



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Corso di Laurea in Scienze Animali

Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali

TESI DI LAUREA

La diapausa embrionale nei mammiferi

RELATORE:

Prof.ssa Monica COLITTI

Laureando:

Giulia Bernardis

ANNO ACCADEMICO 2012-2013



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Corso di Laurea in Scienze Animali

Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali

TESI DI LAUREA

La diapausa embrionale nei mammiferi

RELATORE:

Prof.ssa Monica COLITTI

Laureando:

Giulia Bernardis

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

| | |
|---|-------|
| Scopo | p. 1 |
| 1. Introduzione | p. 2 |
| 1.1 Aspetti anatomico-funzionali del riproduttore nei vari ordini | p. 2 |
| 2. Tipologie di diapausa | p. 7 |
| 3. Regolazione della diapausa | p. 8 |
| 3.1 L'entrata in diapausa | p. 9 |
| 3.2 Il mantenimento della diapausa | p. 11 |
| 3.3 La riattivazione dopo la diapausa | p. 12 |
| 3.4 Cenni sulla diapausa nei Marsupiali | p. 17 |
| 3.5 Cenni sulla diapausa nei Roditori | p. 20 |
| 4. Fattori favorenti l'impianto embrionale | p. 21 |
| 4.1 Gli estrogeni | p. 21 |
| 4.2 L'anandamide | p. 22 |
| 4.3 I fattori di crescita | p. 22 |
| 4.4 Le poliammine | p. 26 |
| 4.5 HMGN1 e SPARC | p. 30 |
| 5. Focus su alcune specie rappresentative | p. 31 |
| 5.1 Visone americano (<i>Neovison vison</i>) | p. 31 |
| 5.2 Moffetta (<i>Spilogale putorius</i>) | p. 34 |
| 5.3 Tasso (<i>Meles meles</i>) | p. 36 |
| 5.4 Orso bruno (<i>Ursus arctos</i>) | p. 37 |
| 5.5 Capriolo (<i>Capreolus capreolus</i>) | p. 38 |
| 5.6 Uomo | p. 42 |
| 6. Conclusioni | p. 46 |
| 7. Bibliografia | p. 47 |
| 8. Sitografia | p. 63 |

La presente tesi di laurea descrive la diapausa embrionale, strategia riproduttiva che riguarda un gran numero di specie vegetali ed animali, Invertebrati e Vertebrati.

Sono state prese in considerazione le diverse caratteristiche che regolano questo fenomeno riproduttivo: i meccanismi e i fattori che sono coinvolti nell'entrata e nel mantenimento in diapausa e nel risveglio dell'embrione, nonché i vantaggi che indiscutibilmente offre.

Sono state poste a confronto diverse specie di Mammiferi in cui si verifica l'impianto ritardato e su cui si concentra una parte rilevante degli studi e delle ricerche inerenti l'argomento.

Infine, è stata valutata la possibilità dell'esistenza della diapausa embrionale nella specie umana e le conseguenze che ne potrebbero derivare.

1. INTRODUZIONE

Diapausa embrionale, sviluppo discontinuo e impianto ritardato sono tutti termini usati per indicare un fenomeno piuttosto comune sia nel regno animale che in quello vegetale: designano infatti l'arresto temporaneo dello sviluppo embrionale, conseguente alla soppressione della proliferazione cellulare allo stadio di blastocisti (Ptak et al., 2012). Può essere vista come una strategia evolutiva impiegata al fine di garantire il successo riproduttivo.

Essa consta nella scissione dell'accoppiamento e della fertilizzazione dal parto; bloccando la crescita embrionale, assicura che lo sviluppo postnatale venga portato a termine quando le condizioni ambientali sono più favorevoli.

Le caratteristiche e le tipologie di controllo specie-specifico della diapausa sono molto varie, ma il loro scopo comune è sempre quello di allungare la durata della gravidanza, in modo da aumentare la fitness riproduttiva. Le nascite vengono quindi ritardate, in modo da farle coincidere con la stagione che può garantire ai neonati il migliore nutrimento e le condizioni ottimali per la loro sopravvivenza. Essendo ampiamente distribuita anche tra taxa non correlati, dalle piante agli insetti ai mammiferi, è legittimo pensare che si sia presentata numerose volte nel corso dell'evoluzione (Lopes et al., 2004).

1.1 Aspetti anatomico-funzionali del riproduttore nei vari ordini.

La diapausa si manifesta in 69 specie di mammiferi Euteri appartenenti a 7 diversi ordini (tra cui 1 specie di Artiodattili, 2 di Sdentati, 3 Chiroteri, 4 Insettivori, 18 Roditori e ben 41 Carnivori) e in 28 Marsupiali (Yamaguchi et al., 2006).

L'unico rappresentante degli Artiodattili ad esibire embriostasi è il capriolo (*Capreolus capreolus*), cervide brucatore tipico delle zone ecotonali.

Durante il periodo riproduttivo, il maschio di questa specie diviene territoriale e il caratteristico "corteggiamento" lo vede inseguire la femmina in percorsi circolari

(conosciuti come “giostre”), fino a quando quest’ultima si dimostra disponibile all’accoppiamento. Le femmine sono monoestrali; ciò significa che sono ricettive solo una volta durante la stagione riproduttiva, compresa tra fine luglio e i primi di agosto, e che l’estro non si ripete anche se non sono state fecondate (Mustoni et al., 2002). Qualche giorno dopo l’ovulazione la blastocisti perde la zona pellucida ed entra in diapausa (Aitken et al., 1975), che si estende per 5 mesi, da agosto alla fine di dicembre, quando il trofoblasto inizia ad ingrandirsi velocemente. A fine gennaio o febbraio si ha l’adesione placentare, dopodiché la gestazione prosegue normalmente fino al parto, che ha luogo tra maggio e giugno (Sempéré, 1977) e porta la durata complessiva della gestazione a 10 mesi (Lambert et al., 2001).

La placenta dei ruminanti è cotiledonata, dunque i villi coriali (che ampliano la superficie di scambio tra sacco coriale ed endometrio) si trovano solo in corrispondenza dei cotiledoni, i quali a loro volta crescono esclusivamente laddove si trovano le caruncole: in questo modo, cotiledoni e caruncole formano un’unione tissutale denominata placentoma, che è l’unità funzionale di questo tipo di placenta. In base al numero di placentomi esibiti dal sacco coriale, è possibile fare un’ulteriore distinzione e, dal momento che la placenta del capriolo possiede da 2 a 6 placentomi, essa è classificabile come oligocotiledonata. Nei ruminanti, come anche nella maggior parte degli altri erbivori, l’impianto prevede semplicemente l’attecchimento del trofoblasto alla superficie endometriale, senza formazione di una vera e propria placenta; per questo motivo si parla di specie adeciduate.

