelli, mentre pecore pluripare sottoposte alla medesima procedura, accettano prontamente il loro neonato, indicando l' importanza in questa specie di una precedente esperienza riproduttiva.

Altri studi d' altra parte hanno mostrato che l' esperienza di maternità non ha alcun effetto sul comportamento materno o sulla relazione madre-neonato. Anche le *motherless mothers monkey* che si comportano in maniera inadeguata nei confronti del loro primo neonato, appaiono comportarsi normalmente verso il loro secondo figlio (Ruppenthal *et al.*, 1976; Kemps *et al.*, 1989).

Diversi ricercatori, attraverso esperimenti in animali di laboratorio o in condizioni di cattività, hanno osservato gli effetti del numero di parti sul rendimento del comportamento materno in femmine di roditore e di altre specie di mammiferi, ma i risultati purtroppo sono spesso contraddittori (Numan e Insel, 2004).

La sopravvivenza della prole in alcuni studi ed in alcune specie sembra migliorare significativamente con l' esperienza come nel *Peromyscus polionotus* (Margulis *et al.*, 2005), nei ratti (Cohen e Bridges, 1981), nei tamarindi (Tardif *et al.*, 1984), nei gerbilli (Salo e French, 1989), nei cercopitechi (Fairbanks, 1990), e nelle arvicole di prateria (Wang e Novak, 1994).

Brown e colleghi (1999), osservarono che maggiore era il grado di esperienza della madre, maggiore era il tasso di sopravvivenza e l' incremento di peso dei cuccioli (Foyer *et al.*, 2013).

In molti mammiferi, le femmine primipare hanno minor successo nell' allevamento della prole, sia in termini di peso alla nascita che di numero totale di cuccioli sopravvissuti (Wang e Novak, 1994; Baker *et al.*, 1996).

Uno studio condotto da Wang e Novak (1994), su arvicole di prateria riporta che la multiparità è associata ad un miglioramento del comportamento materno; questo potrebbe essere il risultato di uno o più dei seguenti elementi: esperienza ed età della madre, maturazione fisica e modifiche nella competenza all' allattamento (Numan e Insel, 2004).

Swanson e Campbell (1979), compararono il comportamento materno in femmine primipare e multipare (al secondo parto) di golden hamsters durante la gestazione e nei 24 giorni di lattazione successivi al parto, nei confronti rispettivamente della loro prima e seconda nidiata. Le madri primipare mostrarono in modo significativo un maggiore livello di *sniffing* e *licking* rispetto a quello mostrato dalle pluripare; nonostante questa piccola differenza, la composizione globale del comportamento materno (ad esempio quantità di cure e costruzione del nido) non presentava differenze tra i due gruppi; i risultati di questi autori concordano con altri studi su femmine di ratto primipare che esibivano livelli identici di cure materne rispetto alle madri pluripare (Wiesner e Sheard,

1933; Beach e Jaynes, 1956; Rosenblatt e Lehrman, 1963). Va comunque notato tuttavia che le madri primipare nello studio di Swanson e Campbell (1979), differivano dalle pluripare per età, dimensioni e forza fisica.

Moltz e Robbins (1965), dai loro studi sui ratti non riportano differenze nella durata del *nursing* nel periodo successivo al parto, mantenendosi questo ad un livello abbastanza alto per l'intero episodio di cure materne, sia nelle madri primipare che pluripare.

Nella nostra ricerca abbiamo riscontrato che le madri primipare, al 19esimo giorno post-partum, passavano più tempo nella cassa parto a contatto diretto con i cuccioli e avevano livelli maggiori di *licking* e *licking anogenital*, risultato anche dalla media dei 21 giorni esaminati, in accordo con quanto riferito da Swanson e Campbell (1979). Inoltre, anche l'allattamento (*nursing*) è risultato maggiore nelle primipare rispetto alle madri pluripare (contrariamente a quanto riportato da Moltz e Robbins, 1965), insieme al decubito laterale (*on side*) che facilita l'allattamento; difatti, il decubito sternale (*on belly*), che è considerata una postura del corpo che non permette l'accesso alla regione mammaria, era manifestata maggiormente nelle madri pluripare rispetto alle primipare il primo giorno dopo il parto.

Carlier e Noirot (1965) nei ratti, Swanson e Campbell (1979) nei criceti, Eib-Eibesfeldt (1960,1961) e Beinest-Noirot (1961) nei topi, hanno riscontrato che il comportamento di recupero della prole (*retrieving behaviour*) era migliore nelle madri pluripare rispetto a quello delle madri primipare; le femmine multipare recuperavano più rapidamente e con meno rischio di cadute i loro piccoli, in contrasto però con quanto osservato da Beach e Jaynes (1965) e Moltz e Robbins (1965), che invece non riscontrarono in ratti di laboratorio (*Rattus Norvegicus*) differenze nella velocità di recupero dei cuccioli tra femmine primipare e multipare.

C'è però da considerare che le madri pluripare negli studi di Carlier e Noirot (1965) e Swanson e Campbell (1979), erano più anziane rispetto alle madri primipare e probabilmente anche fisicamente più forti e quindi maggiormente in grado di riportare i cuccioli al nido.

Le madri al primo parto sono in genere più giovani rispetto alle femmine pluripare e dunque l'età materna, piuttosto che il numero di parti, potrebbe risultare una variabile importante nel determinare la competenza del comportamento materno nella femmina (Numan e Insel, 2004; Schino *et al.*, 1995).

Diversi studi hanno confrontato il comportamento materno di scimmie primipare e pluripare, riportando che le madri pluripare tendono ad essere meno protettive e ad

avere un maggiore tasso di rigetto nei confronti dei propri neonati rispetto a madri primipare (Seay, 1966; Mitchell e Stevens, 1968; Mitchell e Brandt, 1970; Kuyk *et al.*, 1977; Hooley e Simpson, 1981; Fairbanks, 1988; Tanaka, 1989); purtroppo nessuno di questi studi ha considerato i possibili effetti dell'età materna sulle differenze comportamentali rilevate, pertanto non si può escludere che in alcuni o in tutti gli studi sopra citati, gli effetti attribuiti all'esperienza materna fossero in realtà causati dall'età delle madri (Schino *et al.*, 1995).

Schino e colleghi (1995), hanno infatti ipotizzato che i cambiamenti fisiologici e psicologici associati ad una piena maturazione, fanno sì che una femmina di Macaco risulti meno ansiosa, abbia una competenza maggiore nel far fronte a condizioni stressanti legate all'allevamento dei piccoli e abbia una migliore capacità di individuare situazioni sociali potenzialmente dannose per il proprio neonato. Sembra pertanto che nei primati, quando l'esperienza riproduttiva o il numero di parti sono mantenuti costanti, la protezione nei confronti della propria prole e il contatto con essa tenda a ridursi con l'età e la maturazione della madre.

Questo è in contrasto con quanto riferito da altri autori che hanno riscontrato che nelle scimmie, la protezione e restrizione nelle madri primipare è il risultato di una iperattenzione associata all'ansia e suscitata dalla novità di avere un neonato proprio (Kemps e Timmermans, 1984). Dall'esperienza con il proprio piccolo e quindi con i parti successivi, la madre di scimmia sembrava imparare a comportarsi in maniera via via più "rilassata" nei confronti del neonato, consentendo l'emancipazione di questo ad una età più precoce rispetto a madri inesperte al loro primo figlio (Kemps *et al.*, 1989).

Nello studio effettuato da Hooley e Simpson (1981), le madri di scimmia primipare erano più giovani rispetto alle madri pluripare ed erano anche maggiormente nervose e meno sicure di sé; tutte le madri mostrarono comunque adeguate cure materne e dunque, come suggerito da precedenti lavori (Rosenblatt e Lehrman, 1963; Seay, 1966; White e Hinde, 1975), l'inesperienza di per sé non sembra dunque una condizione sufficiente per determinare se una madre è competente o meno.

La mancanza di esperienza nelle femmine di scimmia può essere sufficiente a determinare inizialmente uno stato d'ansia nelle madri ma anche lo stress generato dall'ambiente sociale (Silk, 1980) deve essere tenuto in considerazione quando si parla di primati non umani (Hooley e Simpson, 1981).

Un'alta protettività materna è associata ad ansia materna nei primati non umani secondo Maestripieri (1993). Ci sono prove che il livello di protettività materna sia

strettamente correlato con misure oggettive di ansia nelle scimmie Rhesus (Maestripietri, 1993); una madre molto emotiva può essere più protettiva e restrittiva nei confronti del suo neonato e costantemente vigile per quanto riguarda gli altri aspetti del suo ambiente (Fairbanks, 1996); femmine pluripare invece imparano velocemente a distinguere minacce “reali” da minacce “artificiali” (Kinsley *et al.*, 2008).

Nella nostra ricerca le madri primipare erano più giovani rispetto alle madri pluripare; difatti, l'età delle madri primipare variava tra i 18 ed i 72 mesi (32.4 +/- 22.3) mentre quella delle madri multipare variava tra i 60 e 80 mesi (74.4 +/- 10.03). Dal nostro studio è emerso che le madri primipare, specialmente nella terza settimana di vita, restano più tempo nella cassa parto in contatto con i cuccioli, leccandoli, allattandoli e assumendo posizioni che facilitano l'allattamento, il che potrebbe far presupporre che tali atteggiamenti possano essere effettivamente legati ad una maggiore protezione e a un maggiore livello di ansia da parte della madri primipare nei confronti della propria prole. Ma per poter verificare questa ipotesi sarebbe necessario prendere in considerazione specifiche misure comportamentali e fisiologiche correlate all'ansia.

Jacobs e Moss (1976), hanno riscontrato che le madri umane spendono significativamente meno tempo nelle interazioni sociali e nelle manifestazioni di affetto con i loro secondogeniti rispetto a quanto hanno fatto con i loro primogeniti; i genitori oggetto di tali ricerche hanno inoltre riferito che erano più concentrati e più protettivi nei confronti del loro primogenito ed erano invece più rilassati con il loro secondo figlio (Mcarthur, 1956). Queste osservazioni sono supportate dal lavoro di Dean (vedi Koch, 1955) che riporta che i secondogeniti sono stati allevati in maniera più permissiva rispetto ai primogeniti, e da quello di Mitchell e Stevens (1969), che riferisce che madri primipare di scimmie Rhesus erano più preoccupate nei confronti dei loro piccoli (Hooley e Simpson, 1981).

Negli studi riguardanti le manipolazioni sui piccoli di roditore, il ritorno di cuccioli stressati al nido induce un aumento a breve termine delle cure materne (Wright e Bell, 1978), e l'effetto delle manipolazioni stesse sembra influire maggiormente sulle madri primipare piuttosto che su quelle pluripare. Gli autori riportano infatti che le madri pluripare erano risultate responsive al rientro nel nido di cuccioli manipolati solo per i primi due giorni di trattamento, contrariamente alle madri primipare che sono invece risultate sensibili a tali stimolazioni per tutto il periodo di osservazione, offrendo ai cuccioli rientrati nel nido dopo le manipolazioni elevate quantità di cure materne.

Nello stesso studio, le madri pluripare si erano abituate ai segnali di stress dei cuccioli e

non avevano più risposto al ritorno dei piccoli stressati al nido con un incremento del tempo trascorso in posizione di allattamento, ma avevano mantenuto una frequenza abbastanza stabile di tale postura per l'intero periodo pre-svezzamento, indipendentemente dalle stimolazioni apportate al cucciolo.

E' stato dimostrato in diversi studi sui roditori e sulle donne che le madri pluripare hanno livelli di corticosterone libero più bassi rispetto a femmine primipare (Pawluski *et al.*, 2009), che potrebbe essere alla base delle proprietà ansiolitiche della multiparietà (Macbeth e Luine, 2010).

Pawluski e colleghi(2009), hanno dimostrato che l'esperienza riproduttiva ha differenti effetti sul corticosterone sierico e sui livelli di CBG (*corticosteroid-binding globulin*) nelle madri. Vi è un marcato aumento dei livelli basali di corticosterone il primo giorno post-partum e una riduzione di CBG durante l'allattamento che è maggiore nelle femmine primipare rispetto alle pluripare. Questo aumento dei livelli di corticosterone in circolazione è positivamente correlato con il *licking* (leccamento del cucciolo) durante il periodo post-partum, che potrebbe spiegare il motivo per cui nelle femmine primipare oggetto del nostro studio tale attività risulta statisticamente maggiore rispetto alle madri pluripare; inoltre, i livelli di CBG durante la tarda gestazione sono correlati positivamente con il *nursing* durante il primo periodo dopo il parto e al tempo trascorso nel nido (tempo totale di *licking* e *nursing*). E' possibile che sia necessaria un maggiore aumento di corticosterone durante il periodo post-partum per alterare in maniera permanente i circuiti neurali, sviluppare la memoria materna a lungo termine, facilitare la produzione di latte e mantenere un adeguato comportamento materno nelle femmine di roditore primipare, ma non in femmine pluripare o sensibilizzate.

Significativi livelli di corticosterone circolante possono essere particolarmente importanti per la transizione iniziale alla maternità; donne pluripare sono meno ansiose rispetto a femmine primipare (Walf e Frye, 2008; Nephew *et al.*, 2010).

In generale, la lattazione durante il periodo post-partum è associata nella donna ad uno stato di rilassamento attraverso la soppressione dell'asse HPA (*Hypothalamic-Pituitary-adrenal axis*) (Altemus, 1995; Carter e Altemus, 1997; Carter *et al.*, 2001; Brunton *et al.*, 2008) e alla produzione e rilascio di ossitocina (Chiodera *et al.*, 1991; Amico *et al.*, 1994; Figueira *et al.*, 2008), al fine di facilitare il legame madre-neonato.

Per quanto riguarda i livelli di ossitocina, questi tendono ad aumentare nel plasma e nel liquido cerebrospinale durante il travaglio, mantenendosi elevati nel periodo post-partum per facilitare l'eiezione del latte (Bellmann, 1976; Carter e Altemus, 1997). Con

l' allattamento ed il massaggio della regione mammaria da parte del neonato, il rilascio di ossitocina all' interno del cervello, in particolare nell' ipotalamo, aumenta, mentre i livelli di ACTH (ormone adrenocorticotropo) e cortisolo diminuiscono (Matthiensen *et al.*, 2001). L' ossitocina è un ormone che media la soppressione dell' asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) durante il periodo post-partum; nei roditori è stata dimostrata intervenire nella riduzione dell' ansia e facilitare dunque l' insorgenza del legame madre-neonato (Figueira *et al.*, 2008)

L' attivazione dell' asse HPA può risultare ulteriormente attenuata nelle madri pluripare, in relazione al numero di parti sostenuti (Tu *et al.*, 2006).

Nella presente ricerca la dimensione della cucciolata è stata un fattore importante perché le madri primipare hanno avuto cucciolate leggermente più piccole rispetto alle madri pluripare.

Sono state dunque confrontate nel presente studio le cucciolate con un numero di cuccioli minore o uguale a 5 (gruppo A), e quelle con più di 5 cuccioli (gruppo B). Dal confronto sono emerse interessanti differenze statisticamente significative riguardanti alcuni comportamenti materni come il *contact*, il *licking anogenital* ed il *nursing* che sono risultati maggiormente espressi nelle cucciolate meno numerose in tutti e tre i giorni presi in esame (1, 10 e 19). Anche la permanenza all' interno della cassa parto (*m.whelp.box*) è risultata più manifestata nel medesimo gruppo al giorno 19. Per quanto riguarda le posizioni maggiormente esibite dalle madri, il decubito laterale (*on side*) che consente un facile accesso alla linea mammaria, è risultato statisticamente più presente al giorno 19 nelle cucciolate meno numerose, mentre la postazione quadrupedale (*standing*), che rende difficile o impedisce l' allattamento, così come il *walking* (camminare all' interno della cassa parto) sono espressi in misura statisticamente maggiore nelle cucciolate più numerose.

La media dei comportamenti materni nei 21 giorni di osservazione in entrambi i gruppi (A e B) conferma le differenze sopra riportate.

Secondo alcuni autori, la dimensione della cucciolata nei topi può influenzare la crescita della prole ed il comportamento materno durante l' allattamento (Deviterne *et al.*, 1972; Priestnall, 1972; Tanaka, 1998).

Madri golden hamster di cucciolate più numerose presentano un' attività locomotoria maggiore, in accordo con i risultati del nostro studio e la quantità totale del comportamento di riporto (*retrieving*) dei cuccioli aumentava in funzione della

dimensione della cucciolata (Guerra e de O Nunes, 2001).

Secondo Tanaka (1998), le madri di topo di cucciolate meno numerose trascorrevano più tempo nel nido a leccare la propria prole, rispetto a madri di cucciolate più numerose, in accordo con quanto precedentemente riferito da Priestnall (1972), sempre nella stessa specie. Questi risultati sono riportati in diverse specie animali, in cui le femmine che si prendono cura di cucciolate più piccole, trascorrono più tempo all'interno del nido con i cuccioli in interazione corporea con essi (Draper, 1968; Grotta e Ader, 1969; Guerra e de O Nunes, 2001) e si comportano in maniera significativamente più “materna” rispetto alle madri con cucciolate più numerose (Seitz, 1954,1958), in accordo con quanto riscontrato nella nostra ricerca.

Secondo Draper (1968), Grotta e Ader (1969), Priestnall (1972), Guerra e de O Nunes (2001), il contatto madre cucciolo nei ratti, nei topi e nei golden hamsters è minore quando la prole è numerosa forse anche a causa del disturbo causato alla madre dalle continue richieste di latte e dall' aumentata temperatura legata alla presenza di numerosi piccoli.

Al contrario, Champagne e colleghi (2003), riferiscono che le differenze individuali nel comportamento di *licking-grooming* sono stabili nei roditori attraverso più cucciolate e non sono associate a differenze nelle dimensioni delle cucciolate; tali autori infatti hanno riscontrato che all'interno di una vasta gamma di dimensioni delle cucciolate (da 5 a 18 cuccioli), non vi era alcuna correlazione significativa tra le dimensioni della cucciolata ed il *licking-grooming* o l' *arched-back nursing* (*nursing* con posizione schiena arcuata) contrariamente a quanto riscontrato nel nostro studio.

Secondo Priestnall (1972), ci si potrebbe aspettare che la dimensione della cucciolata influenzi lo sviluppo corporeo dei cuccioli, fattore che non è stato preso in considerazione nella nostra ricerca.

In molte specie di mammiferi come i roditori, i conigli, e le lepri, la dimensione della cucciolata determina delle variazioni nella crescita dei piccoli; difatti, i nascituri di una cucciolata numerosa pesano di meno e crescono meno velocemente già prima della nascita rispetto a quelli di una cucciolata meno numerosa (Heggenes *et al.*, 1961; Galler e Turkewitz, 1975; Nagy *et al.*, 1977; Chahoud e Paumgarten,2009) a causa della minore disponibilità di latte e di cure materne che la madre può offrire a ciascun individuo quando la prole è numerosa (Guerra e De Nunes, 2001; Rodel *et al.*, 2008).

Russel (1980), riferisce che la dimensione della cucciolata influenza infatti i livelli di ossitocina materni e quindi i livelli di produzione di latte e la sua emissione.

Una grande dimensione della cucciolata può portare anche ad un aumento della competizione dei cuccioli per l'allattamento, oltre che influenzare l'esperienza legata al gioco sociale, infatti per alcuni autori questo può determinare un ritardo nello sviluppo somatico e neurocomportamentale (Nagy *et al.*, 1977; Jen *et al.*, 1978; Chahoud e Paumgarten, 2009).

Diversi studi hanno riportato risultati controversi per quanto riguarda gli effetti comportamentali a lungo termine prodotti dalla differente dimensione della cucciolata, ma il ruolo preciso degli effetti della dimensione della cucciolata sull'emotività in età adulta restano ancora da determinare (Dimitsantos *et al.*, 2007).

Nei ratti, le differenze naturali nelle dimensioni delle cucciolate hanno importanti effetti a lungo termine sul comportamento degli animali e possono contribuire a differenze individuali nella fisiologia legata allo stress (Dimitsantos *et al.*, 2007; Rodel *et al.*, 2010).

Seitz (1954), riscontrò che topi allevati in piccole cucciolate reagivano con minore ansia e con un maggior comportamento esploratorio quando sottoposti a situazioni nuove una volta diventati adulti rispetto a quelli allevati in cucciolate più grandi; al contrario, Dimitsantos e colleghi (2007), riportano che gli animali allevati in piccole cucciolate mostravano un comportamento più emotivo e si mostravano più ansiosi in situazioni ambientali nuove, e adottavano inoltre strategie più passive di fronte a circostanze potenzialmente pericolose, pur non avendo ricevuto meno cure materne. Sembra dunque che, oltre alle attenzioni materne, altri fattori meritino di essere studiati per spiegare gli effetti di lunga durata indotti dalla dimensione della cucciolata sull'emotività.

Rodel e colleghi (2010), invece hanno riscontrato una correlazione negativa tra le concentrazioni di corticosterone sierico e le dimensioni della cucciolata, ipotizzando una maturazione ritardata dell'asse HPA in cuccioli di massa corporea in genere inferiore rispetto a quella di cuccioli provenienti da cucciolate con pochi soggetti. Tali autori suggerivano pertanto che i cuccioli provenienti da nidiate numerose, incontrando una concorrenza maggiore per le risorse materne, si adattavano a questo ambiente di sviluppo potenzialmente più stressante attraverso una *down-regulation* di risposta dell'asse HPA (Rodel *et al.*, 2010). Sembra quindi che la dimensione della cucciolata possa alterare il comportamento materno e l'interazione madre-neonato.

Un aspetto che non è stato considerato nel nostro studio è stato l'influenza della composizione di genere della cucciolata sulle cure materne fornite: secondo Champagne e colleghi (2003), il sesso della cucciolata non era significativamente correlato né al

*licking-grooming* né all' *arched-back nursing*, anche se all' interno della cucciolata i maschi ricevevano di fatto un po' più di *licking-grooming* rispetto alle femmine. Mendl e Paul (1990), hanno scoperto che le femmine che allattavano cucciolate miste, (1M+3F) spendevano più tempo in comportamenti materni e sembravano svezzare più tardi i loro cuccioli rispetto a cucciolate composte da soli maschi o sole femmine.

Alleva e colleghi (1989), Cavigelli e colleghi (2010), riferiscono che femmine di topo apparentemente curano di più, e per periodo di tempo maggiore, cuccioli maschi piuttosto che cuccioli femmina; in particolare cucciolate di soli maschi ricevono una maggior cura nella costruzione del nido da parte della madre, più attività di *nursing* e *licking* rispetto a cucciolate miste o a cucciolate di sole femmine; questo "pregiudizio" materno non sembra essere correlato a differenze di sviluppo dei cuccioli, dal momento in cui lo sviluppo corporeo e quello neurocomportamentale non sono influenzati dalla composizione di sesso della cucciolata.

Poiché nel campione totale di 10 cucciolate, 3 appartengono alla razza Pastore Belga Groenendael, si è scelto di valutare se in questi dati iniziali esistesse una differenza nell'espressione delle cure materne in questa razza rispetto al gruppo rappresentato da tutte le altre. Abbiamo osservato che le madri di pastore Belga in media hanno mostrato un comportamento di andare verso i cuccioli all'interno della cassa parto (*m.vs.p*), camminare all'interno della cassa parto (*walking*) e rimanere all'interno della cassa parto (*m.whelp.box*), statisticamente maggiori nell'arco dei 21 giorni rispetto al gruppo costituito da tutte le altre razze.

Non sono riferiti studi in letteratura riguardanti il comportamento materno in questa particolare razza; Rheingold (1963), ha incentrato la sua ricerca su cani di razza Beagle, Cocker spaniel, e Shelties; Dunbar e colleghi (1981), hanno eseguito uno studio su cani di razza Beagle; Pal (2005), ha esaminato i comportamenti materni in cani randagi in India; Czerwinski e colleghi (2014), hanno effettuato uno studio pilota su una cucciolata di Labrador retrievers.

Rheingold (1963), ha riscontrato delle differenze nel comportamento materno tra le diverse razze oggetto dello studio, in accordo con la nostra ricerca; nello specifico l'autore riporta che madri di brown Sheltie mostravano un comportamento per quanto concerne il tempo speso all'interno della cassa parto (*m.whelp.box*) marcatamente diverso da quello manifestato nelle altre razze. In particolare, tale madre raramente lasciava la cassa parto per le prime sei settimane di vita dei cuccioli, similmente a

quanto osservato nella nostra ricerca nelle madri di pastore.

Rheingold (1963), ha inoltre riscontrato una frequenza di movimenti verso i cuccioli da parte della madre (*m.vs.p.*) maggiore nella razza merle Shelties rispetto alle altre razze; anche nella nostra ricerca la frequenza con cui le madri di pastore Belga si sono mosse verso i propri cuccioli è risultata più elevata rispetto alle altre madri oggetto dello studio. La stessa autrice riporta inoltre altre differenze tra le razze oggetto della sua ricerca che però non sono state analizzate nel nostro studio ma degne di nota, come ad esempio il fatto che la cavità del ventre del Cocker Spaniel determinava un più facile accesso ai capezzoli da parte dei cuccioli rispetto che la cavità arrotondata degli Shelties; nei cuccioli di Shelties al contrario di quelli appartenenti alle altre due razze, è stata evidenziata inoltre una preferenza per un capezzolo o paio di capezzoli della madre. Il rigurgito dell' alimento da parte della madre ai cuccioli come supplemento all' alimentazione lattea è stato presente nel Cocker Spaniel e negli Shelties, ma non nelle madri Beagle. Altra differenza nello studio di Rheingold (1963), riguardava il comportamento di riporto (*retrieving*) dei cuccioli che è stato eseguito dalle madri Shelties per un periodo maggiore rispetto a quello delle altre razze.

Dunbar e colleghi (1981), riferiscono attraverso studi condotti su cani di razza Beagle, una predisposizione delle femmine di questa razza ad avere un primo contatto con prole di sesso maschile, e riportano l' esistenza di differenze comportamentali individuali tra madri all' interno della razza stessa, dal momento che la maggior parte, ma non tutte le femmine, prediligono un primo contatto post-partum con cuccioli di sesso maschile. Nel nostro studio non sono state analizzate preferenze per quanto riguarda i primi contatti di una madre verso cuccioli di sesso opposto, argomento che potrebbe essere interessante approfondire in una nuova ricerca.

Czerwinski e colleghi (2014), in uno studio pilota hanno videoripreso una cucciolata di Labrador Retrievers e hanno osservato che la femmina di Labrador spendeva circa il 48% del tempo totale della videoripresa (sessioni di 15 minuti) nella cassa parto con i cuccioli; l' ammontare del tempo speso con i cuccioli era calato poi drasticamente dalla prima settimana (95%) alla quarta settimana (2%); la femmina inoltre spendeva il 20% del suo tempo nella cassa parto a leccare i cuccioli durante le prime quattro settimane, dedicandosi ad ognuno di essi in maniera pressochè uguale. Anche nel nostro studio le madri di razza pastore Belga spendevano in media molto tempo all' interno della cassa parto con i loro cuccioli nei 21 giorni esaminati, anche se, terminando lo studio il 21esimo giorno post-partum, non è stato possibile prevedere se il tempo speso con i

cuccioli calasse poi drasticamente.

Nella specie ovina, la razza Merino manifesta dei comportamenti materni leggermente diversi rispetto ad altre razze, come ad esempio, nel caso in cui la pecora partorisca più cuccioli, il comportamento materno di *grooming* può essere diretto maggiormente a quei cuccioli nati prima nella sequenza e questo comportamento risulta particolarmente evidente nella suddetta razza rispetto a tutte le altre (Shillito *et al.*, 1983; Broom e Fraser, 2007).

Sempre nelle pecore Houpt (2011), riferisce che anche le pecore di razza Targhee non mostrano un comportamento materno analogo a quello delle altre razze.

Studi condotti da Champagne e colleghi (2007), su diversi ceppi di ratti hanno mostrato che l' espressione del comportamento materno durante la prima settimana post-partum presenta delle significative differenze tra un ceppo e l' altro oggetto della ricerca, soprattutto per quanto concerne la frequenza del *licking-grooming* ed il tempo speso nella postura di *nursing*, evidenziando che anche nei ratti il comportamento materno può essere in parte influenzato dalla razza di appartenenza.

## Capitolo 5: Conclusioni:

A lungo è stato ipotizzato che il comportamento materno fosse necessariamente la conseguenza inevitabile degli ormoni della gestazione in combinazione con la presenza del neonato; in realtà, nonostante l'importanza di questi due fattori soprattutto nel determinare l'avvio del comportamento materno in molti mammiferi, le differenze individuali sono notevoli non solo tra specie diverse, ma anche nell'ambito della stessa razza. Ogni madre ha dunque la sua propria personalità ed un suo modo di esprimere le cure materne. Esistono numerosi fattori che possono incidere sulle cure materne che una madre rivolge alla propria prole, come fattori di natura genetica, ma anche fattori legati all'ambiente in cui ha vissuto nelle prime settimane di vita, modifiche neuroendocrine che avvengono al momento del parto, fattori epi-genetici, età dei cuccioli, composizione di genere della cucciolata, nonché dal numero di parti sostenuti e dalle dimensioni della cucciolata, nonostante per quanto concerne questi ultimi due fattori in letteratura siano riportati pareri contrastanti .

La nostra ricerca ha individuato la presenza di:

- Differenze temporali nell'espressione delle cure materne nei 21 giorni presi in esame, come riportato in numerose fonti bibliografiche, come la riduzione del tempo speso dalle madri all'interno della cassa parto e la riduzione del contatto con l'accrescersi dei cuccioli, e mettendone in discussione invece altri come il comportamento di allattamento ed il leccamento anogenitale, che nel nostro studio subiscono un incremento con l'accrescersi dei cuccioli contrariamente a quanto riportato da altri autori.
- Differenze individuali nell'espressione delle cure materne nelle madri oggetto dello studio, in accordo con altri risultati riportati in letteratura sia sulla medesima specie, che su specie differenti.
- Differenze tra madri primipare e madri pluripare, dove le prime mostrano un marcato aumento di alcune cure materne per tutto il periodo analizzato, portando alla fine della terza settimana ad una maggiore espressione di cure rispetto alle madri pluripare. Le madri pluripare manifestano invece una tendenza verso cure materne piuttosto costanti nel periodo esaminato, in accordo con altri autori che hanno eseguito ricerche però su specie animali diverse.

- Differenze tra madri di cucciolate più numerose e meno numerose, dove le seconde sembrano comportarsi in maniera più “materna” offrendo cure materne più intense alle proprie cucciolate, in accordo con quanto riportato da alcuni autori in letteratura in altre specie.
- Differenze tra madri appartenenti a razze diverse, dove la razza pastore Belga, particolarmente rappresentata nel nostro studio, ha manifestato alcuni comportamenti in maniera più marcata; purtroppo però non è stato possibile comparare i nostri risultati con altri relativi alla stessa razza data la scarsità di informazioni presenti in letteratura.

Molte ricerche sul comportamento materno hanno utilizzato come modello i roditori, in quanto questa specie è caratterizzata da una fecondità e durata di vita tale che consentono lo studio di tale argomento attraverso più generazioni in un periodo di tempo relativamente breve.

Pochissime e perlopiù datate, sono le ricerche condotte sulla specie canina e nessuna di esse è stata effettuata su cani da compagnia, che vivono in un ambiente familiare.

Sarebbe opportuno investire ulteriori ricerche per confermare i risultati preliminari del nostro studio nel cane domestico.

Sarebbe inoltre di estrema utilità ed interesse avviare ulteriori studi che valutino la correlazione tra le cure materne ricevute nelle prime settimane di vita e il comportamento dei cuccioli in diverse fasi della loro crescita, tenendo in considerazione possibili fattori influenti sull'espressione del comportamento materno.

## **Bibliografia:**

**Alcock, J.**, (2001). *Animal Behavior – An Evolutionary Approach*. 7<sup>th</sup> edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

**Alexander, G.**, (1988). *What makes a good mother? Components and comparative aspects of maternal behaviour in ungulates*. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 17, 25-41

**Algers, B., Uvnas-Moberg, K.**, (2007). *Maternal behavior in pigs*. Hormones and Behavior. 52: 78-85.

**Algers, B., Jensen, P.**, (1985). *Communication during suckling in the domestic pig. Effects of continuous noise*. Appl. Anim. Behav. Sci. 14: 49-61.

**Alheid, G. F., Heimer, L.**, (1988). *New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata*. Neuroscience. 27: 1-39.

**Alleva, E., Caprioli, A., Laviola, G.**, (1989). *Bitter Gender Composition Affects Maternal Behavior Of the primiparous Mouse Dam (Mus musculus)*. Journal of comparative Psychology. Vol. 103. NO 1: 83-87.

**Altemus, M.**, (1995). *Neuropeptides in anxiety disorders. Effects of lactation*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 771: 697–707.

**Amico, J. A., Johnston, J. M., Vagnucci, A. H.**, (1994). *Suckling-induced attenuation of plasma cortisol concentrations in postpartum lactating women*. Endocr. Res. 20: 79–87.