Dal punto di vista strutturale si distinguono diversi tipi di placenta. Tale suddivisione si basa sul numero di strati tissutali separanti il sangue materno da quello fetale, che complessivamente sono 6. In questo caso, tuttavia, se ne preservano 5 poiché l’epitelio endometriale è soggetto transitoriamente a dei fenomeni litici che consentono ai villi coriali di penetrare nel connettivo della mucosa uterina materna; questa placenta è detta sindesmocoriale. Benché l’utero sia simile a quello dei Carnivori, ovvero bicorni-bipartito, in questi ultimi la porzione cornuale è notevolmente prevalente rispetto al corpo. Nei Carnivori la

placenta è invece zonata, con i villi disposti soltanto nella zona equatoriale. La blastocisti s'insinua in parte nella mucosa uterina, che reagisce con una proliferazione tissutale che conduce alla creazione della placenta, di tipo endoteliochoriale, dato che i villi coriali raggiungono l'endotelio dei vasi materni, riducendo il numero degli strati a 4. In tal senso i Roditori si discostano dai Carnivori, perché hanno una placenta di tipo emocoriale (come i Primati): si conservano solo 3 degli iniziali 6 strati di tessuto e i neonati ne traggono beneficio; infatti ne consegue che essi possiedono lo stesso corredo anticorpale della madre, che gli dà modo di sopravvivere anche senza assumere il colostro o con l'allattamento artificiale. Tali differenze sono coerenti col presupposto che, quando i villi sono ampiamente diffusi sul sacco coriale, l'ingranaggio corion-placentare sia meno profondo e viceversa. Pur appartenendo allo stesso ordine di mammiferi, i Mustelidi presentano una tipica placenta localizzata bidiscoidale, con i villi collocati in due placentomi circolari.

L'embriostasi riguarda per l'appunto 7 delle 12 famiglie di Carnivori (ovvero Mustelidi, Ursidi, Ailuropodi, Ailuridi, Focidi, Otaridi, Odobenidi) in cui può durare da pochi giorni fino a 10 mesi (Lopes et al., 2004).

Il visone americano (*Neovison vison*) è una specie a riproduzione stagionale e ad ovulazione indotta (Polejaeva et al., 1997).

Il periodo degli accoppiamenti va dalla fine di febbraio alla fine di marzo. All'incirca 7-8 giorni dopo l'accoppiamento, le blastocisti raggiungono le corna uterine ed entrano in diapausa (Stoufflet et al., 1989). Tale condizione è mantenuta solitamente per 15-25 giorni. La gestazione vera e propria del visone, dal momento dell'impianto embrionale al parto, dura 30 giorni (Polejaeva et al., 1997), a cui si deve sommare la fase di diapausa, che la prolunga fino a 42-75 giorni (Stoufflet et al., 1989).

Nella moffetta (*Spilogale putorius*), la stagione riproduttiva è compresa tra la fine di settembre e l'inizio di ottobre (Paria et al., 1994). La gestazione include una fase di diapausa che si estende per 180-220 giorni (Mead, 1968), da ottobre a marzo, quando riprende ad accrescersi (Paria et al., 1994). Dopo che l'embrione si

è impiantato, la gestazione prosegue ancora per 28-31 giorni e quindi solitamente si conclude verso metà maggio, quando nascono circa 4-5 cuccioli (Foresman and Mead, 1973).

Nel tasso europeo (*Meles meles*) si verifica solitamente un estro post-parto a febbraio o marzo e la fertilizzazione è seguita da un periodo di quiescenza lungo fino a 10 mesi che termina con l'impianto, a dicembre o gennaio (Canivenc and Laffargue, 1957). La gestazione procede poi per ulteriori 40-49 giorni (Neal and Cheeseman, 1996).

L'orso bruno (*Ursus arctos*), ma anche altri esemplari della famiglia degli Ursidi, ha un unico estro primaverile e all'accoppiamento segue una fase di diapausa. Il periodo degli amori si colloca tra maggio e giugno, ma l'impianto della blastocisti si verifica solo in autunno (verso ottobre/novembre) e solo se la madre è riuscita ad accumulare un sufficiente strato adiposo e quindi energia per affrontare il letargo e la concomitante crescita dei piccoli. Complessivamente, la gestazione ha una durata di 7-8 mesi e i parti avvengono nella tana di svernamento tra dicembre e gennaio. Nascono al massimo 3 cuccioli che pesano circa 300 grammi, sono ciechi, nudi e sordi; diventeranno sessualmente maturi ed indipendenti tra il primo ed il terzo anno di vita.

Le tempistiche della riproduzione di alcune specie sono riassunte in Tab.1.

Tabella 1: Tempistica della riproduzione di alcune specie di Mammiferi

| TASSONOMIA | | PERIODO ACCOPIAMENTI | DURATA DIAPAUSA | DURATA COMPLESSIVA GESTAZIONE | PERIODO PARTI | NUMERO CUCCIOLI |
|--------------|-----------|--|------------------|---|--------------------|-----------------|
| ORDINE | FAMIGLIA | | | | | |
| Carnivori | Mustelidi | Visone (<i>Neovison vison</i>) | 15 - 25 giorni | 42 - 75 giorni | Maggio | 6 - 7 |
| | | Moffetta (<i>Spilogale putorius</i>) | 180 - 220 giorni | Poco più di 8 mesi | Metà maggio | 4 - 5 |
| | | Tasso (<i>Meles meles</i>) | Fino a 10 mesi | Fino a 12 mesi, in base a durata diapausa | Dicembre - gennaio | 3 in media |
| Artiodattili | Ursidi | Orso bruno (<i>Ursus arctos</i>) | 5 - 6 mesi | 7 - 8 mesi | Dicembre - gennaio | 1 - 3 |
| | Cervidi | Capriolo (<i>Capreolus capreolus</i>) | 5 mesi | 10 mesi (290 giorni) | Maggio - giugno | 1 - 3 |

2. TIPOLOGIE DI DIAPAUSA

È possibile distinguere tra specie che esibiscono una diapausa cosiddetta “obbligatoria” e altre in cui il fenomeno è considerato “facoltativo”. Nel primo caso avviene ad ogni gestazione e riguarda generalmente le specie che hanno una singola cucciolata all’anno, mentre nel secondo può essere indotta nel momento in cui si ha un estro post-parto, che porta ad una gravidanza concomitante all’allattamento della precedente cucciolata. S’ipotizza che soprattutto la diapausa facoltativa derivi da una strategia ancestrale adottata dai progenitori degli attuali mammiferi che vivevano al tempo delle glaciazioni, nei quali era molto più diffusa poiché abitavano un ambiente sfavorevole e potenzialmente pericoloso per lo sviluppo degli embrioni (Ptak et al., 2012). Il motivo dell’arresto dello sviluppo è da ricercarsi nelle condizioni ambientali, da cui dipendono anche la sopravvivenza della madre e la sua capacità/abilità di nutrire gli embrioni durante la loro crescita. La diapausa facoltativa è meglio conosciuta nei Marsupiali e nei Roditori e, in questi ultimi, è possibile riprodurla sperimentalmente sottoponendo le femmine ad un’ovariectomia subito dopo la fertilizzazione e trattandole poi con progesterone (Lopes et al., 2004).

Nonostante il suo appellativo, in molte specie, la diapausa obbligatoria si presenta in modi alquanto flessibili e può avere durata variabile, solitamente sotto l’influenza del fotoperiodo (Ptak et al., 2012). Compare nel capriolo e in alcuni pipistrelli, ma soprattutto in 7 delle 12 famiglie di Carnivori (). In alcuni casi, a questa diapausa se ne può sovrapporre una stagionale, originata da fattori metabolici o dalla lattazione (Renfree and Shaw, 2000).

Al giorno d’oggi, questo tratto non è più indispensabile per le specie occupanti territori temperati e controllati, che quindi non la esibiscono (con l’eccezione del capriolo).