**Anand, K. J., Scalzo, F. M.**, (2000). *Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior?* Biology of the neonate, 77(2): 69-82.

**Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J., Merali, Z.**, (1998). *Do early-life events permanently alter behavioural and hormonal responses to stressors?* Int. J. Devl. Neuroscience. 16(3-4): 149-164.

**Arling, G. L., Harlow, H. F.**, (1967). *Effects of social deprivation on maternal behavior in rhesus monkeys*. Journal of Comparative and Physiological Psychology. 64(3): 371-377.

**Ash, R., Heap, R.**, (1975). *Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentrations in peripheral plasma of sow during pregnancy, parturition, lactation and after weaning*. J. Endocr. 64: 141-154.

**Ashmead, D. H., Clifton, R. K., Reese, E. P.**, (1986). *Development and auditory localization in dogs: single source and precedence effects sound*. Dev. Psychobiol. 19: 91-103.

- Austad, R., Lunde, A., Sjaastad, V.,** (1976). *Peripheral plasma levels of oestradiol-17 beta and progesterone in the bitch during the oestrus cycle, in normal pregnancy and after dexamethasone treatment.* J Reprod Fertil. 46(1):129
- Baker, A. J., Baker, A. M., Thompson, K. V.,** (1996). *Parental care in captive mammals. In: Wild Mammals in Captivity.* Ed. by D. G. Kleiman, M. E. Allen, K. V. Thompson & S. Lumpkin. Chicago: University of Chicago Press. pp. 497–512.
- Bandler, R., Shipley, M. T.,** (1994). *Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?.* *Trend. Neurosci.* 17: 379-389.
- Barber, R., Braude, R., Mitchell, K.,** (1955). *Studies on milk production of Large White pigs.* J. Agric. Sci. (Cambridge) 46: 97-118.
- Barnett, S. A., Burn, J.,** (1967). *Nature (London).* 213: 150-152.
- Barrau, M. D., Abel, J. H., Verhage, H. G.,** (1975). *Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch.* Am J Anat. 142(1):47
- Batchelor, A., Bell, E. t., Christie, D. W.,** (1972). *Urinary oestrogen excretion in the beagle bitch.* Dr. Vet. J. 128(11):1360
- Bateson, B.,** (1981). *Ontogénie,* In: McFarland D., pp. 654-674.
- Battaglia, C. L.,** (2009). *Periods of Early Development and the Effects of Simulation and Social Experiences in the Canine.* Journal of Veterinary Behavior. 4: 203-210.
- Batuev, A. S., Vinogradova, E. P., Polyakova, O. N.,** (1996). *The effect of prenatal stress on rat offspring anxiety.* Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni bI. P. Pavlova. 46: 558-563.
- Beach, F. A., Jaynes, J.,** (1956b). *Studies of maternal retrieving in rats. I. Recognition of young.* J. Mammal. 37: 177.180.
- Beach, F. A., Jaynes, J.,** (1956c). *Studies of maternal retrieving in rats: III. Sensory cues involved in the lactating female's response to her young.* Behaviour 10: 104-125.
- Beach, F. A., Buchler, M. G., Dunbar, I. F.,** (1983). *Development of attraction to estrous females in male dogs.* Physiol. Behav. 31: 293-297.
- Beaver, B. V.,** (2003). *The Veterinarian's Encyclopedia of Animal Behavior .* Ames. Iowa State University Press.
- Beaver, B. V.,** (2009). *Female canine sexual behaviour,* chapter 6,pp 205, In: *Canine Behavior: Insights and Answers.* Second edition, Saunders Elsevier, 2009.
- Behbehani, M. M.,** (1995). *Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray.* Prog. Neurobiol. 46: 575-605.

- Beinest-Noirot, E.,** (1961). *L'influence de l'expérience sur la manifestation du comportement maternel chez la souris*. Acta Psychol. 19 : 180-181.
- Bellmann, O.,** (1976). *Hormonal regulation of lactation (author's transl)*. Klin. Padiatr. 188: 385–395.
- Benoit, D., Parker, K. C.,** (1994). *Stability and transmission of attachment across three generations*. Child Dev. 65: 1444–56
- Benuck, I., Rowe, F. A.,** (1975). *Centrally and peripherally induced anosmia: influences of maternal behaviour in lactating female rats*. Physiol. Behav. 14: 439-447.
- Berman, C.,** (1990). *Intergenerational transmission of maternal rejection rates among free-ranging rhesus monkeys on Cayo Santiago*. Animal. Behavior. 144: 247–258.
- Biagini, G., Merlo, P. C., Carani, C., Marrana, P., Agnati, L. F.,** (1998). *Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feed-back regulation in the CA1 hippocampal field*. Int. J. Devl. Neuroscience, 16 (3-4): 187-197.
- Bifulco, A., Moran, P. M., Ball, C., Jacobs, C., Baines, R., Bunn, A., Cavagin, J.,** (2002). *Childhood adversity, parental vulnerability and disorder: Examining inter-generational transmission of risk*. J Child Psychol Psychiatry 43: 1075–1086.
- Bird, A. P.,** (1978). *Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern*. J. Mol Biol. 118: 49–60.
- Bjorklund, D. F.,** (2006). *Mother knows best: Epigenetic Inheritance, maternal effects, and the evolution of human intelligence*. Developmental Review. 26: 213-242.
- Blaffer-Hrdy, S.,** (1999). *Mother nature: a history of mothers infants, and natural selection*. New York: Pantheon Books
- Blass, E. M., Teicher, M. H.,** (1980). *Suckling*. Science. 210(4465): 15-22.
- Blass, E. M.,** (1994). *Behavioral and physiological consequences of suckling in rat and human newborns*. Acta Paediatr.Suppl. 397: 71-76.
- Bleicher, N.,** (1962), *Behavior of the bitch during parturition*. J Am Vet Med Assoc. 140 (10): 1076-1082.
- Boccia, M. L., Pedersen, C. A.,** (2001). *Brief vs. long maternal separations in infancy: contrastino relationship with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety*. Psychoneuroendocrinology. 26: 657-672.
- Bolles, R. C., Woods, P. J.,** (1964). *The ontogeny of behaviour in the albino rat*. Behaviour 12(4): 427–441.

**Braastad, B., Bakken, M.,** (2002). *Behaviour of dogs and cats*. In: Jensen, P., (eds.). *The Ethology of Domestic Animals- An introductory test*. CABI. Wallingford (UK). pp 173-193.

**Branchi, I., Cantucci, D., Alleva, E.,** (2001). *Ultrasonic vocalization emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioral development*. *Behav. Brain Res.* 125: 49-56.

**Bredy, T. W., Humpartzoomian, R. A., Cain, D. P., Meaney, M. J.,** (2003). *Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment*. *Neuroscience.* 118: 571-576.

**Bredy, T. W., Zhang, T. Y., Grant, R. J., Diorio, J., Meaney, M. J.,** (2004). *Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression*. *Eur. J. Neurosci.* 20: 1355-1362.

**Bridges, R. S.,** (1984). *A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behaviour in the rat*. *Endocrinology.* 114: 930-940.

**Bridges, R. S.,** (1975). *Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat*. *Physiol. And Behav.* 14: 245-249.

**Bridges, R. S.,** (1977). *Parturition: Its role in the long term retention of maternal behaviour in rats*. *Physiology and Behavior.* 18: 487-490.

**Bridges, R. S.,** (1990). *Endocrine regulation of parenting behaviour in rodents*. In: Krasnegor, N. A., Bridges, R. S., (eds.). *Mammalian parenting: Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinants*. New York. Oxford University Press. pp. 93-117.

**Bridges, R. S., Numan, M., Ronsheim, P. M., Mann, P. E., Lupini, C. E.,** (1990). *Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8003-8007.

**Bridges, R. S., Robertson, M. C., Shiu, R. P. C., Sturgis, J. D., Henriquez, B. M., Mann, P. E.,** (1997). *Central lactogenic regulation of maternal behaviour in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioural potencies of rat prolactin and rat placental lactogen*. I. *Endocrinology.* 138: 756-763.

**Bridges, R. S., Scanlan, V. F.,** (2005). *Maternal memory in adult, nulliparous rats : Effects of testing interval on the retention of maternal behavior*. *Developmental Psychobiology.* 46: 13-18.

**Broad, K., Levy, F., Evans, G., Kimura, T., Keverne, E., Kendrick, K.,** (1999). *Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus*. *Eur. J. Neurosci.* 11: 3725- 3737.

- Brodsky, B.S., Oquendo, M., Ellis, S.P., Haas, G.L., Malone, K.M., Mann, J.J.,** (2001). *The relationship of childhood abuse to impulsivity and suicidal behavior in adults with major depression*. *American Journal of Psychiatry* 158: 1871–1877.
- Broom D. M., Fraser A. F.,** (2007). *Domestic animal behaviour and welfare*. 4<sup>th</sup> edition. CAB international, Wallingford. pp 540.
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., Chanel, J.,** (1991). *Is rat dam licking behavior regulated by pup's preputial gland secretion ?*. *Anim. Learn. Behav.* 19: 177-184
- Brown, R. E., Mathieson, B., Stapleton, J., Neumann, P. E.,** (1999). *Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J female mice*. *Physiol. Behav.* 67: 599–605.
- Brunton, P. J., Russell, J. A., Douglas, A. J.,** (2008). *Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation*. *J. Neuroendocrinol.* 20: 764–776.
- Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., et al.,** (2009). *Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders*. *Psychoneuroendocrinology.* 34(Suppl 1):S208–16.
- Calamandrei, G., Keverne, E. B.,** (1994). *Differential expression of fos protein in the brain of female mice dependent on pup sensory cues and maternal experience*. *Behav. Neurosci.* 108 : 113-120.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Polsky, P. M., Meaney, M. J.,** (1998). *Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5335-5340.
- Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Polsky, P. M., Meaney, M. J.,** (2000). *The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat*. *Neuropsychopharmacology.* 22: 219-229.
- Caldji, C., Diorio, J., Meaney, M. J.,** (2000). *Variation in Maternal Care in Infancy Regulate the Development of Stress Reactivity*. *Biol. Psychiatry.* 48: 1164-1174.
- Caldji, C., Diorio, J., Meaney, M. J.,** (2003). *Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brain regions associated with fear*. *Neuropsychopharmacology.* 28: 1950–9.
- Caldwell, J. D., Walker, C. H., Pedersen, C. A., Barakat, A. S., Mason, G. A.,** (1994). *Estrogen increases affinity of oxytocin receptors in the medial preoptic area anterior hypothalamus*. *Peptides.* 15: 1079-1084.
- Cameron, N. M., Shahrokh, D., Del Corpo, A., Dhir, S. K., Szyf, M., Champagne, F. A., Meaney, M. J.,** (2008). *Epigenetic programming of phenotypic variations in reproductive strategies in the rat through maternal care*. *J Neuroendocrinol* 20:795–801.

- Carlier, C., Noirot, E.,** (1965). *Effects of previous experience on maternal retrieving by rats.* Anim. Behav. 13: 423-426.
- Carlson, M., Earls, F.,** (1977). *Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania.* Annals of the New York Academy of Sciences. 807: 419-428.
- Carlson, N. R.,** (2001). *Physiology of behaviour.* Seventh edition. Piccin
- Carmichael, L., Lehner, G. F. J.,** (1937). *The development of temperature sensitivity during the fetal period.* J. Genet. Psychol. 50: 217-227
- Carrion, V.G., Weems, C.F., Eliez, S., Patwardhan, A., Brown, W., Ray, R.D., Reiss, A.L.,** (2001). *Attenuation of frontal asymmetry in pediatric posttraumatic stress disorder.* Biological Psychiatry 50: 943–951.
- Carter, C. S., Altemus, M.,** (1997). *Integrative functions of lactational hormones in social behavior and stress management.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 807: 164–174.
- Carter, C. S., Altemus, M., Chrousos, G. P.,** (2001). *Neuroendocrine and emotional changes in the post-partum period.* Prog. Brain Res. 133: 241–249.
- Carter, C. S., Keverne, B.,** (2002). *Affiliation and pair bonding.* In: Pfaff, D. V., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Faharbach, S. E., Rubin, R. T., (eds.). *Hormones, brain and behavior.* Academic Press, San Diego. 1: 299-338.
- Casella, C., Taglietti, V.,** (1996). *Principi di fisiologia.* Vol. 2. La Goliardica Pavese s. r. l. (Pavia). pp 676-957.
- Castren, H., Algers, B., De Pasillè, A. M., Rushen, J., Uvnas-Moberg, K.,** (1993a). *Periparturient variation in progesterone, prolactin, oxytocin and somatostatin in relation to nest building in sows.* Appl. Anim. Behav. Sci. 38: 91-102.
- Catt, Kevine J.,** (1975). *Un ABC di endocrinologia.* Biblioteca della Est. Edizioni Scientifiche e Tecniche Mondatori
- Cavigelli, S. A., Ragan, C. M., Barret, C. E., Michael, K. C.,** (2010). *Within-litter variance in rat maternal behaviour.* Behavioural Processes. 84: 696-704.
- Cedar, H., Solage, A., Glaser, G., Razin, A.,** (1979). *Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI.* Nucleic Acids Res. 6: 2125–2132.
- Chahoud, I., Paumgarten, F. J. R.,** (2009). *Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies?* Environmental Research. 109: 1021-1027.
- Challis, J. R. G., Lye, S. J.,** (1994). *Parturition.* In: Knobil, E., Neill, J. D., (eds.). *The physiology of reproduction.* New York. Raven Press. 2: 985-1031.

- Champagne, F., Meaney, M. J.,** (2000). *Gestational stress effects on maternal behavior*. Soc. Neurosci. Abstr. 26: 2035
- Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M. J.,** (2001). *Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 12736-12741.
- Champagne, A. F., Francis, D. D., Mar, A., Meaney, M. J.,** (2003a). *Variations in maternal care in rat as mediating influence for the effects of environment on development*. Physiology and Behavior. 79: 359-371.
- Champagne, A. F., Weaver, I. C. G., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M. J.,** (2003b). *Natural Variations in Maternal Care are associated with Estrogen Receptor Alpha Expression and Estrogen Sensivity in the MPOA*. Endocrinology. 144: 4720-4724.
- Champagne, A. F., Stevenson, C., Gratton, A., Meaney, M. J.,** (2004). *Individual differences in maternal behavior are mediated by dopamine release in the nucleus accumbens*. Journal of Neuroscience. 24: 4113-4123.
- Champagne, F. A., Meaney, M. J.,** (2006). *Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model*. Biol Psychiatry. 59: 1227-35.
- Champagne, F.A., Weaver, I.C., Diorio, J., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M.J.,** (2006). *Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring*. Endocrinology 147: 2909-2915.
- Champagne, F. A., Meaney, M. J.,** (2007). *Transgenerational Effects of Social Environment on Variations in Maternal Care and Behavioral Response to Novelty*. Behavioral Neuroscience. 121(6): 1353-1363.
- Champagne, F., Curley, J. P., Keverne, E. B., Bateson, P. G.,** (2007). *Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice*. Physiology. Behavior. 91: 325-334.
- Champagne, F. A.,** (2008). *Epigenetic mechanism and the transgenerational effects of maternal care*. Frontiers in Neuroendocrinology. 29: 386-397.
- Champagne, D. L., Bagot, R. S., Van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M. J., De Kloet, E. R., Joels, M., Krugers, H.,** (2008). *Maternal Care and Hippocampal plasticity: Evidence for Experience-Dependent Structural Plasticity, Altered Synaptic Functioning, and Differential Responsiveness to Glucocorticoids and Stress*. J. Neurosci. 28(23): 6037-6045.
- Champagne, D. L.,** (2011). *Maternal imprints and the origins of variation*. Hormones and Behavior. 60: 4-11.
- Chapillon, P., Patin, V., Roy, V., Vincent, A., Caston, J.,** (2001). *Effects of pre-and post natal stimulation on developmental, emotional and Cognitive aspects in Rodent: A Review*. Inc. Dev. Psychobiol. 41: 373-387.

**Chapman, D., Scott, K.,** (2001). *The impact of maternal intergenerational risk factors on adverse developmental outcomes*. *Developmental Review*. 21: 305–325.

**Chiodera, P., Salvarani, C., Bacchi-Modena, A., Spallanzani, R., Cigarini, C., Alboni, A., et al.,** (1991). *Relationship between plasma profiles of oxytocin and adrenocorticotrophic hormone during suckling or breast stimulation in women*. *Horm. Res.* 35: 119–123.

**Cirulli, F., Gottlieb, S., Levine, S.,** (1992). *Maternal factors regulate stress responsiveness in the neonatal rat*. *Psychobiology*. 20: 143-152.

**Cirulli, F., Berry, A., Alleva, E.,** (2003). *Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticità and implications for psychopathology*. *Neurosci. Biobehav.* 27: 73-82.

**Coe, C. L., Wiener, S. G., Rosenberg, L. T.,** (1985). *Physiological consequences of maternal separation and loss in the squirrel monkey*. In: Rosenblum, L. A., Coe, C. L., (Eds.). *Handbook of the Squirrel Monkey Research*. Plenum Press, New York, pp. 127-148.

**Cohen, J., Bridges, R. S.,** (1981). *Retention of maternal behaviour in nulliparous and primiparous rats: Effects of duration of previous maternal experience*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 95: 450-459.

**Colangeli, R., Giussani, S.,** (2004). *Medicina comportamentale del cane e del gatto*. Manuali pratici di veterinaria, Poletto Editore

**Cooper, D. N., Krawczak, M.,** (1989). *Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes*. *Hum. Genet.* 83: 181–188

**Coplan, J. D., Andrews, M. W., Rosenblum, L. A., Owens, M. J., Friedman, S., Gorman, J. M., Nemeroff, C. B.,** (1996). *Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: Implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 93: 1619-1623.

**Coutellier, L., Friedrich, A. C., Failing, K., Wurbel, H.,** (2007). *Variations in the postnatal maternal environment in mice: Effects on maternal behaviour and behavioural and endocrine responses in the adult offspring*. *Physiology. Behavior.* 93: 395-407.

**Cowie, A. T., Duncombe, W. G., Folley, S. J., French, T. H., Glascock, R. F., Massart, L., Peeters, G. J., Popjak, G.,** (1951). *Synthesis of Milk Fat from Acetic Acid by the Perfused Isolated Bovine Udder*. Vol. 49 pp. 610-615.

**Crews, D.,** (2008). *Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology*. *Front. Neuroendocr.* 29: 344–357.

**Crews, D.,** (2011). *Epigenetic modifications of brain and behavior. Theory and practice*. *Hormones and Behavior.* 59: 393-398.

- Curley, J. P., Jensen, C. L., Mashoodh, R., Champagne, F. A.,** (2011). *Social influences on neurobiology and behavior: Epigenetic effects during development.* Psychoneuroendocrinology. 36: 352-371.
- Czerwinski, V. H., Smith, B. P., Hazel, S. J.,** (2014). *Do early experiences influence future behaviour in domestic dog puppies? A pilot study observing maternal care giving behaviour in a litter of Labrador puppies.*
- Da Costa, A. P. C., Broad, K. D., Kendrick, K. M.,** (1997). *Olfactory memory and maternal behaviour induced changes in c fos e and zif1268 mRNA expression in the sheep brain.* Mol. Brain Res. 46: 63-76.
- Davis, M., Rennie, D., Cassel, M.,** (1994). *Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety.* TINS. 17: 208-214.
- Dehasse, J.,** (1993). *Epigénèse sensorielle, émotionnelle et réactionnelle du chiot.* Cahiers d'éthologie. 12(4) : 443-466
- Dejong, R.,** (1956). *The neurologic examination.* Cassel &Co.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S., Joel, M.,** (1993). *Functional implication of brain corticosteroid receptor diversity.* Cell. Mol. Neurobiol. 13: 433-455.
- De Kloet, E.R., Sibug, R.M., Helmerhorst, F.M., Schmidt, M.,** (2005). *Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 29: 271–281.
- Dell, P. A., Rose, F. D.,** (1987). *Transfer of effects from environmentally enriched and impoverished female rats to future offspring.* Physiol Behav. 39: 187–90.
- Denenberg, V. H., Wimbly, A. E.,** (1963). *Behaviour of adult rats is modified by the experiences their mothers had as infants.* Science. 142: 1192-1193
- Denenberg, V. H.,** (1964). *Critical periods, stimulation input and emotional reactivity: a teory of infantile stimulation.* Psychol. Rev. 71: 335-351.
- Denenberg, V. H., Kline, J.,** (1964). *Stimulus intensity versus critical periods: a test of two hypothesesconcerning infantile stimulation.* Can. J. Psychol. 18: 1-5.
- Denenberg, V. H., Rosenberg, K. M.,** (1967). *Non genetic transmission of informations accross two generations.* Nature. 216: 349-550.
- Deviterne, D., Desor, D., Krafft, B.,** (1990). *Maternal behavior variations and adaptations, and pup development within litters of various sizes in Wistar rat.* Dev Psychobiol. 23: 349–60.
- De Wilde, E.J., Kienhorst, I.C., Diekstra, R.F., Wolters, W.H.,** (1992). *The relationship between adolescent suicidal behavior and life events in childhood and adolescence.* American Journal of Psychiatry 149: 45–51.

- Dimitsantos E., Eschorihuela, R. M., Fuentes, S., Armario, A., Nadal, R.,** (2007). *Bitter size affects emotionality in adult male rats*. *Physiology and Behavior*. 92: 708-716.
- Dixson, A. F.,** (1983). *The Hormonal control of sexual behavior in primates*. In : Fin, C. A., (Eds.). *Oxford reviews of reproductive biology*. Oxford: Oxford University Press. 5: 131-219.
- Dobolyi, A., Grattan, D. R., Stolzenberg, D. S.,** (2014). *Preoptic inputs and Mechanism that Regulate Maternal Responsiveness*. *J. Neuroendocrinol.* 26(10): 627-640.
- Dowdney, L., Skuse, D., Rutter, M., Quinton, D., Mrazek, D.,** (1985). *The nature and qualities of parenting provided by women raised in institutions*. *J Child Psychol Psychiatry*. 26: 599–625.
- Draper, D. D.,** (1968). *Litter size, maternal behavior and pup development in the rat*. *Ph.D. Thesis*. In: Elwood, P.W. Brown, D.M., (eds.). *The influence of litter size and parental behaviour on the development of Mongolian gerbil pups*. *Anim. Behav.* 26: 438-454.
- Dube, S.R., Anda, R.F., Felitti, V.J., Chapman, D.P., Williamson, D.F.,** (2001). *Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study*. *JAMA* 286, 3089–3096.
- Dunbar, I. F.,** (1979). *Dog Behavior*. T. F. H. Publications, Hong Kong, 223pp.
- Dunbar, I. F., Hanson, E., Buehler, M.,** (1981). *Pup retrieval and maternal attraction to canine amniotic fluids*. *Behavioural Process*. 8: 249-260.
- Edqvist, L. E., Johansson, E. D. B., Kasstrom, H., et al.,** (1976). *Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrus cycle and pregnancy*. *Acta Endocrinol.* 78(3): 554
- Edwards, S. A., Broom, D. M.,** (1982). *Behavioural interaction of dairy cows with their newborn calves and the effects of parity*. *Anim. Behav.* 30: 525-535.
- Edwards, C. R., Benediktsson, R., Lindsay, R. S., Seckl, J. R.,** (1996). *11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects*. *Steroids*. 61: 263–9.
- Egeland, B., Jacobvitz, D., Papatola, K.,** (1987). *Child Abuse and Neglect: Biosocial Dimensions*. Aldine, New York.
- Eib-Eibesfeldt, I.,** (1960,1961). *Rattus Norvegicus. Transport der Jungen durch das Muttertier*. *Encyclo. Cinematographia*, Gottingen. pp. E311-E312.
- Erskine, M. S., Barfield, R. J., Goldman, B. D.,** (1978). *Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal*. *Behav. Biol.* 23: 206-218.

- Erskine, M. S., Barfield, R. J., Goldman, B. D.,** (1980a). *Postpartum aggression in rats: I. effects of Hypophysectomy*. J. Comp. Physiol. Psychol. 94: 484-494.
- Erskine, M. S., Barfield, R. J., Goldman, B. D.,** (1980b). *Postpartum aggression in rats: II. Dependence on maternal sensitivity to young and effects of experience with pregnancy and parturition*. J. Comp. Physiol. Psychol. 94: 495-505.
- Ewer, R.F.,** (1968). *Ethology of Mammals*. Logos Press Limited, London (Chapter 10). pp. 234–285.
- Ewer, R. F.,** (1973). *The Carnivores*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Fabrenys, C., Meller, R. E., Keverne, E. B.,** (1982). *Opiate antagonist stimulate affiliative behaviour in monkeys*. Pharmacol. Biochem. Behav. 16: 653-660.
- Fahrbach, S. E., Morrel, J. I., Pfaff, D. W.,** (1985b). *Possible role for endogenous oxytocin in estrogen facilitated maternal behaviour in rats*. Neuroendocrinology 40: 526-532.
- Fairbanks, L. A.,** (1988). *Vervet monkey grandmothers: effects on mother-infant relationship*. Behaviour. 104: 176-188.
- Fairbanks, L. A.,** (1989). *Early experience and cross-generational continuity of mother-infant contact in vervet monkeys*. Dev. Psychobiol. 22: 669–81.
- Falt, L., Wilsson, E.,** (1979). *The effect of maternal deprivation between 6 and 10 weeks of age upon the behaviour of Alsatian puppies*. Appl Anim Behav Ethol. 5(3): 299.
- Feng, J., Fouse, S., Fan, G.,** (2007). *Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function*. Pediatr. Res. 61: 58R-63R.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Tobena, A., Battig, K.,** (1991). *Infantile (handling) stimulation and behaviour in young roman high- and low-avoidance rats*. Physiol. Behav. 50: 563-565.
- Fernandez-Teruel, A., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., Tobena, A.,** (2002). *Early-life stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar mechanisms?* Pharm. Biochem. and Behavior. 73: 233-245.
- Fidler, I. J., Brodey, R. S., Howson, A. E., et al.,** (1966). *Relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to canine pyometra*. J Am Vet Med Assoc. 148(8):1043.
- Field, T.,** (1998). *Maternal depression effects on infants and early interventions*. Prev. Med. 27: 200-203.
- Field, T.,** (2002). *Early interactions between infants and their postpartum depressed mothers*. Infant Behav Dev. 25(1): 25–9.

**Field, T.,** (2010). *Touch for socioemotional and physical well-being: a review.* Dev Rev. 30: 367–83.

**Figueira, R. J., Peabody, M. F., Lonstein, J. S.,** (2008). *Oxytocin receptor activity in the ventrocaudal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior in postpartum rats.* Behav. Neurosci. 122: 618–628.

**Fisher, J.,** (1993). *The behavior of dogs and cats.* Stanley Paul, London.

**Flannelly, K. J., Kemble, E. D., Blanchard, C. D., Blanchard, R. J.,** (1986). *Effects of septal-forebrain lesions on maternal aggression and maternal care.* Behav. Neural. Biol. 45: 17-30.

**Fleming, A. S., Rosenblatt, J. S.,** (1947b). *Olfactory regulation of maternal behaviour in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females.* J. Comp. Physiol. Psychol. 86: 221-232.

**Fleming, A. S., Rosenblatt, J. S.,** (1974). *Olfactory regulation of maternal behaviour in rats : Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins.* J. Comp. Physiol. Psychol. 86: 233-246.

**Fleming, A. S., Corter, C.,** (1988). *Factors influencing maternal responsiveness in humans; Usefulness of an animal model.* Psychoneuroendocrinology. 13: 189-212.

**Fleming, A. S., Gavarth, K., Sarker, J.,** (1992). *Effects of transactions to the vomeronasal nerves or to the main olfactory bulbs on the initiation and long-term retention of maternal behavior in primiparous rats.* Behav. Neural. Biol. 57: 177-188.

**Fleming A. S., O'Day, D. H., Kraemer, G. W.,** (1999). *The neurobiology of mother–infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations.* Neurosci Biobehav Rev. 23(5): 673–85.

**Fleming, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., Melo, A.,** (2002). *Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations.* Pharmacol. Biochem. Behav. 73: 61–75.

**Forsling, M., Taverne, M., Parvizi, N., Elsasser, F., Smidt, D., Ellendorff, F.,** (1979). *Plasma oxytocin and steroid concentrations during late pregnancy, parturition and lactation in the miniature pig.* J. Endocrinol. 82: 61-69.

**Fox, M. W.,** (1963). *Development and clinical significance of superficial reflexes in the dog.* Vet. Rec. 75: 14-378.

**Fox, M. W.,** (1964): *The ontogeny of behaviour and neurologic responses in the dog.* Animal Behavior, 12: 301-310.

**Fox, M. W.,** (1965). *Canine behaviour.* Charles C. Thomas Publisher, Springfield (Illinois). 350 pages.

**Fox, M. W., Stanton, G.,** (1967). *A developmental study of sleep and wakefulness in the dog.* J. Sm. Anim. Pract. 8: 605-611.

**Fox, M. W.,** (1971). *Integrative development of the brain and behavior in the dog*. University of Chicago Press, Chicago, 230 pages.

**Fox, M. W.,** (1971). *Behavior of wolves, dogs and related canids*. Harper and Row Publishers. New York. 220 pages.

**Fox, M.,** (1972). *Understanding Your Dog*. Coward, McCann and Geoghegan, New York (NY). 74: 100-108.

**Fox, M. W.,** (1978). *Socialization patterns in wild and domesticated canids* (ch.8), *Stages and periods in development: environmental influences and domestication* (ch.9), in *The dog; Its Domestication and Behavior*, New York & London: Garland STPM Press, 1978, p. 141-152, 153-176.

**Foyer, P., Bjallerhag, N., Wilsson, E., Jensen, P.,** (2013). *Early experiences modulate stress coping in a population of German shepherd dogs*. Applied Animal Behaviour Science. 146: 79-87.

**Fradrich, H.,** (1974). *A comparison of behaviour in the (Suidae)*. In: Geist, V., Walther, F., (eds.): *The Behaviour of Ungulates and its relation to Management*. IUCN, New Series. 24: 133-143.

**Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M. J.,** (1999b). *Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat*. Science. 286: 1155-1158.

**Francis, D., Meaney, M. J.,** (1999). *Maternal care and the development of stress responses*. Current Opinions in Neurobiology. 9(1): 128-134.

**Francis, D. D., Caldji, C., Champagne, F., Plotsky, P. M., Meaney, M. J.,** (1999). *The role of corticotropin-releasing factor-norepinefrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress*. Biol. Psychiatry. 46: 1153-1166.

**Francis, D. D., Champagne, F.C., Meaney, M. J.,** (2000). *Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat*. J Neuroendocrinol. 12: 1145-8.

**Franklin, T. B., Mansuy, I.,** (2010). *Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects*. Neurobiology of Disease. 39: 61-65.

**Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Gräff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S., Mansuy, I. M.,** (2010). *Epigenetic Transmission of the Impact of Early Stress Across Generations*. Biol. Psychiatry. 68: 408-415

**Fraser, D.,** (1977). *Some behavioural aspects of milk ejection failure by sows*. Br. Vet. J. 133: 126-133.

**Freak, M. J.,** (1962). *Abnormal conditions associated with pregnancy and parturition in the bitch*. Vet. Rec. 74 (48): 1323.

- Fredericson, E., Gurney, N., Dubois, E.,** (1956). *The relationship between environmental temperature and behavior in neonatal puppies.* J. Comp. Physiol. Psychol. 49(3): 278-280.
- Freedman, D. G., Kingand, J. A., Elliot, E.,** (1961). *Critical periods in the social development of dogs.* Science. 132: 1016-1017.
- Freeman, D.,** (1958). *Costitutional and environmental interactions in the rearing of four breeds of dogs.* Science. 127: 585-586.
- Fride, E., Weinstock, M.,** (1984). *The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat.* Developmental. Psychobiology. 17: 651-660.
- Friedman, S., Smith, L., Fogel, D., Paradis, C., Viswanathan, R., Ackerman, R., Trappier, B.,** (2002). *The incidence and influence of early traumatic life events in patients with panic disorder: a comparison with other psychiatric outpatients.* Journal of Anxiety Disorders 16: 259–272.
- Fuller, J., Fox, M. W.,** (1969). *The behaviour of dogs.* In: E. S. E. Hafez (Editor). *The Behavior of Domestic Animals.* Balliere, Tindall e Cox, London, 204pp.
- Galler, J.R., Turkewitz, G.,** (1975). *Variability of the effects of rearing in a large litter on the development of the rat.* Dev. Psychobiol. 8: 325–331.
- Gammie, S. C., Negron, A., Newman, S. M., Rhodes, J. S.,** (2004). *Corticotropin releasing factor inhibits maternal aggression in mice.* Behav. Neurosci. 118: 105-114.
- Gandelman, R., Zarrow, M. X., Denenberg, V. H.,** (1971a). *Stimulus control of cannibalism and maternal behavior in anosmic mice.* Physiol. Behav. 7 : 583-586.
- Gandelman, R., Zarrow, M. X., Denenberg, V. H.,** (1971b). *Olfactory bulb removal eliminates maternal behavior in the mouse.* Science. 171: 210-211.
- Gaultier, E.,** (2000). *La communication canine.* Actes de cours de formation pour l'obtention du titre de Vétérinaire Comportementaliste des ENV Françaises, Toulouse.
- Giles, W.H.,** (2001). *Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study.* JAMA 286, 3089–3096.
- Gill, J. C., Thomson, W.,** (1956). *Observation on the behaviour of suckling pigs.* Br. J. Anim. Behav. 4: 46-51.
- Giovenardi, M., Padoin, M. J., Cadore, L. P., Lucion, A. B.,** (1997). *Hypothalamic paraventricular nucleus, oxytocin and maternal aggression in rats.* Ann. N Y Acad. Sci. 807: 606-609.
- Giovenardi, M., Padoin, M. J., Cadore, L. P., Lucion, A. B.,** (1998). *Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid*

*lesion and oxytocin antisense*. *Physiol. Behav.* 63: 351-359.