Il fenomeno può riguardare anche solo alcune sottospecie geograficamente isolate ed è inducibile per via endocrina in Mustelidi che normalmente non la presentano: sono quindi i diversi fattori ecologici ad influenzarne tempi e caratteristiche.

Tra i Mammiferi, oltre alla diapausa embrionale, sono diffuse altre forme di arresto dello sviluppo, come la fertilizzazione ritardata (meccanismo per allungare il periodo tra accoppiamento e parto a causa dei cambiamenti climatici) o lo sviluppo ritardato (quando la gestazione risulta allungata dal rallentamento dello sviluppo embrionale post-blastocisti), comuni alle latitudini più alte. Questo tipo di ritardo potrebbe verificarsi anche nei criceti, nei leoni marini australiani e nel cervo di padre David (*Elaphurus davidianus*), in cui si osserva una gestazione prolungata rispetto ai loro simili.

3. REGOLAZIONE DELLA DIAPAUSA

La diapausa è conosciuta anche come impianto ritardato e ciò deriva dal fatto che prende avvio quando il conceptus raggiunge lo stadio di blastocisti, la quale può rimanere completamente quiescente, perché la divisione cellulare si arresta, oppure può espandersi molto lentamente, in seguito ad una notevole riduzione della mitosi (Ptak et al., 2012). L'arresto del ciclo cellulare è il segno distintivo della diapausa, sia nelle piante che negli animali: esso è indotto da meccanismi ancora poco noti e può avvenire nelle fasi G0/G1 o G2, a seconda della specie. Le cellule entrano in uno stato di quiescenza, ma l'apoptosi viene impedita dal mantenimento del metabolismo basale, con sintesi di proteine ed RNA e consumo di ossigeno. Negli Insetti la sospensione della mitosi si verifica più comunemente nello stadio G0/G1 del ciclo cellulare, ma ci sono esempi di interruzione anche in G2, mentre negli embrioni dei Mammiferi si verifica nella fase S.

Anche la ripresa dell'attività mitotica che conduce all'uscita dalla diapausa è regolata da fattori specie-specifici ed è quindi probabile che non ci sia un unico meccanismo di riattivazione (Lopes et al., 2004).

In generale, è possibile distinguere tre fasi che compongono la diapausa:

1. l'entrata in diapausa, caratterizzata dall'arresto della divisione cellulare. Essa richiede segnali quali lo stimolo della suzione, il fotoperiodo (gli embrioni sono mantenuti in diapausa durante i giorni brevi) e la disponibilità di cibo;
2. il mantenimento della diapausa, influenzato dalla concentrazione degli ormoni prolattina e melatonina;
3. la riattivazione dopo la diapausa, ovvero la ripresa dell'attività mitotica nell'embrione, innescata dalla presenza o dall'assenza di uno stimolo (Renfree and Shaw, 2000).

3.1 L'entrata in diapausa

La specie maggiormente studiata e presa come modello è il topo, ma alcuni esperimenti sono stati fatti anche su visoni e moffette (Renfree and Shaw, 2000).

Nella famiglia dei Mustelidi, la variabilità che contraddistingue la strategia riproduttiva è considerevole: furetto (*Mustela putorius furo*) e donnola (*Mustela nivalis*) si riproducono durante la primavera e l'estate e non manifestano diapausa; in visone e moffetta i periodi di gravidanza sono variabili e si ha diapausa solo se le femmine si accoppiano all'inizio della rispettiva stagione riproduttiva; martore (*Martes martes*), tassi e ghiottoni (*Gulo gulo*) infine, presentano sempre una diapausa che dura parecchi mesi. Il verificarsi della diapausa e la sua durata nei Mustelidi sono legate al loro habitat, alla temperatura ambientale, alle dimensioni della cucciolata e al periodo in cui è avvenuto l'accoppiamento (Ptak et al., 2012). Nonostante la diapausa nei climi temperati abbia dei vantaggi selettivi, specie tra loro imparentate non sempre sfruttano tale fenomeno: è ciò che si riscontra proprio nei Mustelidi. La riproduzione di furetto e visone sono contrassegnate da aspetti identici tra loro (quali l'ovulazione indotta e la gestazione conseguente all'impianto), però solamente nella gestazione di quest'ultimo è incluso un periodo di diapausa pre-impianto. Un processo simile si ritrova nei Roditori della

sottofamiglia Sigmodontinae: le specie del Nord America manifestano diapausa facoltativa, mentre in quelle sudamericane essa è completamente assente. Tuttavia, è stato dimostrato che è possibile indurre un arresto reversibile dello sviluppo, e quindi la diapausa, anche in specie in cui tradizionalmente non si verifica (Lopes et al., 2004). Trapiantando blastocisti di furetto all'interno dell'utero di visone, queste cessano il loro sviluppo (Chang, 1968); in modo simile, manipolando sperimentalmente la funzione endocrina ovarica o ipofisaria, si può indurre una fase di ritardo pre-impianto nei furetti (Foresman and Mead, 1978).

Quindi le blastocisti reagiscono in modo diverso in base all'utero in cui si trovano: se blastocisti inattive vengono trapiantate in un ambiente uterino attivo, esse anche si attivano entro poche ore e proseguono il loro sviluppo; se invece blastocisti attive vengono poste in un utero che non lo è, esse rimangono in quello stato fino a quando non vengono somministrati estrogeni che risvegliano l'utero e fanno riattivare anche le blastocisti (Dickman and DeFeo, 1967) (Daniel, 1970).

Da ciò deriva che, in condizioni appropriate, molte specie di Mammiferi potrebbero esibire diapausa, inclusi gli esseri umani (Lopes et al., 2004).

Da alcuni studi è poi emerso che l'interruzione della crescita non è da ricercare in una depressione o disfunzione respiratoria durante gli stadi precoci dello sviluppo (Gulyas and Daniel, 1967) e che, rispetto alle blastocisti attive, quelle in diapausa mostrano uno scarso assorbimento di uracile e non incorporano timina, come ci si può aspettare dato il basso livello di replicazione (Daniel, 1970).

Nei Vertebrati vivipari dunque, la diapausa è abitualmente regolata dall'organismo materno. Il fotoperiodo è la variabile ambientale che normalmente sincronizza l'estro e la competenza riproduttiva maschile. Tuttavia, non tutti i Mammiferi hanno evoluto un modello di riproduzione stagionale; in molte specie, sono altri fattori quali la disponibilità di cibo a determinare il ciclo e il successo riproduttivo (Lopes et al., 2004). Basse temperature ambientali prolungano la durata della diapausa in certi Carnivori (Canivenc and Bonnin, 1979) e ne promuovono l'instaurarsi negli Invertebrati (Kostal et al., 2000) e in alcuni Rettili

(Shanbhag et al., 2003), ruolo svolto invece dalle alte temperature nei Roditori (Marois, 1982).

3.2 Il mantenimento della diapausa

Esperimenti riguardanti il ruolo della luce ambientale e il suo meccanismo d'azione hanno provato che i giorni brevi, ovvero con meno di 12 ore di luce, mantengono gli embrioni in diapausa (Murphy and James, 1974). Si è visto che il trattamento cronico di visoni con melatonina impedisce la terminazione della diapausa, ma non interferisce con la pubertà, l'ovulazione o la formazione della blastocisti (Lopes et al., 2004). In questo contesto, la melatonina svolge un ruolo fondamentale: la sua secrezione prolungata durante i giorni brevi inibisce la liberazione di prolattina dall'ipofisi, facendo persistere la diapausa (Murphy et al., 1990) (Fig.1). Diverse ricerche hanno infatti confermato l'importanza dell'ipofisi per l'attivazione del corpo luteo e il proseguimento della gestazione (Murphy and Moger, 1977).