**Glaser, D.**, (2000). *Child abuse and neglect and the brain: A review*. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*. 41(1): 97-116.

**Gonzales-Mariscal, G., Melo, A. I., Parlow, A. F., Beyer, C., Rosenblatt, J. S.**, (2000). *Pharmacological evidence that prolactin acts from late gestation to promote maternal behaviour in rabbits*. *J. Neuroendocrinol.* 12: 983-992.

**Gonzalez, A., Lovic, V., Ward, G. R., Wainwright, P. E., Fleming, A. S.**, (2001). *Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats*. *Dev. Psychobiol.* 38: 11-32.

**Gray, J. A., McNaughton, N.**, (1983). *Comparison between the behavioural effects of hippocampal and septal lesions: a review*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7: 119-188.

**Grota, L. J., Ader, R.**, (1969). *Effects of litter size on emotionality, adrenocortical reactivity, and susceptibility to gastric erosions in the rat*. *Psychological Reports*. 24: 547-549.

**Gruendel, A. D., Arnold, W. J.**, (1969). *Effects of early social deprivation on reproductive behavior in male rats*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 67(1): 123-128.

**Grundlach, H.**, (1968). *Brufursorge, Brutpflege, Verhaltesontogenese und Tagesperiodik beim Europaischen Wildschwein (Sus scrofaL)*. *Z. Tierpsychol.* 25: 955-995.

**Gudsnuk, K. M. A., Champagne, F. A.**, (2011). *Epigenetic Effects of Early Developmental Experiences*. *Clin Perinatol.* 38: 703-717.

**Guerra, R. F., Vieira, M. L.**, (1990). *Some notes on mother-infant interactions and infant development in Golden hamster (Mesocricetus auratus)*. *Ci. Cult.* 42 (12): 1115-1123.

**Guerra, R. F., Vieira, M. L., Gasparetto, S.**, (1991). *Effects of mother-infant separation on infant development and maternal responsiveness in Golden hamster (Mesocricetus auratus)*. *Ci. Cult.* 43 (5): 369-373.

**Guerra, R. F., de O Nunes, C. R.**, (2001). *Effects of litter size on maternal care, body weight and infant development in golden hamsters (Mesocricetus auratus)*. *Behavioural Processes* 55: 127-142.

**Gunzenhauser, N.**, (1987). *Infant stimulation: for whom, what kind, when and how much?* Johnson and Johnson: Safe Harbor, CT.

**Guo, A., Nappi, R. E., Criscuolo, M., Ficarra, G., Amram, A., Trentini, G. P., Petraglia, F., Genazzani, A. R.**, (1993). *Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development*. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*. 51: 41-45.

- Hadley, J. C.**, (1975). *Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during the oestrus cycle of the dog*. J Reprod Fertil. 44(3): 445.
- Hall, F. S.**, (1998). *Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences*. Critical Reviews in Neurobiology. 12(1-2): 129-162.
- Haltmeyer, G. C., Denenberg, V. H., Thatcher, J., Zarrow, M. X.**, (1966). *Response of the adrenal cortex of the neonatal rat after subjection to stress*. Nature. 212: 1371-1373.
- Hane, A. A., Fox, N. A.**, (2006). *Ordinary variations in maternal caregiving influence human infants' stress reactivity*. Psychol Sci 17(6): 550–6.
- Hansen, S.**, (1989). *Medial Hypothalamic involvement in maternal aggression of rats*. Behav. Neurosci. 103: 1035-1046.
- Harlow, H. F., Harlow, M. K., Hansen, E. W.**, (1963). *The maternal affectional system of Rhesus Monkeys*. In Rheingold, H. L., (eds.): *maternal behaviour in mammals*. John Wiley and sons, inc., New York
- Harman, P. J.**, (1958) Private communication. In Scott and Fuller, 1965.
- Harper, L. V.**, (2005). *Epigenetic inheritance and the intergenerational transfer of experience*. Psychol Bull 131: 340 –360.
- Harris, G. W.**, (1958). *The central nervous system, neurohypophysis and milk ejection*. Proc. Roy. Soc. 149: 336-353
- Harrop, A. E.**, (1960). *Reproduction in the dog*. Balliere, Tindall e Cox, London, 204pp.
- Hart, B. L.**, (1979). *Maternal behavior in the twentieth century*. Canine Pract. 6(6): 18.
- Hart, B. L.**, (1980). *Postparturient maternal responses and mother-young interactions*. Canine Pract. 7(1):10
- Hart, B. L.**, (1975). *Gonadal hormones and behaviour of the female of dog*. Canine Pract. 5(2):8
- Hart, B. L., Hart, L. A.**, (1985). *Canine and feline behavioral therapy*. Philadelphia, PA: Lea & Febiger.
- Hartsock, T. G., Graves, H. G.**, (1976). *Neonatal behavior and nutrition-related mortality in domestic swine*. J. Anim. Sci. 42: 235-241.
- Hatton, G. I., Yang, Q. Z.**, (1990). *Activation of excitatory amino acid inputs to supraoptic neurons. I. Induced increases in dye-coupling in lactating, but not virgin or male rats*. Brain. Res. 513: 264-269.

- Heggeness, F. W., Bindschadler, D., Chadwick, J., Conklin, P., Hulnick, S., Oaks, M.,** (1961). *Weight gains of overnourished and undernourished preweaning rats.* J. Nutr. 75, 39–44.
- Heidbreder, C. A., Weiss, I. C., Domeney, A. M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M. C., Nelson, P.,** (2000). *Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome.* Neuroscience. 100: 749–68.
- Heim, C., Newport, D. J., Heit, S., Graham, Y. P., Wilcox, M., Bonsall, R.,** (2000). *Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood.* JAMA. 284: 592-597.
- Heim, C., Nemeroff, C.B.,** (2001). *The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies.* Biological Psychiatry. 49: 1023–1039.
- Hemsworth, P., Barnett, J., Hansen, C., Gonyou, H.,** (1986). *The influence of early contact with humans on subsequent behavioural response of pigs to humans.* Applied Animal Behaviour Science. 15: 55-63.
- Hemsworth, P., Barnett, J.,** (1992). *The effects of early contact with humans on the subsequent level of fear of humans in pigs.* Applied Animal Behaviour Science. 35: 83-90.
- Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M., Maccari, S.,** (1994). *Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats.* Journal of Neuroendocrinology. 6: 341-345.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E.,** (1997). *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.* Trends Neurosci. 13: 1097-1105.
- Herrenkhol, L. R., Rosenberg, P. A.,** (1972). *Exteroceptive stimulation of maternal behavior in the naive rat.* Physiol. Behav. 8: 595-598.
- Higuchi, T., Honda, K., Fukuoka, T., Negoro, H., Wakabayashi, K.,** (1985). *Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat.* J. Endocrinol. 105: 339-346.
- Hirshfeld, D. R., Biederman, J., Brody, L., Faraone, S. V., Rosenbaum, J. F.,** (1997a). *Associations between expressed emotion and child behavioural inhibition and psychopathology: A pilot study.* J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry. 36: 205-213
- Hirshfeld, D. R., Biederman, J., Brody, L., Faraone, S. V., Rosenbaum, J. F.,** (1997b). *Expressed emotion toward children with behavioural inhibition: Associations with maternal anxiety disorder.* J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry. 36: 910-917.
- Hofer, M. A.,** (1984). *Relationships as regulators: a psychobiologic perspective on bereavement.* Psychosom. Med. 46: 183-197.
- Hofer, M. A., Shair, H. N.,** (1993 ). *Ultrasonic vocalization, laryngeal braking and thermogenesis in rat pups: A reappraisal.* Behavioral Neuroscience. 107: 354-362.

- Holst, P. A., Phemister, R. D.,** (1975). *Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch.* Am J vet Res. 36(5):705.
- Hooley, J. M., Simpson, M. J. A.,** (1981). *A comparison of primiparous and multiparous mother-infant dyads in Maraca mulatto.* Primates. 22: 379-392.
- Hoskins, J. D.,** (2001). *DVMs can help clients understand behaviors during, after delivery.* DVM June 2001:2S
- Houpt, K. A.,** (2011). *Domestic Animal Behaviour for veterinarians and animal scientists.* Fifth Edition, Wiley-Blackwell. Maternal behaviour chapter 5, pp 135-170.
- Hsu, Y., Serpell, J. A.,** (2003). *Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs.* J. Am. Vet. Med. Assoc. 223: 1293-1300.
- Hudson, S. J., Mullord, M. M.,** (1977). *Investigation of maternal bonding in dairy cattle.* Applied Animal Ethology. 3: 271-276.
- Ihnat, R., White, N. R., Barfield, R. J.,** (1995). *Pup's broadband vocalizations and maternal behaviour in the rat.* Behav. Proc. 33: 257-272.
- Insel, T. R., Harbaugh, C. R.,** (1989). *Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior.* Physiol. Behav. 45: 1033-1041.
- Ivy, A. S., Brunson, K. L., Sandman, C., Baram, T. Z.,** (2008). *Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress.* Neuroscience. 154: 1132-42.
- Jablonka, E., Lamb, M. J.,** (2002). *The changing concept of epigenetics.* Ann N Y Acad Sci. 981: 82-96.
- Jacobs, B. S., Moss, H. A.,** (1976). *Birth order and sex of sibling as determinants of mother-infant interaction.* Child Development. 47: 315-322.
- Jacobson, C. D., Terkel, J., Gorski, R. A., Sawyer, C. H.,** (1980). *Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behaviour: retrieving and nestbuilding in the rat.* Brain. Res. 194: 471-478.
- Jacobson, L., Sapolsky, R. M.,** (1991). *The role of the hippocampus in feed-back regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.* Endocr. Rev. 12: 118-134.
- James, W. T.,** (1952). *Observations on the behavior of new-born puppies: method of measurement and types of behavior involved.* J. Genetic Psychol. 80: 65-73
- Jensen, C., Ederstrom, E.,** (1955). *Development of temperature regulation in the dog.* Amer. J. Physiol., 183: 340-344

**Jensen, P.**, (1986). *Observation on the maternal behaviour of free-ranging domestic pigs*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 16: 131-142.

**Jensen, P., Stangel, G., Algers, B.**, (1991). *Nursing and suckling behavior of semi-naturally kept in pigs during the first 10 days postpartum*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 31: 195-209.

**Jensen, P.**, (1993). *Nest building in domestic sows: the role of external stimuli*. *Anim. Behav.* 45: 351-358.

**Jirik-Babb, P., Manaker, S., Tucker, A. M., Hofer, M.**, (1984). *The role of the accessory and main olfactory systems in maternal behavior of the primiparous rat*. *Behav. Neural. Biol.* 40: 170-178.

**Johnson, J.G., Cohen, P., Gould, M.S., Kasen, S., Brown, J., Brook, J.S.**, (2002). *Childhood adversities, interpersonal difficulties, and risk for suicide attempts during late adolescence and early adulthood*. *Archives of General Psychiatry* 59: 741–749.

**Jonson C. A., Grace J. A.**, (1987). *Care of newborn puppies and kittens*. *Forum.* 6(1):9

**Kemps, A., Timmermans, P.**, (1984). *Effects of social rearing conditions and partus experience on periparturitional behaviour in Java-macaques (*Macaca fascicularis*)*. *Behaviour.* 88: 200-214.

**Kemps, A., Timmermans, P., Vossen, J.**, (1989). *Effects of mother's rearing condition and multiple motherhood on the early development of mother-infant interactions in Java-macaques (*Macaca fascicularis*)*. *Behaviour.* 111: 1-4.

**Kendler, K.S., Kessler, R.C., Walters, E.E., MacLean, C., Neale, M.C., Heath, A.C., Eaves, L.J.**, (1995). *Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women*. *American Journal of Psychiatry.* 152: 833–842.

**Kendrick, K. M., Levy, F., Keverne, E. B., Chapman, C., Baldwin, B. A.**, (1988). *Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, GABA and glutamate release from the olfactory bulb of sheep during vaginocervical stimulation*. *Brain. Res.* 442: 171-177.

**Kendrick, K. M., Levy, F., Keverne, E. B.**, (1991). *Importance of vaginocervical stimulation for the formation of maternal bonding in primiparous and multiparous parturient ewes*. *Physiol. Behav.* 50: 595-600.

**Kendrick, K. M., Da Costa A. P. C., Broad, K. D., Ohkura, S., Guevara, R., Levy, F., Kevernet, E. B.**, (1997). *Neural control of Maternal Behaviour and Olfactory Recognition of offspring*. *Brain Research Bulletin.* 44: 383-395.

**Kendrick, K. M.**, (2000). *Oxytocin, motherhood, and bonding*. *Exp. Physiol.* 85: 111S-124S.

**Kenyon, P., Cronin, P., Keeble, S.**, (1981). *Disruption of maternal retrieving by perioral anesthesia*. *Physiol. Behav.* 27: 313-321.

- Kenyon, P., Cronin, P., Keeble, S.,** (1983). *Role of the infraorbital nerve in retrieving behaviour in lactating rats.* Behav. Neurosci. 97: 255-269.
- Keverne, E. B., Levy, F. P., Poindron, P., Lindsay, D. R.,** (1983). *Vaginal stimulation : an important determinant of maternal bonding in sheep.* Science. 219: 81-83
- Keverne, E. B., Martensz, N., Tuite, B.,** (1989). *B-endorphin concentrations in CSF of monkeys are influenced by grooming relationship.* Psychoneuroendocrinology. 14: 155-161.
- Kikusui, T., Isaka, Y., Mori, Y.,** (2005). *Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood.* Behav. Brain. Res. 162: 200–6.
- Kim, H. K., Capaldi, D. M., Pears, K. C., Kerr, D. C., Owen, L. D.,** (2009). *Intergenerational transmission of internalising and externalising behaviours across three generations: Gender-specific pathways.* Crim Behav Ment Health. 19:125–141.
- Kinsley, C. H.,** (2008). *The neuroplastic maternal brain.* Hormones and Behavior. 54: 1-4.
- Kleiman, D. G., Eisenberg, J. F.,** (1973). *Comparisons of canid and felid social system from an evolutionary perspective.* Anim. Behav. 21: 637-659.
- Kleiman, D. G., Malcolm, J.,** (1981). *The evolution of male parental investment in mammals.* In: Gubernick, D. J., Klopfer, P. H., (eds.). *Parental care in mammals.* New York. Plenum Press. pp 347-387.
- Klein, S. L., Lambert, K. G., Durr, D., Schaeffer, T., Waring, R.** (1994). *Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats.* Physiol. Behav. 56: 291-297.
- Klinge, C.M.,** (2001). *Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.* Nucleic Acids Res. 29: 2905–2919.
- Kohronen, H., Marnila, P., Gill, H. S.,** (2000a). *Milk immunoglobulins and complement factors.* Br. J. Nutr. 84: 575-580.
- Kohronen, H., Marnila, P., Gill, H. S.,** (2000b). *Bovine milk antibodies for health.* Br. J. Nutr. 84: S135-S146.
- Kolunie, J. M., Stern, J. M., Barfield, R. J.,** (1994). *Maternal aggression in rats: effects of visual or auditory deprivation of the mother and dyadic pattern of ultrasonic vocalizations.* Behav. Neural. Biol. 62: 41-49.
- Kolunie, J. M., Stern, J. M.,** (1995). *Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO4-induced anosmia, and vomeronasal organ removal.* Horm. Behav. 29: 492-518.
- Konig, B., Markl, H.,** (1987). *Maternal care in house mice.* Behav. Ecol. Sociobiol. 20: 1–9.

- Korda, P., Brewinska, J.,** (1977). *The effect of stimuli emitted by suckling on tactile contact of the bitches with sucklings and on number of lickings act.* Acta Neurobiol Exp. 37:99.
- Korda, P., Brewinska, J.,** (1977). *The effect of stimuli emitted by suckling on the course of their feeding by bitches,* Acta Neurobiol Exp. 37:117.
- Kuhn, C., Paul, J., Schanberg, S.,** (1990). *Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats.* Develop. Psychobiol., 23: 395-410.
- Kuyk, K., Dazey, J., Erwin, J.,** (1977). *Primiparous and multiparous pigtail monkey mothers (Macaca nemestrina): restraint and retrieval of female infants.* J. biol. Psychol. 18: 1619.
- Kiyono, S., Seo, M. L., Shibagaki, M., Inouye, M.,** (1985). *Facilitative effects of maternal environmental enrichment on maze learning in rat offspring.* Physiol. Behav. 34:431-5.
- Landgraf, R., Neumann, I., Russel, J., Pittman, Q.,** (1992). *Push-pull perfusion and microdialysis studies of central oxytocin and vasopressin release in feely moving rats during pregnancy, parturition and lactation.* Acad. Sci. (NY). 652: 326-339.
- Latham, N. R., Mason, G. J.,** (2007). *Maternal deprivation and the development of stereotypic behaviour.* Applied Animal Behaviour Science. 110: 84-108.
- Lawrence, A. B., Mc Lean, K. A., Jarvis, S., Gilbert, C. S., Petherick, J. C.,** (1997). *Stress and parturition in the pig.* Reprod. Domest. Anim. 32: 231-236.
- Lay Jr., D. C.,** (2000). *Consequences of stress during development.* In: Moberg, G. P., Mench, J. A., (eds.). *The Biology of Animal Stress, Basic Principles and Implications for Animal Welfare.* CABI Publishing, UK. Chapter 12. pp 249-267.
- Lee, M. H. S., Williams, D. I.,** (1974). *Changes in licking behaviour of rat mother following handling of young.* Anim. Behav. 22: 679-681.
- Lee, M. H. S., Williams, D. I.,** (1975). *Long term changes in nest condition and pup grouping following handling of rats litter.* Dev. Psychobiol. 8: 91-95.
- Lee, A., Clancy, S., Fleming, A. S.,** (2000). *Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the MPOA and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement.* Behav. Brain. Res. 108: 215.
- Lehmann, J., Feldon, J.,** (2000). *Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing?* Reviews in the Neurosciences 11: 383-408.
- Levine, S.,** (1956). *A further study of infantile handling and adult avoidance learning.* J. Pers. 25: 70-80.
- Levine, S., Alpert, M., Lewis, G. W.,** (1957). *Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis.* Science. 126: 1347.

- Levine, S.,** (1962). *Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy*. *Science*. 135: 795-796.
- Levine, S.,** (1975). *Psychosocial factors in growth and development*. In: Levi L., (eds.). *Society, Stress and Disease*. London, Oxford University Press. pp 43–50.
- Levine, S., Huchton, D. M., Wiener, S. G., Rosenfeld, P.,** (1992). *Time Course of the Effect of Maternal Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Infant Rat*. *Developmental Psychobiology*. 24(8): 547-558.
- Levine, S.,** (2000). *Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis*. *European Journal of Pharmacology* 405: 149–160.
- Levy, F., Poindron, P., Le Neindre, P.,** (1983). *Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition*. *Physiol. Behav.* 31: 687-692.
- Levy, F., Poindron, P.,** (1987). *Importance of amniotic fluids for the establishment of maternal behaviour in relation with maternal experience in sheep*. *Anim. Behav.* 35: 1188-1192.
- Levy, F., Locatelli, A., Piketty, V., Tillet, Y., Poindron, P.,** (1995). *Involvement of the main but not accessory olfactory system in maternal behavior of primiparous and multiparous ewes*. *Physiol. Behav.* 57: 97-104.
- Levy, F., Kendrick, K. M., Keverne, E. B., Porter, R. H., Romeyer, A.,** (1996). *Physiological, sensory, and experiential factors of parental care in sheep*. In: Rosenblatt, J. S., Snowdon, C. T., editors. *Parental care: evolution, mechanism and adaptive significance*. San Diego. Academic Press. pp 385-416.
- Levy, F., Melo, A. I., Galef, J. R., Madden, M., Fleming, A. S.,** (2003). *Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats*. *Dev. Psychobiol.* 43: 177-191.
- Levy, F., Keller, M., Poindron, P.,** (2004). *Olfactory regulation of maternal behavior in mammals*. *Hormones and Behavior* 46: 284-302
- Lewis, N. J., Hurnik, J. F.,** (1986). *An approach response of piglets to the sow's nursing vocalizations*. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 537-539.
- Lisk, R. D., Pretlow, R. A., Friedman, S. A.,** (1969). *Hormonal stimulation necessary for eliciting of maternal nest building in the mouse*. *Anim. Behav.* 17: 730-738.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J.,** (1997). *Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, And Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress*. *Science*. 277: 1659-1662
- Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P. M., Meaney, M. J.,** (2000b). *Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *J.*

Neuroendocrinol. 12: 5-12.

**Lonstein, J. S., Stern, J. M.,** (1997a). *Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: cfos and electrolytic lesion studies in lactating rats.* J. Neurosci. 17: 3364-3378.

**Lonstein, J. S., Stern, J. M.,** (1998). *Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal and aggressive behaviors in rats.* Brain Res. 804: 21-35.

**Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J.,** (2000). *Chronic stress in pregnant rats: Effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring.* International Journal of Psychophysiology. 37: 195-205.

**Lorenz, K.,** (1935). *Der Kumpan in der Umwelt des Vogels.* J. Ornith. 83: 137-413

**Lovic, V., Gonzalez, A., Fleming, A. S.,** (Manuscript submitted for Publication). *Effects of preweaning deprivation on the development of juvenile and adult maternal behavior.*

**Lovic, V., Gonzalez, A., Fleming, A. S.,** (2001). *Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood.* Dev. Psychobiol. 39: 19–33.

**Lovic, V., Fleming, A. S.,** (2004). *Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task-reversal of effects with maternal-like licking stimulation.* Behav. Brain Res. 148: 209-219.

**Lucas, B., Ormandy, C., Binart, N., Bridges, R., Kelly, P.,** (1998). *Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behaviour.* Endocrinology. 139: 4102-4107.

**Luckman, S. M.,** (1995). *Expression within regions of the preoptic area, hypothalamus and brainstem during pregnancy and parturition.* Brain Res. 669: 115-124.

**Luescher, A. U.,** (2011). *Canine Behavioral Development.* In: Peterson, M. E., Kutzler, M. A., (eds.). *Small Animal Pediatrics.* St. Louis, Elsevier. Chapter 13. pp 97-103.

**Lupien, S., Meaney, M. J.,** (1998). *Stress, glucocorticoids and hippocampus aging in rat and human.* Handbook of Human Aging, New York: Academic Press.

**Macbeth, A. H., Scharfman, H. E., Mac Lusky, N. J., Luine, V. N.,** (In Press). *Multiparity enhances recognition memory: role of monoaminergic neuro-transmitters and brain-derived neurotrophics factors (BDNF).* Hom. Behav.

**Macbeth, A. H., Luine, V. N.,** (2010). *Changes in anxiety and cognition due to reproductive experience: A review of data from rodent and human mothers.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 34: 452-467.

**Macri, S., Laviola, G.,** (2004). *Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence.* Behav. Brain Res. 154: 231-238.

- Macri, S., Wurbel, H.,** (2006). *Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis*. *Horm. Behav.* 50: 667-680.
- Macri, S., Wurbel, H.,** (2007). *Effects of variation in postnatal maternal environment on maternal behaviour and fear and stress responses in rats*. *Anim. Behav.* 73: 171-184.
- Malm, K.,** (1995). *Regurgitation in relation to weaning in the domestic dog: a questionnaire study*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 43: 111-122.
- Marazziti, D., Roncaglia, I., Piccinni, A., Dell' Osso, L.,** (2008). *Aspetti neurobiologici dell' attaccamento*. *Giorn. Ital. Psicopat.* 14: 58-71.
- Margulis, S. M., Nabong, M., Alaks, G., Walsh, A., Lacy, R. C.,** (2005). *Effects of early experience parental behaviour and reproductive success in oldfield mice, Peromyscus polionotus*. *Animal Behaviour.* 69: 627-634.
- Martins, T.,** (1949). *Disgorging of food to the puppies by the lactating dog*. *Physiol. Zool.* 22: 168-172
- Masken, J. F.,** (1973). *Circulating hormone levels in the cycling beagle*. *Gaines Dog Research Progress.* Winter:7.
- Masis-Calvo, M., Sequeira-Cordero, A., Mora-Gallegos, A., Fornaguera-Trias, J.,** (2013). *Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats*. *Physiology and Behavior.* 118: 212-217.
- Mason, W. A.,** (2000). *Early developmental influences of experience on behaviour, temperament and stress*. In: Moberg, G. P., Mench, J. A., (eds.). *The Biology of Animal Stress, Basis Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing. UK, (Chapter 13). pp 269-290.
- Maestripietri, D., Alleva, E.,** (1990). *Maternal aggression and litter size in the female house mice*. *Ethology* 84: 27-34.
- Maestripietri, D., Wallen, K., Carroll, K. A.,** (1997). *Infant abuse runs in families of group-living pigtail macaques*. *Child. Abuse Negl.* 21: 465-71.
- Maestripietri, D., Zehr, J. L.,** (1998). *Maternal Responsiveness Increases during Pregnancy and after Estrogen Treatment in Macaques*. *Hormones and Behavior.* 34: 223-230.
- Maestripietri, D.,** (1998). *Parenting styles of abusive mothers in group-living rhesus macaques*. *Anim Behav.* 55: 1-11.
- Maestripietri, D.,** (1999). *Fatal attraction: interest in infants and infant abuse in rhesus macaques*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 110: 17-25.
- Maestripietri, D., Carroll, K. A.,** (1998). *Child abuse and neglect: usefulness of the animal data*. *Psychol Bull.* 123: 211-23.

- Maestripietri, D.**, (2005). *Early experience affects the intergenerational transmission of infant abuse in rhesus monkeys*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102: 9726–9.
- Malm, K., Jensen, P.**, (1996). *Weaning in dogs: within and between litter variation in milk and solid food intake*. Applied Animal Behaviour Science. 49: 223-235.
- Mathew, S.J., Mao, X., Coplan, J.D., Smith, E.L., Sackeim, H.A., Gorman, J.M., Shungu, D.C.**, (2004). *Dorsolateral prefrontal cortical pathology in generalized anxiety disorder: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study*. American Journal of Psychiatry 161: 1119–1121.
- Matthiesen, A .S., Ransjo-Arvidson, A. B., Nissen, E., Uvnas-Moberg, K.**, (2001). *Postpartum maternal oxytocin release by newborns: effects of infant hand massage and sucking*. Birth 28: 13–19.
- Matza, L.S., Revicki, D.A., Davidson, J.R., Stewart, J.W.**, (2003). *Depression with atypical features in the National Comorbidity Survey: classification, description, and consequences*. Archives of General Psychiatry 60: 817–826.
- Mayer, A. D., Reisbick, S., Siegel, H. I., Rosenblatt, J. S.**, (1987). *Maternal aggression in rats: Changes over pregnancy and lactation in a Sprague-Dawley strain*. Aggress. Behav. 13: 29-43.
- McCarty, R., Lee, J. H.**, (1996). *Maternal influences on adult blood pressure of SHR: a single pup cross-fostering study*. Physiol. Behav. 5: 71-75.
- MacDonald, D. W.**, (1981). *The Behaviour and ecology of farm cats*. In: Bar, P., (eds.). *The ecology and control of feral cats*. Universities Federation for Animal Welfar. UK. 23-29.
- Macdonald, D. W., Carr, G. M.**, (1995). *Variation in dog society: between resource dispersion and social flux*. In: Serpell, J. (eds.). *The Domestic Dog: Its Evolution, Behaviour and Interactions with People*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 199–216.
- McHolm, A.E., MacMillan, H.L., Jamieson, E.**, (2003). *The relationship between childhood physical abuse and suicidality among depressed women: results from a community sample*. American Journal of Psychiatry. 160: 933–938.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., Sapolsky, R. M.**, (1985). *The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in the rat*. Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry. 9: 731-734.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Van Berel, C., Sapolsky, R. M.**, (1988). *Postnatal handling attenuates neuroendocrine, anatomical and cognitive impairments related to the aged hippocampus*. Science. 238: 766-768.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Sharma, S., Viau, V., Sarrieau, A.**, (1989). *Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances*

- adrenocortical negative feed-back efficacy in the rat.* Neuroendocrinology. 51: 597-604.
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Sapolsky, R. M., Bhatnagar, S.,** (1991). *Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical and cognitive dysfunctions with aging in female rats.* Neurobiology of Aging. 12: 31-38.
- Meaney, M. J., Tannenbaum, B., Francis, D. D., Bhatnagar, S., Shanks, N., Viau, V., O' Donnell, D., Plotsky, P. M.,** (1994). *Early environmental programming hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress.* Semin. Neurosci. 6: 247-259.
- Meaney, M. J., Diario, J., Francis, D., Widdowson, J., Lappante, P., Caldi, C., Sharma, S., Seckl, J. R., Polsky, P. M.,** (1996). *Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress.* Dev. Neurosci. 18: 49-72.
- Meaney, M. J.,** (2001). *Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences in stress across generations.* Annu. Rev. Neurosci. 24: 1161-1192.
- Mech, L.D.,** (1970). *The Wolf: Ecology and Behavior of an Endangered Species.* Doubleday, New York. pp 384.
- Medini, P., Pizzorusso, T.,** (2008). *Visual experience and plasticity of the visual cortex: a role for epigenetic mechanisms.* Front Biosci. 13: 3000–3007.
- Meek, L. R., Dittel, P. L., Sheenan, M. C., Chan, J. Y., Kjolbaug, S. R.,** (2001). *Effects of stress during stresson maternal behaviour in mice.* Physiol. Behav. 72: 473-479.
- Meerlo, P., Horvath, K. M., Nagy, G. M., Bohus, B., Koolhas, J. M.,** (1999). *The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity.* J. Neuroendocrinol. 11: 925-933.
- Meites, J., Turner, C. W.,** (1942). *Studies concerning mechanism controlling initiation of lactation at parturition. IV. Influence of suckling on lactogen content of pituitary of postpartum rabbits.* Endocrinology. 31: 340-344.
- Melo, A. I., Lovic, V., Gonzales, A., Madden, M., Sinopoli, K., Fleming, A. S.,** (2006). *Maternal and littermate deprivation disrupts maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: Tactile stimulation, nest odor, and social rearing prevent these effect.* Dev. Psychobiol. 48: 209-219.
- Melzack, R.,** (1954). *The genesis of emotional behaviour: an experimental study of the dog.* J. Comp. Physiol. Psychol. 47: 166-168.
- Menard, J. L., Hakvoort, R. M.,** (2007). *Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: evidence for a threshold model.* Behav. Brain Res. 176: 302-313.
- Mendl, M., Paul, E. S.,** (1990). *Litter composition affects parental care, offspring growth and the development of aggressive behaviour in wild house mice.* Behaviour 116: 90–108.

- Meunier-Salaun, M., Gort, F., Prunier, A., Schouten, W.,** (1991). *Behavioural patterns and progesterone, cortisol and prolactin levels around parturition in European (Large White) and Chinese (Meishan) sows.* Appl. Anim. Behav. Sci. 31: 43-59.
- Meunier, J. M., Shvaloff, A.,** (1992). *Les neurotransmetteurs.* Masson, Paris. 261 pages.
- Mill, J., Tanq, T., Kaminsky, Z., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., Jia, P., Assadzadeh, A., Flanagan, J., Schumacher, A., Wang, S. C., Petronis, A.,** (2008). *Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis.* Am. J. Hum. Genet. 82: 696–711.
- Miller, L., Kramer, R., Warner, V., Wickramaratne, P., Weissman, M.,** (1997). *Intergenerational transmission of parental bonding among women.* J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 36: 1134–9.
- Miller, D. B.,** (1998). *Epigenesis.* In Greenberg, G., Haraway, M. M., (Eds.). *Comparative psychology: A handbook* New York: Garland. pp 105-106.
- Mills D., Levine E., Landsberg G., et al.,** (2005). *Current Issues and research in Veterinary Behavioral Medicine.* Purdue University Press, West Lafayette, (IN).
- Millstein, R. A., Holmes, A.,** (2007). *Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strain.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 31: 3-17.
- Mitchell, G. D., Stevens, C. W.,** (1968). *Primiparous and multiparous monkey mothers in a mildly stressful social situation: first three months.* Devl Psychobiol. 1: 28-286.
- Mitchell, G. D., Brandt E. M.,** (1970). *Behavioral differences related to experience of mother and sex of infant in the rhesus monkey.* Devl Psychol. 3: 149.
- Mitchell, J. B., Iny, L. J., Meaney, M. J.,** (1990). *The role of serotonin in the development and environmental regulation of type II corticosteroid receptor binding in rat hippocampus.* Dev. Brain Res., 55: 231-235.
- Mogi, K., Nagasawa, M., Kikusui, T.,** (2011). *Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 35: 1232-1241.
- Mohammed, A. H., Henriksson, B. G., Soderstrom, S., Ebendal, T., Olsson, T., Seckl, J. R.,** (1993). *Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat.* Behav. Brain Res. 57:183–91.
- Moltz, H., Robbins, D.,** (1965). *Maternal behaviour of primiparous and multiparous rats.* Journal of Comparative and Physiological Psychology. 60(3): 417-421.
- Moltz, Lubin, Leon e Numan,** (1970). *Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat.* Physiol. Behav. 5: 1373-1377.
- Moore, C. L., Power, K. L.,** (1986). *Prenatal stress affects mother-infant interaction in Norway rats.* Dev. Psychobiol. 19: 235-245.