Vi sono poi delle varianti riguardanti la morfologia dell'embrione nelle specie presentanti diapausa allo stadio di blastocisti. Gli embrioni dei Roditori e del capriolo escono dalla zona pellucida prima di entrare in diapausa (Lopes et al., 2004) però, mentre in quest'ultimo l'embrione ha un complemento di sole 30-40 cellule (Aitken, 1975), quello del topo aumenta in numero fino a circa 130 cellule nelle 72 ore successive all'uscita dalla zona, per poi mantenersi costante durante tutta la diapausa (Spindler et al., 1996). Nei Carnivori, l'embrione in diapausa comprende 200-400 cellule ed è contraddistinto da una zona pellucida (integrata da strati di glicoproteine acquisite durante il passaggio dall'ovidotto all'utero (Enders and Mead, 1996)) che persiste fino al momento dell'impianto (Desmarais et al., 2004). Infine, 60-100 cellule compongono l'embrione in diapausa dei Marsupiali (Smith, 1981).

La durata della diapausa obbligatoria nel visone americano va da 2 a 3 settimane, ma è possibile estenderla ad oltre 3 mesi, in specifiche condizioni sperimentali (Murphy and James, 1974).

La cronologia del processo è la seguente: 6 giorni dopo l'ovulazione indotta e 4 dopo la fertilizzazione nell'ovidotto, l'embrione raggiunge l'utero. Quindi, le cellule embrionali arrestano il loro ciclo, presumibilmente nello stadio G0/G1 e il loro metabolismo si riduce fino al livello basale: così lo sviluppo della blastocisti viene sospeso (Lefèvre et al., 2011). Dopo l'ovulazione, i follicoli di visone collassano e danno vita a corpi lutei secernenti progesterone in piccole quantità. Le cellule, non essendo completamente differenziate, mantengono il loro potenziale mitotico anche durante la diapausa (Douglas et al., 1998b) e l'aumento della secrezione di prolattina, che ha funzione luteotropica, riattiva i corpi lutei dormienti ed induce un rapido aumento della sintesi di progesterone (Murphy and Moger, 1977). Allo stesso tempo, incrementa l'espressione dei recettori per la prolattina sulle cellule luteali, rendendo più abbondanti gli enzimi steroidogenici che guidano la formazione del progesterone (Douglas et al., 1998a).

3.3 La riattivazione dopo la diapausa

L'uscita dalla diapausa e il conseguente impianto avvengono solitamente dopo l'equinozio di primavera, quando i giorni si allungano e le ore di luce dopo l'alba sono almeno da 12 a 16 (Murphy and James, 1974). Ciononostante, l'impianto si verifica anche in animali ciechi o mantenuti costantemente al buio; questo indica che l'instaurarsi di giornate lunghe non è un requisito assolutamente indispensabile (Murphy, 2012).

Nella maggior parte dei Mammiferi manifestanti una discontinuità dello sviluppo, la progressione fino allo stadio di blastocisti e lo sviluppo successivo all'impianto avvengono secondo un programma preordinato e specie-specifico (Lopes et al., 2004).

Tuttavia, sono state documentate delle eccezioni: nella famiglia dei pipistrelli, ad esempio, si assiste ad una variazione nel tasso di sviluppo post-impianto (Rasweiler and Badwaik, 1997). Nel pipistrello, l'LH potrebbe essere richiesto per il mantenimento del corpo luteo quiescente, ma la prolattina può destarne la

riattivazione e promuovere l'inizio dell'impianto, mentre il progesterone esogeno non sortisce effetto (Renfree and Shaw, 2000).

Negli Invertebrati, la diapausa termina mediante l'azione del colesterolo o suoi derivati su recettori nucleari, mentre i Vertebrati hanno evoluto la capacità di utilizzare specifici derivati del colesterolo, gli steroidi, per regolare la riproduzione. Ad esempio, in tutti i casi conosciuti di diapausa riguardante i Mammiferi, il progesterone ovarico è essenziale per farla finire (Lopes et al., 2004).

Modificazioni degli steroidi ovarici accompagnano la riattivazione successiva alla diapausa in molte specie, dato il loro importante ruolo nel controllo delle secrezioni uterine e della crescita embrionale (Renfree and Shaw, 2000).

Il processo avviene anche nelle foche: infatti riguarda almeno 13 specie di Focidi e 7 di Otariidi, in cui la sua estensione oscilla tra 1 e 5 mesi, nel corso dei quali il progesterone rimane basso, per poi aumentare subito prima o al momento della riattivazione della blastocisti, abbinato ad una scarica di estrogeni (Lopes et al., 2004).

La somministrazione giornaliera dell'ormone pituitario prolattina in visoni sottoposti ad ipofisectomia è in grado di salvare sia la funzione luteale che l'impianto embrionale: questa ricerca è stata in seguito convalidata da studi dimostranti che il trattamento con antagonisti della dopamina determina la secrezione precoce di prolattina, attivando il corpo luteo e portando a termine la diapausa (Murphy, 2012). Da quanto detto sin'ora, si evince che la fine della diapausa nel visone è indotta dalla crescente secrezione di prolattina dall'ipofisi. La prolattina provoca l'attivazione delle cellule luteali ovariche e un aumento della secrezione di progesterone, con conseguenze sull'endometrio, risultanti nella riattivazione della blastocisti e successivo impianto (Lefèvre et al., 2011).

Da ciò si deduce che la prolattina fornisce un supporto luteinico diretto alla steroidogenesi nei Carnivori (Murphy, 2012).

Non si conosce la precisa combinazione di ormoni necessaria ad indurre l'impianto in questo ordine di Mammiferi: la somministrazione di progesterone

esogeno mantiene la vitalità della blastocisti, ma non riesce a riattivarla e lo stesso si può dire per altri steroidi in varie specie di Mustelidi (Renfree and Shaw, 2000). Da 6 a 10 giorni prima dell'impianto, i livelli di progesterone circolante nel visone cominciano ad alzarsi e continuano ad aumentare fino ad un picco, circa 20 giorni prima del parto (Møller, 1973; Murphy and Moger, 1977; Pilbeam et al., 1979). L'incremento del progesterone prima dell'impianto può essere riprodotto alterando il fotoperiodo; tuttavia, come già accennato sopra, la combinazione di progesterone esogeno ed estrogeni non produce un impianto. L'ipofisi serve proprio per l'attivazione luteale e per l'impianto embrionale, ma anche per il mantenimento del corpo luteo in seguito all'aumento del progesterone (Murphy et al., 1981). Gli ormoni gonadotropici, FSH (Follicle-Stimulating Hormone = ormone follicolo stimolante) ed LH (Luteinizing Hormone = ormone luteinizzante), potrebbero essere i fattori ipofisari che accelerano l'impianto (Pearson and Enders, 1944). L'assenza di tali ormoni non causa però la quiescenza luteale e la diapausa; infatti, anche durante la diapausa, si verificano la follicologenesi e l'ovulazione, eventi dipendenti da FSH ed LH (Murphy et al., 1981). È per questo motivo che si è ipotizzato che sia la luteotropina, oggi conosciuta come prolattina, a determinare l'attivazione luteale, considerato appunto il suo ruolo luteotropico nel visone (Hansson, 1947). Possedere un'ipofisi intatta è un requisito necessario per la normale funzione luteale e per l'impianto embrionale anche negli altri Mustelidi, quali furetto e moffetta. La prolattina da sola attiva il corpo luteo gravidico, termina il periodo di quiescenza obbligatoria e ripristina la funzione luteale. Il terzo giorno dopo l'inizio del trattamento con prolattina, si osserva l'incremento del progesterone periferico. I livelli di questo ormone, in visoni sottoposti ad ipofisectomia, calano ai livelli precedenti al trattamento entro il diciottesimo giorno dal suo inizio, nonostante si continui a somministrare giornalmente 0.5 mg di prolattina. Questa perdita della funzione luteale risulta nel fallimento dello sviluppo embrionale e nella morte degli embrioni impiantati. La luteolisi può essere dovuta al fatto che il corpo luteo diviene refrattario a ripetute iniezioni di prolattina. Non sembra comunque che la

formazione di anticorpi contro la prolattina ovina sia il motivo della refrattarietà. Un'altra ipotesi che spiega la perdita della funzione luteale è che sono necessari anche altri fattori ipofisari, oltre alla prolattina, per il mantenimento dell'embrione dopo l'impianto.

Nel visone, la scarica di LH avviene entro 90 minuti dallo stimolo copulatorio. Tuttavia, la combinazione di LH e prolattina sembra non essere più efficace della sola prolattina nel determinare il declino del progesterone conseguente all'ipofisectomia dopo il suo aumento nel periodo pre-impianto. Il fotoperiodo ha anch'esso effetto sulla tempistica dell'impianto. Esso influenza inoltre la secrezione di prolattina, che poi attiva il corpo luteo ed accelera l'impianto. Nel visone prima dell'attivazione luteale, i livelli periferici di prolattina appaiono alti (Murphy et al., 1981) (Fig.1).

Il trattamento dei Mustelidi con progesterone ed estrogeni per terminare la diapausa si rivela dunque infruttuoso, suggerendo che la regolazione dipende da altri fattori (Murphy et al., 1983), probabilmente di natura proteica (Huang et al., 1993), prodotti dal corpo luteo. Una possibile candidata è la proteina glucosio-6-fosfato isomerasi, la cui concentrazione nel circolo è bassa durante la diapausa, ma incrementa con l'attivazione del corpo luteo, da cui sembra essere secreta per favorire l'impianto (Schulz and Bahr, 2004).

L'aumentata secrezione proteica uterina è stata associata con la ripresa dello sviluppo embrionale in visone e moffetta (Lefèvre et al., 2011). I risultati derivanti da esperimenti di trasferimento reciproco degli embrioni tra visone e furetto, sostengono e rafforzano l'ipotesi che la conclusione della diapausa è prodotta dall'ambiente uterino, ossia dalla secrezione di specifici fattori uterini all'interno del lume dell'utero (Chang, 1968).

Altre osservazioni riguardano la regolazione della proliferazione cellulare, il ripiegamento delle proteine e l'omeostasi, processi biologici orchestrati dall'ambiente uterino e innescanti l'emergenza della blastocisti dalla diapausa: queste rilevazioni sono coerenti con studi (Desmarais et al., 2004) che descrivono un marcato incremento delle proteine embrionali e della sintesi di DNA entro 72 h

dall'inizio della riattivazione; da allora in poi nel visone aumenta il diametro embrionale. I risultati suggeriscono inoltre che l'omeostasi cellulare e la catena di trasporto degli elettroni possono essere controllate da elementi uterini nella blastocisti di visone al momento della riattivazione (Lefèvre et al., 2011)

Nei Roditori sembra che la prolattina mantenga i recettori dell'ormone luteinizzante sulle membrane cellulari ed inibisca la conversione del progesterone a metaboliti biologicamente meno attivi, piuttosto che stimolarne direttamente la sintesi (Murphy, 2012).

La riattivazione *in vitro* di blastocisti seguenti impianto ritardato indotto sperimentalmente nei topi è associata ad un incremento dell'assunzione di aminoacidi da parte della blastocisti. I sistemi di trasporto degli aminoacidi sono attivati da un gradiente elettrochimico transmembrana risultante dalla modulazione della catena di trasporto degli elettroni: gli ioni sodio sono più numerosi nei fluidi uterini del modello di topo in impianto ritardato dopo la riattivazione della blastocisti indotta dagli estrogeni e la riattivazione della blastocisti *in vitro* viene inibita in un mezzo con bassa concentrazione di sodio. Simili meccanismi utero-dipendenti sottostanti la regolazione dell'omeostasi cellulare e implicanti l'attivazione di sistemi di trasporto sono coinvolti nella riattivazione della blastocisti di visone (Lefèvre et al., 2011).

Pare inoltre che vi sia un importante incremento della risposta immunitaria innata in concomitanza con l'aumento dell'attività secretoria dell'utero durante la riattivazione della blastocisti, un periodo critico durante il quale l'ambiente uterino e la blastocisti stessa sono più vulnerabili alle infezioni batteriche.

Questo processo potrebbe avere un ruolo protettivo dell'ambiente uterino e dell'embrione contro le infezioni batteriche durante l'emergenza della blastocisti dalla diapausa nel visone (Lefèvre et al., 2011).

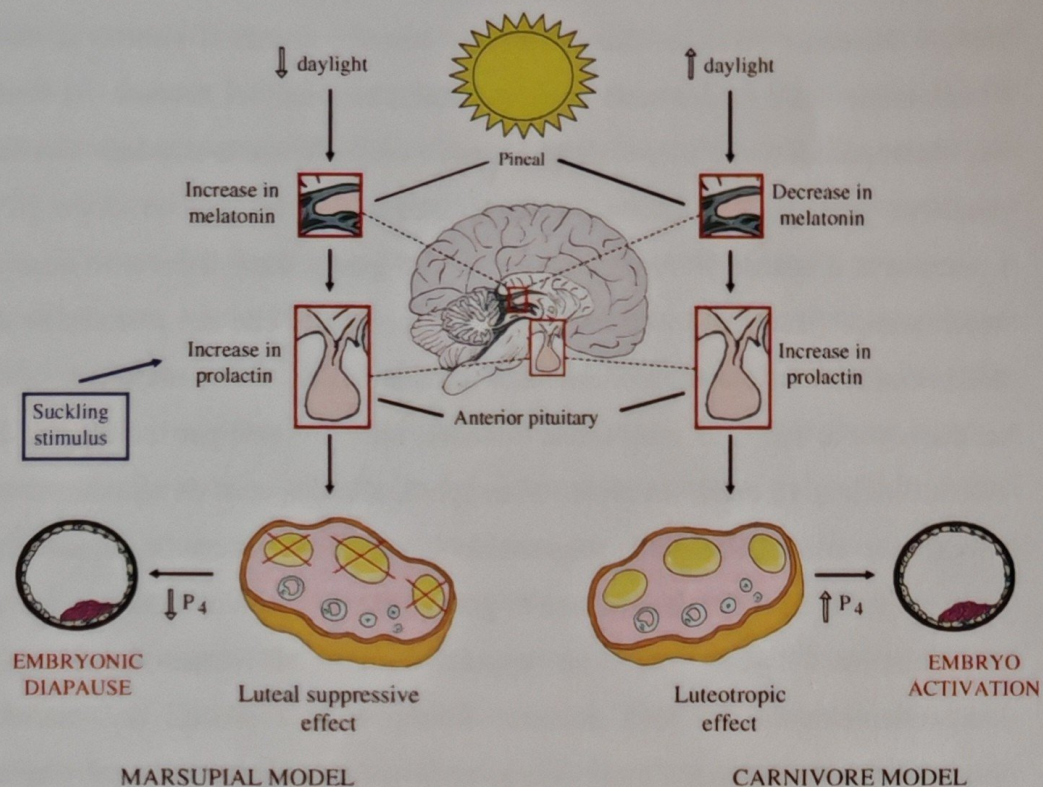


Fig.1. Modulazione della diapausa mediante melatonina e prolattina (da Lopes et al., 2004).