- Nagy, Z. M., Porada, K. J., Anderson, J. A.,** (1977). *Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice.* J. Comp. Physiol. Psychol. 91: 682–696.
- Nephew, B. C., Bridges, R. S.,** (2008). *Central actions of arginine vasopressin and a V1a receptor antagonist on maternal aggression, maternal behaviour, and grooming in lactating rats.* Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 91: 77-83.
- Nephew, B. C., Byrnes, E. M., Bridges, R. S.,** (2009). *Vasopressin mediates enhanced offspring protection in multiparous rats.* Neuropharmacology. 58: 102-106.
- Neumann, I.D., Wigger, A., Kromer, S., Frank, E., Landgraf, R., Bosch, O.J.,** (2005). *Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety.* Neuroscience 132: 867–877.
- Newell, T.,** (1967). *Effect of maternal deprivation on later behavior in two inbred strains of mce.* Psychomon. Sci. 9: 119-120.
- Nithianantharajah, J., Hannan, A. J.,** (2006). *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.* Nat. Rev. Neurosci. 7: 697–709.
- Noirot, E.,** (1972). *Ultrasounds and maternal behavior in small rodents.* Developmental Psychobiology. 5(4): 371-387.
- Novakov, M., Fleming, A. S.,** (2005). *The effects of early rearing environment on the Hormonal induction of maternal behavior in virgin rats.* Horm. Behav. 48: 528-536.
- Nowak, R.,** (2006). *Suckling, Milk, and the Development of Preferences Toward Maternal Cues by Neonates: From Early Learning to Filial Attachment?.* Advances in the study of behaviour. Vol. 36
- Numan, M., Rosenblatt, J. S., Komisaruk, B. R.,** (1977). *Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat.* J. Comp. Physiol. Psychol. 91: 146-164.
- Numan, M.,** (1990). *Long term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of rats.* Behave. Neural. Biol. 53: 284-290.
- Numan, M.,** (1994). *Maternal behavior.* In: Knobil, E., Neill, J. D., (eds.). *The physiology of reproduction.* New York. Raven Press. 2: 221-302.
- Numan, M., Numan, M. J.,** (1994). *Expression of fos like immunoreactivity in the preoptic area of maternally behaving virgin and postpartum rats.* Behav. Neurosci. 108: 379-394.
- Numan, M., Numan, M. J.,** (1994). *Importance of pup-related sensory inputs and maternal performance fort he expression of fos-like immunoreactivity in the preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis of post partum rats.* Behav. Neurosci. 109: 133-149.

- Numan e Numan** (1997). *Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express*. Journal of Neuroendocrinology. 9: 369-384.
- Numan, M., Insel, T. R.**, (2003). *The Neurobiology of Parental Behavior*. Springer-Verlag. New York. Inc.
- O' Donnel, D., Larocque, S., Seckl, J. R., Meaney, M. J.**, (1994). *Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralcorticoid messenger RNA expression in the hippocampus of adult rats*. Mol. Brain Res. 26: 242-248.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., Ptaff, D. W.**, (1998). *Roles of estrogen receptor-alfa gene expression in reproduction-related behaviors in female mice*. Endocrinology. 139: 5070-5081.
- Okano, M., Xie, S., Li, E.**, (1998). *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet. 19:219–220.
- Olson, P. N., Bowen, R. A., Behrendt, M. D.**, (1984). *Concentrations of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus and early diestrus*. Am J Vet Res. 45(1):145
- Orpen, B. G., Fleming, A. S.**, (1987). *Experience with pups sustains maternal responding in post partum rats*. Physiology and Behavior. 40: 47-54.
- Ostermeyer, M. C., Elwood, R. W.**, (1983). *Pup recognition in Mus musculus: parental discrimination between their own and alien young*. Dev. Psychobiol. 16: 75-82.
- Packard, J. M., Mech, L.D., Ream, R. R.**, (1992). *Weaning in an arctic wolf pack: behavioral mechanisms*. Can. J. Zool. 70: 1269-1275.
- Pageat, P.**, (1984). *Etude clinique et expérimentale du comportement chez les carnivores domestiques*. Diss., Lyon
- Pageat, P.**, (1999). *Pathologie du comportement du chien*. Edition du Point Vétérinaire.
- Pal, S. K.**, (2005). *Parental care in free-ranging dogs, canis familiaris*. Appl Anim Behav Sci. 90:31
- Pardon, M. C., Gerardine, P., Joubert, C., Pèrez-Diaz, F., Cohen-Salmon, S.**, (2000). *Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behaviour in mice*. Biol. Psychiat. 47: 858-863.
- Parent, C., Zhang, T. Y., Caldji, C., Bagot, R., Champagne, F. A., Pruessner, J., Meaney, M. J.**, (2005). *Maternal Care and Individual Differences in Defensive Responses*. American Psychological Society. 14(5): 229-233.
- Paris, J. J., Frye, C. A.**, (2008). *Estrous cycle, pregnancy and parity enhance performance of rats in object recognition or object placement tasks*. Reproduction. 136: 105-115.

- Parker, G.**, (1989). *The Parental Bonding Instrument: psychometric properties reviewed*. *Psychiatr Dev.* 7: 317–35.
- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J.**, (2005). *Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats*. *Brain Res Dev Brain Res.* 160: 265–74.
- Pawluski, J. L., Charlier, T. D., Lieblich, S. E., Hammond, G. L., Galea, L. A. M.**, (2009). *Reproductive experience alters corticosterone and CBG levels in the rat dam*. *Physiology and Behavior*, 96: 108-114.
- Pedersen, C. A., Prange, A. J.**, (1979). *Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 76: 6661-6665.
- Pedersen, C. A., Caldwell, J. O., Walker, C., Ayers, G., Mason, G. A.**, (1994). *Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behaviour in the ventral tegmental and medial preoptic areas*. *Behav. Neurosci.* 108: 1163-1171.
- Pederson, D. R., Gleason, K. E., Moran, G., Bento, S.**, (1998). *Maternal attachment representations, maternal sensitivity, and the infant-mother attachment relationship*. *Dev Psychol.* 34: 925–33.
- Phemister, R. D., Holst, P. A., Spano, J. S., et al.**, (1973). *Time of ovulation in the Beagle bitch*. *Biol Reprod.* 8(1):74
- Plotsky, P. M., Meaney, M. J.**, (1993). *Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats*. *Mol. Brain Res.*, 18: 195-200.
- Poindron, P., Le Neindre, P.**, (1980). *Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the ewe*. *Adv. Study Behav* 11: 75-119.
- Poindron, P., Levy, F.**, (1990). *Physiological, sensory and experiential determinants of maternal behaviour in sheep*. In: Krasnegor, N. A., Bridges, R. B. (eds.). *Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological and Behavioral Determinants*. Oxford Univ. Press, New York. pp 133– 156.
- Poindron, P.**, (2005). *Mechanism of activation of maternal behaviour in mammals*. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 341-351.
- Preti, G., Meutterties, E. L., Furman, J., Kenelly, J. J., Johns, B.**, (1976). *Volatile constituents of dog (*Canis familiaris*) and coyote (*Canis latrans*) anal sacs*. *J. Chem. Ecol.* 2: 177-187.
- Priestnal, R.**, (1972). *Effects of litter size on the behaviour of lactating female mice (*Mus musculus*)*. *Anim. Behav.* 20: 386-394.
- Priestnall, R.**, (1973). *Effects of handling on maternal behaviour in the mouse (*Mus musculus*): an observational study*. *Anim. Behav.* 21: 383-386.

**Pryce, C.R., Feldon, J.,** (2003). *Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 27: 57–71.

**Pryce, C. R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A. C., Weston, A., Russig, H., Ferger, B., Feldon, J.,** (2005). *Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research.* Neurosci Biobehav Rev. 29:649–674.

**Putignano, E., Lonetti, G., Cancedda, L., Ratto, G., Costa, M., Maffei, L., Pizzorusso, T.,** (2007). *Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity.* Neuron. 53:747–759.

**Raineki, C., Moriceau, S., Sullivan, R. M.,** (2010). *Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver.* Biol Psychiatry. 67(12): 1137–45.

**Ranson, E.,** (1981). *A developmental analysis of urinary behaviour in dogs.* Ph. D. Dissertation, University of California, Berkley, CA, 193pp

**Razin, A.,** (1998). *CpG methylation, chromatin structure and gene silencing a three-way connection.* Embo J. 17: 4905-4908.

**Repetti, R. L., Taylor, S. E., Seeman, T. E.,** (2002). *Risky families: Family social environments and the mental and physical Health of offspring.* Psychological Bulletin. 128: 330-366.

**Rheingold, H. L.,** (1963). *Maternal behaviour in mammals.* John Wiley and sons, inc., New York

**Rima, N. B., Bardi, M., Friedenberger, J. M., Christon, L. M., Karelina, K. E., Lambert, K. G., Kinsley, C. H.,** (2009). *Reproductive experience and the response of female Sprague-Dawley rats to fear and stress.* Comparative Medicine, 59(5): 437-443.

**Rodel, G. H., Prager, G., Stefanski, V., Hudson, R.,** (2008). *Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals.* Physiology and Behavior. 93: 826-834.

**Rodel, G. H., Meyer, S., Prager, G., Stefanski, V., Hudson, R.,** (2010). *Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats.* Physiology and Behavior. 99: 644-650.

**Rogers, C. G.,** (1927). *Textbook of comparative physiology.* New York: Mc Graw-Hill.

**Rosenblatt, J. S., Lehrman D: S.,** (1963). *Maternal behavior of the laboratory rat.* In Rheingold, H. L. (eds.): *Maternal behaviour in mammals.* John Wiley and sons, inc., New York. pp 8-57.

**Rosenblatt, J. S.,** (1967). *Nonhormonal basis of maternal behaviour in the rat.* Science. 156: 1512-1514.

- Rosenblatt, J. S., Siegel, H. I.,** (1981). *Factors governing the onset and maintenance of maternal behavior among non primate mammals*. In: Gubernick, D. J., Klopfer, P. H., (eds.): *Parental care in mammals*. New York. Plenum Press. 13-76.
- Rosenblatt, J. S., Mayer, A. D., Siegel, H. S.,** (1985). *Maternal behavior among non primate mammals*. In: Adler, N., Pfaff, D., Goy, R. W., (eds.). *Handbook of behavioral neurobiology*. Reproduction. New York Plenum Press. 7: 229-298.
- Ross, S.,** (1950). *Some observations on the lair dwelling behavior of dogs*. *Behaviour*. 2: 144-162.
- Roth, T. L., Lubin, F. D., Funk, A. J., Sweatt, J. D.,** (2009). *Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene*. *Biol. Psychiatry*. 65: 760-769.
- Ruppenthal, G. C., Arling, G. L., Harlow, H. F., Sackett, G. P., Suomi, S. J.,** (1976).  
A  
*10-year perspective of motherless-mother monkey behavior*. *J. Abn Psychol*. 85: 341-349.
- Ruscio, M. G., Sweeny, T. D., Gomez, A., Parker, K., Carter, C. S.,** (2009). *Social environment alters central distribution of estrogen receptor alpha in Juvenile prairie voles*. *Physiol. Behav*. 98: 296-301.
- Russel, J. A.,** (1980). *Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes*. *J. Physiol*. 303: 403–415.
- Salo, A. L., French, J. A.,** (1989). *Early experience, reproductive success, and development of parental behaviour in Mongolian gerbils*. *Animal Behaviour*. 38: 693–702.
- Sanchez, M. M., Ladd, C. O., Plotsky, P. M.,** (2001). *Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: Evidence from rodent and primate models*. *Dev Psychopathol* 13: 419–449.
- Santi, D. V., Garrett, C. E., Barr, P. J.,** (1983). *On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs*. *Cell*. 33:9–10.
- Sapolsky, R. M., Meaney, M. J., McEwen, B. S.,** (1985). *The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative-feedback regulation*. *Brain Res*. 350: 169–73.
- Sapolsky, R. M., Meaney, M. J.,** (1986). *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period*. *Brain Res. Rev*. 11: 65-76.
- Sapolsky, R. M., Armanini, M. P., Packan, D. R., Sutton, S. W., Plotsky, P. M.,** (1990). *Glucocorticoid feed-back inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretagogue release.: relationship to corticosteroid receptor occupancy in various limbic sites*. *Neuroendocrinology*. 51: 328-336.

- Sapolsky, R. M.**, (1999). *Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging*. *Exp. Gerontol.* 34: 721-732.
- Scanlan, V. F., Byrnes, E. M., Bridges, R. S.**, (2006). *Reproductive Experience and Activation of Maternal Memory*. *Behavioral Neuroscience.* 120.(3): 676-686.
- Schaefer, T.**, (1963). *Early "experience" and its effects on later behavioral processes in rats. A critical factor in the early handling phenomenon*. *Trans. Acad. Sci. NY.* 24: 871-879.
- Schanberg, S. M., Evoniuk, G., Kuhn, C. M.** (1984). *Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 175: 135-146
- Schino, G., D' Amato, F. R., Troisi, A.**, (1995). *Mother infant relationships in Japanese Macaques: sources of inter-individual variation*. *Anim. Behav.* 49: 151-158.
- Schneirla, T. C., Rosenblatt, J. S.**, (1961). *Behavioral organization and genesis of the social bond in insects and mammals*. *Amer. J. Orthopsychiat.* 31: 223:253
- Schore, A. N.**, (1994). *Affect regulation and the origin of the self*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Schreiber, H. L., Bell, R. W., Kufner, M., Villescas, R.**, (1977). *Maternal behaviour: a determinant of amphetamine toxicity in rats*. *Psychopharmacology*, 52: 173-176.
- Scott, L. P., Marston, M. V.**, (1950). *Critical periods affecting the development of normal and maladjustive social behaviour of puppies*. *J. Genet. Psychol.* 77: 25-60.
- Scott, J. P.**, (1962). *Critical periods in behavioural development*. *Science.* 138: 949-958.
- Scott, J. P., Fuller, J. L.**, (1965). *Genetics and Social Behaviour of the dog*. The University of Chicago Press, Chicago, IL, 463pp.
- Seay, B.**, (1966). *Maternal behavior in primiparous and multiparous rhesus monkeys*. *Folia primatol.* 4: 146-168.
- Seckl, J. R., Nyirenda, M. J., Walker, B. R., Chapman, K. E.**, (1999). *Glucocorticoids and fetal programming*. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 74-8.
- Seitz, P. F. D.**, (1954). *The effects of infantile experience upon adult behaviour in animal subjects. I. Effects of litter size during infancy upon adult behaviour in the rat*. *Am. J. Psychiat.* 110: 916-927.
- Seitz, P. F. D.**, (1958). *The maternal instinct in animal subjects. I*. *Psychosom. Med.* 20: 215-226.
- Selye, H.**, (1934). *On the nervous control of lactation*. *Amer. J. Physiol.* 107: 535-538.
- Sequeira-Cordero, A., Masis-Calvo, M., Mora-Gallegas, A., Fornaguera-Trias, J.**, (2013). *Maternal behavior as an early modulator of neurobehavioral offspring*

*responses by Sprague-Dawley rats.* Behavioural Brain Research. 237: 63-70.

**Serpell, J.,** (1995). *The domestic dog: its evolution, behaviour, and interactions with people.* Ed. Serpell J. Cambridge University Press, Cambridge

**Sheehan, T., Numan, M.,** (2000). *The septal region and social behavior.* In: Numan, R., (eds.). *The behavioral neuroscience of the septal region.* Springer-Verlag. New York. pp 175-207.

**Shen, J., Shen, Y., Li, R., Cui, J., He, P.,** (2013). *Early reproductive experiences in females make difference in cognitive function later in life.* Journal of Alzheimer's Disease. 34: 589-594.