3.4 Cenni sulla diapausa nei Marsupiali

Le cellule che formano l'embrione in diapausa sono circondate da un rivestimento glicoproteico, che include la zona pellucida dell'ovocita e due ulteriori rivestimenti derivanti dall'ovidotto (Lopes et al., 2004). Questo rivestimento mucoide acellulare e guscio cheratinoso impediscono il contatto tra cellule endometriali ed embrionali per i primi due terzi della gestazione, dunque l'ambiente uterino gioca un ruolo chiave nella regolazione dello sviluppo. Progesterone ed estradiolo stimolano rapidi cambiamenti nella secrezione proteica dell'utero, il cui fluido contiene varie prealbumine utero-specifiche. La gestazione è mantenuta da modificazioni uterine, controllate da un aumento precoce e transitorio del progesterone. La sua richiesta è però breve, come testimoniato dal fatto che l'ovariectomia dopo il settimo giorno non condiziona il

proseguimento della gestazione. Nella maggior parte delle specie di Marsupiali i giovani nascono verso la fine della fase luteale, quindi il ritorno in calore e l'ovulazione della madre sono soppressi dalla suzione dei neonati. Al contrario, nei Macropodidi (canguri e wallaby) l'unico cucciolo viene alla luce alla fine del proestro, per cui l'ovulazione e la fertilizzazione avvengono dopo il parto. L'entrata in diapausa si verifica nei primi 6-8 giorni dopo il parto in quasi tutti i Macropodidi (Renfree and Shaw, 2000). È probabile che nei wallaby le cellule della blastocisti in diapausa si arrestino durante la fase G₀, quando l'embrione ha un diametro di soli 0,25 mm, senza dividersi ulteriormente per tutta la sua durata, cioè all'incirca 11 mesi. In alcuni Marsupiali, alla diapausa da allattamento se ne sovrappone una regolata dalla stagione: lo stimolo per l'innescamento e il mantenimento della diapausa è dato dalla presenza di giovani lattanti (che inducono la secrezione di prolattina, il cui effetto è appunto quello di ostacolare l'impianto), indipendentemente dal loro numero. Rimuovendo i piccoli dal marsupio o iniettando progesterone, l'embrione si riattiva rapidamente e va ad impiantarsi (Renfree and Tyndale-Biscoe, 1973). Le blastocisti iniziano ad ingrandirsi anche in seguito ad ovariectomia o asportazione del corpo luteo entro 2-4 giorni dalla rimozione dei lattanti dal marsupio, però alla fine collassano. Asportando invece il corpo luteo dopo 8 giorni, lo sviluppo si completa; si deduce quindi che la presenza del corpo luteo è necessaria almeno i primi giorni, per mediare gli effetti della perdita dello stimolo della suzione (Renfree and Shaw, 2000). Somministrando 17 β -estradiolo, la blastocisti subisce delle mitosi e si espande, ma comunque non oltre l'ottavo giorno (Fletcher et al., 1988). La crescita embrionale ricomincia quando le giornate si allungano ed implica quindi la melatonina come effettore; questo è testimoniato dal fatto che, praticando la denervazione della ghiandola pineale (epifisi), la diapausa si conclude (Lopes et al., 2004). Nel caso dei Macropodidi, la prolattina sopprime la crescita e la secrezione steroidea del corpo luteo. Quest'ultimo però presenta i recettori per la prolattina, la cui secrezione può essere impedita tramite una singola iniezione di bromocriptina, agonista della dopamina, che potrebbe anche risvegliare la

blastocisti dalla diapausa (Tyndale-Biscoe and Hinds, 1984). Il rilascio di prolattina avviene in risposta allo stimolo della suzione. La rimozione dei cuccioli dal marsupio durante la stagione riproduttiva fa terminare la diapausa entro 72 ore e ciò comporta un incremento dell'attività metabolica embrionale. Per permettere al corpo luteo di sfuggire all'inibizione, lo stimolo della suzione deve mancare per almeno 72 ore. Se dopo tale lasso di tempo i cuccioli sono sostituiti, la riattivazione non viene bloccata. Il corpo luteo secerne maggiori quantità di progesterone a partire dal terzo giorno dopo la riattivazione, mentre tra i due giorni successivi aumenta la sintesi proteica dell'utero. Il progesterone agisce a sua volta sulle secrezioni uterine (in cui si trovano numerosi polipeptidi, inclusi certi fattori di crescita), determinando alcuni cambiamenti e anche gli ormoni femminili sembrano utili alla produzione di una sequenza di fattori regolanti diverse fasi dell'espansione (Fig.2). Dal quarto giorno, il metabolismo ossidativo (ossidazione di glutammina e palmitato) del glucosio aumenta in modo considerevole, assieme alla produzione di ATP. Il quinto giorno si assiste ad un incremento della sintesi di RNA, mentre diminuisce la produzione di lattato. Durante questi primi stadi della riattivazione, l'energia necessaria viene fornita dai carboidrati, integrati da aminoacidi e acidi grassi (Renfree and Shaw, 2000).

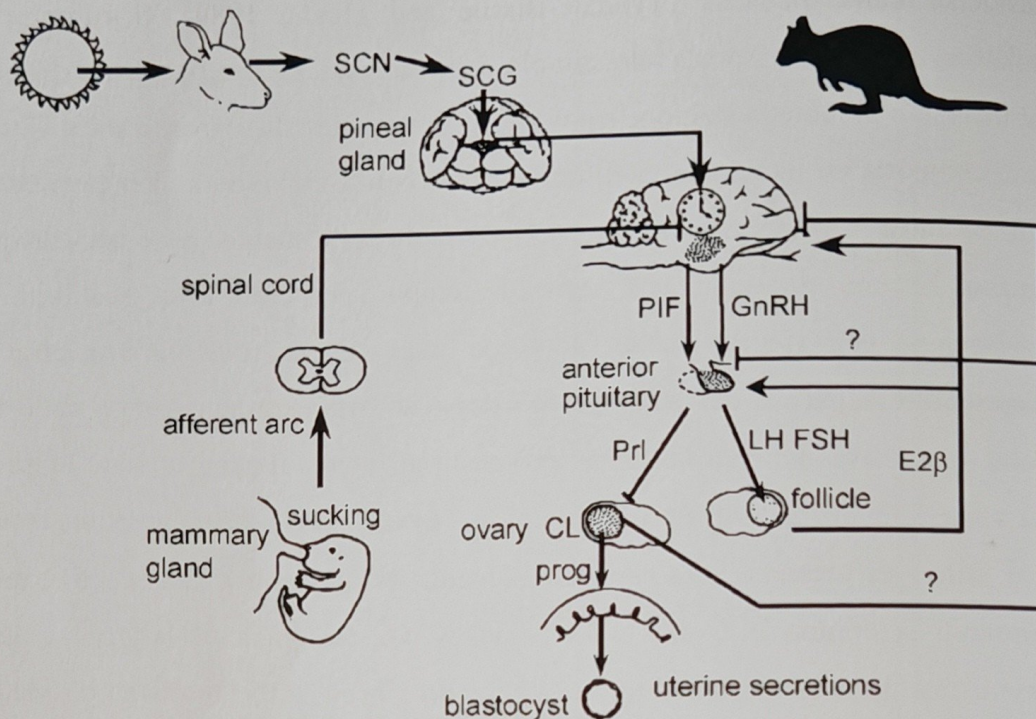


Fig.2. Controllo della diapausa nei Marsupiali (da Renfree and Shaw, 2000).

3.5 Cenni sulla diapausa nei Roditori

Per quanto riguarda la diapausa facoltativa dei Roditori, la quale termina dopo pochi giorni, l'accoppiamento avviene al presentarsi di un estro post-parto e la presenza di giovani lattanti ritarda l'epoca dell'impianto, che viene ulteriormente posticipata all'aumentare del numero di cuccioli (Weichert, 1940). Altre fonti determinanti diapausa in questo ordine di Mammiferi sono l'affollamento e l'introduzione di nuovi maschi (Marois, 1982). Pare che gli embrioni di topo entrino in quiescenza nello stadio a 8 cellule e perché ciò si verifichi è richiesto uno specifico rapporto nucleo/citoplasma (Lopes et al., 2004). Probabilmente è la mancanza di proteine ad elevato peso molecolare nel lume uterino che conduce alla quiescenza (Surani, 1975). L'emersione dalla diapausa scaturisce da una scarica di estrogeni ovarici, che consentono l'impianto della blastocisti nell'utero preparato dal progesterone (Renfree and Shaw, 2000). Essa avviene in due fasi: entro 1 ora dalla scarica di estrogeni riprendono la sintesi

proteica e di RNA seguita, 24 ore dopo, dall'adesione embrionale (Surani, 1975). Gli estrogeni potrebbero non agire direttamente sulla blastocisti, ma stimolare l'utero a produrre i fattori di cui essa necessita (Daniel, 1970). Inoltre, la ripresa dello sviluppo potrebbe essere mediata sia dalle secrezioni uterine che dalle interazioni cellulari tra embrione ed epitelio endometriale. Entro 12 ore dal segnale di riattivazione, le mitosi e il numero di cellule aumentano e la risorsa energetica principale della blastocisti di topo sembra essere il piruvato mentre, dopo 16 ore, il suo compito viene assunto dal glucosio (Renfree and Shaw, 2000). L'impianto richiede l'espressione della ciclo ossigenasi-2 (COX-2), regolata in questa fase dalla blastocisti (Chakraborty et al., 1996).

Come già detto in precedenza, il trasferimento reciproco degli embrioni ha dimostrato che l'ambiente uterino materno induce e mantiene l'arresto dello sviluppo. Alcuni studi supportano l'idea che la diapausa sia dovuta alla mancanza di fattori uterini necessari per lo sviluppo oltre lo stadio di blastocisti.

Successivamente alla scarica di estrogeni che induce l'impianto nei topi, si assiste invece alla sintesi di parecchie classi di proteine, inclusi i fattori di adesione, le citochine e i fattori di crescita (Renfree and Shaw, 2000).

4. FATTORI FAVORENTI L'IMPIANTO EMBRIONALE

4.1. Gli estrogeni

La scarica ovarica di 17β -estradiolo che avviene in corrispondenza dell'emersione dalla diapausa potrebbe avere effetti mitogeni diretti sull'embrione dormiente attraverso i suoi recettori nucleari, $ER\alpha$ ed $ER\beta$, che sono stati entrambi identificati nelle cellule della blastocisti in diapausa (Paria et al., 1998) (Fig.3). Il trattamento di topi in diapausa con 17β -estradiolo risulta, dopo 6 ore, nell'attività degli embrioni durante la fase S (Given and Weitlauf, 1981) e, dopo 12 ore, in un rilevante aumento del numero di cellule (Spindler et al., 1996) (in questa specie, la proliferazione comincia poco dopo il segnale degli estrogeni nella massa cellulare interna della blastocisti e, passate 6-12 ore, prosegue nel trofoblasto) (Given and

Weitlauf, 1981). Questo indica che 17β -estradiolo, estrone ed estriolo (ovvero i principali estrogeni dei mammiferi) non attivano direttamente gli embrioni quiescenti (Paria et al., 1998). Infatti, le blastocisti trattate *in vitro* con estrogeni non si impiantano, poiché il 17β -estradiolo non riesce ad indurre l'espressione del legame di EGF (Epidermal Growth Factor = fattore di crescita epidermico) con l'embrione, per permetterne l'attivazione. Nonostante queste evidenze, è comunque verosimile che gli estrogeni funzionino come mitogeni atti a bloccare l'arresto del ciclo cellulare. Gli estrogeni potrebbero dunque avere effetti non mediati attraverso i classici recettori nucleari e infatti ci sono prove che testimoniano la presenza di segnali non genomici tra eventi cellulari regolati dagli estrogeni ed EGF. Il 17β -estradiolo provoca l'espressione di membri della famiglia di EGF che, per mezzo dei loro recettori, ripristinano l'attività mitotica. Dalla conversione uterina del 17β -estradiolo derivano poi i catecol-estrogeni, i quali a loro volta attivano l'embrione mediante il percorso della protein chinasi (Fig.3).

4.2. L'anandamide

La ripresa della crescita è promossa anche da basse concentrazioni di anandamide, un cannabinoide endogeno dell'endometrio. In uteri di topo ovariectomizzati e trattati con progesterone si sono riscontrate concentrazioni elevate e fisiologicamente rilevanti di anandamide, il quale inibisce lo sviluppo embrionale (Wang et al., 2003). In contrasto, a bassi livelli esso attiva per l'appunto le blastocisti quiescenti, suggerendo che diverse espressioni degli endocannabinoidi potrebbero regolare la diapausa facoltativa (Lopes et al., 2004) (Fig.3).

4.3. I fattori di crescita

È risaputo che nell'utero e nell'embrione sono presenti alcuni fattori di crescita noti, come appunto LIF, EGF, IGF (Insulin-like Growth Factor = fattore di crescita insulino-simile), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor = fattore di

crescita derivato dalle piastrine), FGF (Fibroblast Growth Factor = fattore di crescita dei fibroblasti) e TGF- β (Transforming Growth Factor- β = fattore di crescita trasformante beta), attivi durante l'embriogenesi (Renfree and Shaw, 2000).

L'azione del LIF (Leukemia Inhibitory Factor = fattore inibitorio di leucemia) sull'utero può produrre la secrezione di fattori mitogeni dall'embrione in quiescenza. Oltre che nei topi, il LIF agisce nei Carnivori, dove si rileva in sede uterina durante gli stadi precoci della riattivazione (Lopes et al., 2004). Nel topo, è stato dimostrato che LIF ed EGF sono fondamentali per il normale sviluppo embrionale durante il periodo peri-impianto. Attraverso interazioni paracrine ed autocrine, alcuni di questi fattori di crescita contenuti nelle secrezioni uterine possono regolare il metabolismo e la crescita embrionale (Fig.3). LIF è necessario per l'accrescimento della blastocisti, ma non per la sua differenziazione.