**Sherrod, K. B., Connor, W. H., Meyer, G. W.,** (1974). *Transient and enduring effects of handling on infant and maternal behaviour in mice.* Dev. Psychobiol. 7: 31-37.

**Shillito Walser, E., Hague, P., Yeomans, M.,** (1983). *Preferences for sibling or mother in Dalesbred and Jacob twin lambs.* Appl. Anim. Ethol. 9:289-297.

**Shiple, M. T., Ennis, M.,** (1996). *Functional organization of the olfactory system.* J. Neurobiol. 30: 123-176.

**Silk, J. B.,** (1980). *Kidnapping and female competition among captive bonnet macaques.* Primates. 21: 100-110.

**Skutella, T., Weber, T., Jirkowski, G. F.,** (1993). *Coexistence of oxytocin and tyrosine hydroxylase in the rat hypothalamus, an immunocytochemical study.* J. Neural Transm. Gen. Sect. 94: 55-61.

**Slabbert, J. M., Rasa, O. A. E.,** (1993). *The effect of early separation from the mother on pups in bonding to humans and pup health.* Journal of the South African Veterinary Association. 64(1): 4-8.

**Smith, M. S., Mc Donald, L. E.,** (1974). *Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy, and pregnancy in the dog.* Endocrinology. 94:404.

**Smithson, K. G., Weiss, M. L., Hatton, G. I.,** (1989). *Supraoptic nucleus afferents from the main olfactory bulb. I. Anatomical evidence from anterograde and retrograde tracers in rat.* Neuroscience. 31: 277-287.

**Smotherman, W. P., Bell, R. W.,** (1980). *Maternal Developmental Psychobiological influences and early behavior.* Jamaica, New York. Spectrum Publications.

**Sroufe, L. A.,** (2005). *Attachment and development: a prospective, longitudinal study from birth to adulthood.* Attach. Hum. Dev. 7: 349-67.

**Sroufe, L. A., Egeland, B., Carlson, E., Collins, W.,** (2005). *The development of the person: the Minnesota study of risk and adaptation from birth to adulthood.* The Guildford Press. New York.

- Stanley, W. C., Cornwell, A. C., Poggiani, C., Trattner, A.,** (1963). *Conditioning in the neonate puppy*. J. Comp. Physiol. Psychol. 56: 211-214.
- Stanley, W. C., Bacon, W., Fehr, C.,** (1968). *Discriminated instrumental learning in neonatal dogs*. J. Comp. Physiol. Psychol. 70: 335-343.
- Stanley, W. C., Barret, J. E., Bacon, W. E.,** (1974). *Conditioning and extinction of avoidance and escape behavior in neonatal dogs*. J. Comp. Physiol. Psychol. 87 (1): 163-172.
- Sterba, S. K., Prinstein, M. J., Cox, M. J.,** (2007). *Trajectories of internalizing problems across childhood: Heterogeneity, external validity, and gender differences*. Dev Psychopathol 19:345–366
- Stern, J. M., Siegel, H. I.,** (1978). *Prolactin release in lactating, primiparous and multiparous the- lectomized and maternal virgin rats exposed to pup stimuli*. Biology of Reproduction, 19:177-182.
- Stern, J. M., Johnson, S. K.,** (1989). *Perioral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats *Rattus norvegicus**. J. Comp. Psychol. 103: 269-280.
- Stern, J. M., Kolunie, J. M.,** (1989). *Peroral anesthesia disrupts maternal behavior during early lactation in Long Evans rats*. Behav. Neural Biol. 52: 20-38.
- Stern, J. M., Kolunie, J. M.,** (1991). *Trigeminal lesions and maternal behavior in Norway rat: I. effects of cutaneous rostral snout denervation on maintenance of nurturance and maternal aggression*. Behav. Neurosci. 105: 984-997.
- Stern, J. M.,** (1996a). *Somatosensation and maternal care in Norway rats*. In: Rosenblatt, J. S., Snowdon, C. T., (eds.). *Advances in the study behavior*, Vol 25. Parental care : evolution, mechanism, and adaptive significance. Academic Press, San Diego. pp 243-294.
- Stohr, T., Schulte Wermeling, D., Szuran, T., Pliska, V., Domeney, A., Welzl, H., Weiner, I., Feldon, J.,** (1998). *Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 59:799–805.
- Suchecki, D., Rosenfeld, P., Levine, S.,** (1993). *Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking*. Dev. Brain Res., 75: 185-192.
- Suomi, S. J.,** (1999). *Attachment in rhesus monkeys*. In Cassidy, J., Shaver, P. R., (Eds.). *Handbook of attachment: Theory, research, and clinical applications*. New York: Guilford. pp 181-197.
- Suomi, S. J.,** (2004). *How gene–environment interactions shape biobehavioral development: lessons from studies with rhesus monkeys*. Research in Human Development. 1: 205–222.

- Swanson, L. J., Campbell, C. S.,** (1979). *Maternal behaviour in the primiparous and multiparous Golden Hamster*. *Z. Tierpsychol.* 50: 96-104.
- Swanson, L. J., Sawchenko, P. E.,** (1983). *Hypothalamic integration: organization of paraventricular and supraoptic nuclei*. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 269-324.
- Sweatt, J. D.,** (2009). *Experience-Dependent Epigenetic Modifications in the Central Nervous System*. *Biol. Psychiatry.* 65: 191-197.
- Tanaka, T.,** (1989). *Variability in the development of mother-infant relationships among free-ranging Japanese macaques*. *Primates.* 30: 477-491.
- Tanaka, T.,** (1998). *Effects of litter size on behavioural development in mice*. *Reproductive Toxicology.* 12(6): 613-617.
- Taverne, M., Willemsse, A., Dieleman, S., Bevers, M.,** (1978/1979). *Plasma prolactin, progesterone and oestradiol-17 beta concentrations around parturition in the pig*. *Anim. Reprod. Sci.* 1: 257-263.
- Taverne, M. A. M., Naaktgeboren, C., Ellsasser, F., Forsling, M. L., Weyden, G. C., Ellendorff, F., Smidt, D.,** (1979). *Myometrial electrical activity and plasma concentrations of progesterone, estrogen and oxytocin during late pregnancy and parturition in the miniature pig*. *Biol. Reprod.* 21: 1125-1134.
- Teicher, M.H., Andersen, S.L., Polcari, A., Anderson, C.M., Navalta, C.P., Kim, D.M.,** (2003). *The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 27, 33-44.
- Terkel, J., Bridges, R. S., Sawyer, C. H.,** (1979). *Effects of transecting the lateral neural connections of the medial preoptic area on maternal behavior in the rat: nest building, pup retrieval, and prolactin secretion*. *Brain. Res.* 169: 369-380.
- Thoman, E. B., Levine, S.,** (1968). *Role of Maternal Disturbance and Temperature Change in Early Experience Studies*. *Physiology and Behavior.* 4: 143-145.
- Thoman, E. B. Arnold, W. J.,** (1968). *Effects of incubator rearing with social deprivation on maternal behavior in rats*. *Journal of Comparative and Physiological Psychology,* 65(3): 441-446.
- Thompson, W. R., Schaefer, T.,** (1961). *In function of varied experience*. Fiske e Maddi ed., Dorsey, Homewood, Ill., pp. 81-105.
- Thorpe, W. H., Caudle, H. B.,** (1937). *A study of the olfactory responses of insect parasites to the food plants of their hosts*. *Parasitology.* 30: 523-528.
- Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S., Honma, K.,** (2007). *Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring*. *Eur. J. Neurosci.* 25: 815-829.
- Truc, C., Gervet, J.,** (1974). *Influence de la reactivité de la proie sur le comportement de pique chez un spègide chasseur de chenilles de Noctuidae: l' Ammophile Podalonia*

*hirsuta* Scopoli. Hypotèses sur le mécanisme d' enchaînement des actes au cours d' un complexe instinctif. Z. Tierpsychol. 34 : 70-97.

**Truc, C., Gervet, J.,** (1978). *Le découpage du comportement au cours du cycle nidificateur de l' Ammophile Padalonia hirsuta Scopoli. Comparaison de cycles de durées différentes.* Neth. J. Zool. 28(1): 13-54.

**Tu, M. T., Lupien, S. J., Walker, C. D.,** (2006). *Multiparity reveals the blunting effect of breastfeeding on physiological reactivity to psychological stress.* J. Neuroendocrinol. 18: 494–503.

**Turner, D. C., Bateson, P.,** (1988). *The domestic cat: The biology of its behavior.* Cambridge University Press. New York (NY).

**Van Oers, H. J. J., De Kloet, E. R., Whelant, T., Levine, S.,** (1998). *Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone.* J. Neurosci. 18: 10171-10179.

**Van Oers, H. J. J., De Kloet, E. R., Levine, S.,** (1998). *Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress.* Developmental Brain Research. 111: 245-252.

**Vastrade, F.,** (1986). *L' examen comportemental du chiot.* P.M.C.A.C. 21(4) : 273-284.

**Vestergaard, K., Hansen, L.,** (1984). *Tethered versus loose housed sows: ethological observations and measures of productivity: I. Ethological observations during pregnancy and farrowing.* Ann. Rech. Vet. 15: 245-256.

**Voci, V. E., Carlson, N. R.,** (1973). *Enhancement of maternal behavior and nest building following systemic and diencephalic administration of prolactin and progesterone in the mouse.* J. Comp. Physiol. Psychol. 83: 388-393.

**Volokhov, A.,** (1958). *Physiology and pathology of the nervous system.* Conference Pavlov. J. Higher Nerv. Activity, 8.

**Waddington C. H.,** (1957). *The Strategy of the Genes.* MacMillan. New York

**Walf, A. A., Frye, C. A.,** (2008). *Parity and estrogen-administration alter affective behavior of ovariectomized rats.* Physiol. Behav. 93: 351–356.

**Walk, R. D., Gibson, E. J.,** (1961). *A comparative and analytical study of visual depth perception.* Psychol. Monographs. 75 (15): 1-44.

**Wamboldt, M. Z., Insel, T. R.,** (1987). *The ability of oxytocin to induce short latency maternal behavior is dependent on peripheral anosmia.* Behav. Neurosci. 101: 439-441.

**Wang, Z., Novak, M. A.,** (1994). *Mammalogists Parental care and Litter Development in Primiparous and Multiparous Prairie Voles (Microtus Ochrogaster).* Journal of Mammology. 75(1): 18-23.

- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D' Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M. J.,** (2004). *Epigenetic programming by maternal behaviour*. *Nat. Neurosci.* 7: 847-854.
- Weaver, I. C., Champagne, F. A., Brown, S. E., Dymov, S., Sharma, S., Meaney, M. J., Szyf, M.,** (2005). *Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life*. *J. Neurosci.* 25: 11045-11054.
- Weber, E. M., Olsson, I. A. S.,** (2008). *Maternal behaviour in *Mus musculus* sp: An ethological review*. *Applied Animal Behaviour Science.* 114: 1-22.
- Weinberg, J., Smotherman, W. P., Levine, S.,** (1978). *Early handling effects on neophobia and conditioned taste aversion*. *Physiol. Behav.* 20: 59-596.
- Weinstock M., Fride, E., Hertzberg, R.,** (1988). *Prenatal stress effects on functional development of the offspring*. *Prog Brain Res.* 73: 319-31.
- Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Relo, A. L., Nanz-Bahr, N. I., Feldon, J.,** (2004). *Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat*. *Behav Brain Res.* 152: 279-95.
- Whipple, E. E., Webster-Stratton, C.,** (1991). *The role of parental stress in physically abusive families*. *Child abuse Negl.* 15: 279-291.
- White, L. E., Hinde, R. A.,** (1975). *Some factors influencing mother-infant relations in rhesus monkeys*. *Anim. Behav.* 23: 527-542.
- Widowski, T., Curtis, S.,** (1989). *Behavioural responses of periparturient sows and juvenile pigs to prostaglandin P2a*. *J. Anim. Sci.* 67: 3266-3276.
- Wiesner, B. P., Sheard, N. M.,** (1933). *Maternal behaviour in the rat*. Oliver and Boyd, London.
- Williams, E., Scott, J. P.,** (1953). *The development of social behaviour patterns in the mouse, in relation to natural periods*. *Behaviour* 6: 35-67.
- Williams, M. T., Davis, H. N., McCrea, A. E., Long, S. J., Hennessy, M. B.,** (1999). *Changes in the hormonal concentrations of pregnant rats and their fetuses following multiple exposures to a stressor during the third trimester*. *Neurotoxicology and Teratology.* 21: 403-414.
- Willner, P.,** (1997). *Validity, reliability and utility of chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation*. *Psychopharmacology.* 134: 319-329.
- Wilsson, E.,** (1984). *The social interaction between mother and offspring during weaning in German shepherd dogs: individual differences between mothers and their effects on offspring*. *Appl Anim Behav Sci.* 13 (1-2):101.

**Wilson, D. A., Willner, J., Kurz, E. M., Nadel, L.,** (1986). *Early handling increases hippocampal long-term potentiation in young rats.* Behav. Brain Res., 21, pp. 223-227.

**Wilsson, E., Sundgren, P. E.,** (1998). *Behaviour test for eight week old puppies – heritabilities of tested behaviour traits and its correspondence to later behaviour.* Applied Animal Behaviour Science. 58: 151-162.

**Wildt, D. E., Panko, W. B., Chakraborty P. K., et al.,** (1978). *Relationship of reproductive behaviour, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch.* Biol Reprod. 18(4):561

**Wildt, D. E., Panko, W. B., Chakraborty P. K., et al.,** (1979). *Relationship of serum estrone, estradiolo 17 beta and progesterone to LH, sexual behaviour and time of ovulation in the bitc.* Biol Reprod. 20(3):648

**Wright, L., Bell, R. W.,** (1978). *Interactive effects of parity and early pup stress on the open field behaviour of laboratory rats.* Developmental Psychobiology. 11(5): 413-418.

**Yang, Q. Z., Smithson, K. G., Hatton, G. I.,** (1995). *NMDA e non-NMDA receptors on the rat supraoptic nucleus neurons activated monosynaptically by olfactory afferents.* Brain. Res. 680: 207-216.

**Young, L. J., Wang, Z., Donaldson, R., Rissman, E. F.,** (1998). *Estrogen receptor alpha is essential for induction of oxytocin receptor by estrogen.* Neuroreport. 9: 933–6.

**Zhang, T. Y., Chretien, P., Meaney, M. J., Gratton, A.,** (2005). *Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats.* Journal of Neuroscience. 25(6): 1493-1502.

**Zhang, T. Y., Hellstrom, I. C., Bagot, R. C., Wen, X., Diorio, J., Meaney, M. J.,** (2010). *Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus.* Journal of Neuroscience. 30(39): 13130-13137.

## ***Ringraziamenti***

*Vorrei ringraziare il Dott. Angelo Gazzano e la Dott.ssa Giovanna Guardini, per la disponibilità e l'aiuto che mi hanno dato nella preparazione di questa tesi.*

*Ringrazio i miei genitori, per il sostegno economico e morale che mi ha permesso di arrivare in fondo a questo lungo percorso; li ringrazio per avermi sempre lasciato libera di scegliere, per non avermi fatto pressioni ma essermi stati vicini in silenzio, e perché senza di loro, non sarei diventata quella che sono.*

*Ringrazio il mio fidanzato Matteo, per la pazienza, la vicinanza, la comprensione e l'amore dimostratomi e per avere sempre creduto in me e nelle mie possibilità, spronandomi ad andare avanti e a non arrendermi mai.*

*Ringrazio mia sorella, perché è stata la prima amica della mia vita, e anche se ti ci scontri o non ci parli quanto si dovrebbe, rimane sempre e comunque tua amica, tenendoti la mano per un po' ed il cuore per sempre.*

*Ringrazio i miei nonni, perché fin da piccina mi hanno insegnato un modo di dire e di agire che mi sono portata dietro per tutti questi anni: "ce la devo fare in tutte le maniere"...visto nonni? Ce l'ho fatta!*

*Ringrazio Costanza, per gli innumerevoli pomeriggi passati insieme ad aiutarmi a tradurre gli articoli in inglese, dimostrandomi di essere una vera amica su cui poter contare in qualsiasi situazione.*

*Ringrazio tutti gli amici, che già conoscevo e quelli che ho conosciuto durante questo percorso, in particolare Caterina Dogi, Claudia Kolb, Anna Giussani con Angelino e Rocki, Paola Conti e Silvano Polverini e tutto lo staff della clinica 24 ore del Galluzzo.*

*Ringrazio infine chi non è più vicino a me fisicamente, ma è sempre con me nel mio cuore, nella speranza che guardandomi da lassù, sorridano e siano soddisfatti di me.*