Nel visone, i livelli uterini di LIF si mantengono bassi durante la diapausa, ma aumentano transitoriamente durante i primi due giorni della riattivazione.

Nei topi, il LIF consente l'impianto ed è prodotto dalle ghiandole endometriali nel corso del quarto giorno di gestazione. Analisi operate su questi animali indicano che gli estrogeni materni controllano l'espressione di LIF, la quale coincide con la formazione della blastocisti e precede sempre l'impianto. Il LIF potrebbe dunque influenzare direttamente l'embrione, oppure agire sull'utero in maniera autocrina alterandone l'attività secretoria, affinché sia pronto per l'impianto e consenta il proseguimento dello sviluppo.

IGF-1 ed IGF-2 regolano anch'essi la crescita embrionale: modulano l'assunzione di glucosio da parte delle blastocisti di topo, regolando il suo trasportatore GLUT-1. È probabile che sia proprio l'IGF a coordinare l'incremento dell'assunzione ed utilizzazione del glucosio che accompagnano la riattivazione nel wallaby (Renfree and Shaw, 2000).

In assenza di estrogeni, si può ottenere il medesimo risultato in ratti ovariectomizzati tramite l'EGF, che è un potente mitogeno (Johnson and Chatterjee, 1993). La fine della diapausa nei Roditori implica l'intervento di

alcuni membri della famiglia di EGF, come l'EGF legante l'eparina (hbEGF) e l'anfiregulina (Dey et al., 2004) espressi nei siti d'impianto precedentemente all'attivazione dell'embrione (Fig.3). L'espressione di hbEGF nell'utero è indotta dagli estrogeni (che sono il segnale per la terminazione della diapausa) ed è associata alla ripresa dell'attività della blastocisti di topo (Lopes et al., 2004). Questi estrogeni attivanti la blastocisti determinano anche l'espressione di betacellulina ed epiregulina (altri due membri della famiglia di EGF, assenti nel corso della diapausa) nell'epitelio luminale dell'utero di topo e nello stroma sottostante, dove si impianta la blastocisti (Renfree and Shaw, 2000). I recettori per EGF sono presenti anche nei Carnivori, sempre connessi con l'uscita dalla diapausa. Un potenziale bersaglio del fattore di crescita e della cascata delle citochine che concludono l'arresto embrionale è il gene codificante per PTX3, che partecipa alla sintesi glicoproteica e la cui delezione disgrega la funzione ovarica, interferendo con la formazione del cumulo. La proteina PTX3 appartiene alla famiglia delle pentraxine, è coinvolta nel legame del complemento e nella risposta immunitaria innata, è secreta in risposta alle citochine infiammatorie e nell'utero post-diapausa è espressa ad un'intensità quasi quattro volte maggiore (Lopes et al., 2004). Nuove conoscenze giungono dallo studio del moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), suggerendo che l'arresto dello sviluppo durante l'embriogenesi può essere attribuito al gene Dacapo, omologo del p21 dei mammiferi, il quale funge da inibitore dell'attivazione del complesso ciclina E-cdk2 (Lane et al., 1996). Poiché la formazione di tale complesso serve per l'accesso alla fase S, la sua mancata attivazione conduce all'arresto in G1. La sovra espressione di p21 operata da fattori di trascrizione della famiglia FoxO inizia e mantiene lo stato di diapausa, interrompendo la proliferazione cellulare (Lopes et al., 2004). Nel corso della diapausa degli Insetti, il PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, fattore associato alla sintesi di DNA e regolato da p21) non è espresso. Nell'embrione di topo, alla dormienza sono correlate l'aumento dell'espressione di p21 e la concomitante riduzione di diversi geni implicati nella replicazione del DNA. Queste ricerche hanno anche dimostrato che negli

embrioni dormienti Btg1 (B cell translocation gene 1, fattore che impedisce il passaggio da G0 a G1) è sovra regolato e pertanto il ciclo cellulare resta sospeso. La riattivazione embrionale si verifica per mezzo dei mitogeni provenienti dall'ovaio (estrogeni) e dall'utero (famiglia di EGF e altri fattori) (Fig.3). I loro effetti sono molteplici: in primo luogo determinano una sovra espressione di PCNA (antigene di proliferazione nucleare), poi fosforilano i fattori di trascrizione FoxO, impedendone la traslocazione nel nucleo ed annullandone così l'effetto citostatico, infine stimolano direttamente svariati componenti della regolazione di G1, comprese le cicline D, E, cdk2 e cdk4 (Lopes et al., 2004). Nella diapausa non sembra invece essere coinvolto p53 (inibitore del ciclo cellulare), visto che la sua espressione e quella dei geni ad esso associati non differiscono tra gli embrioni di topo quiescenti ed attivati. (Hamatani et al., 2004).

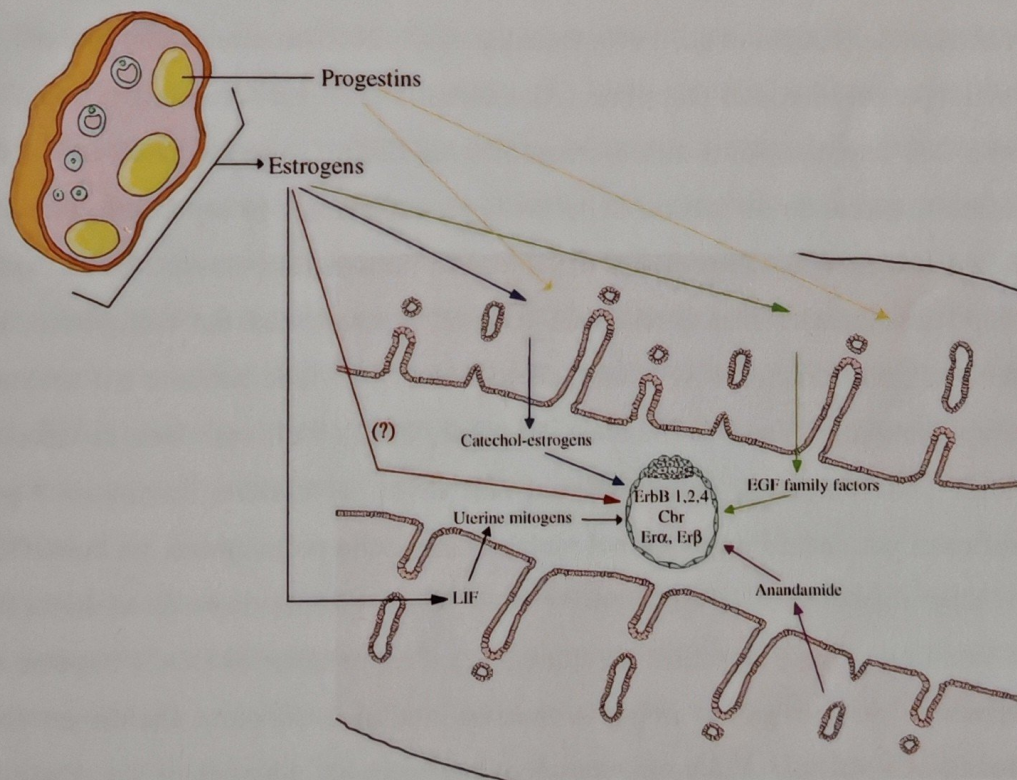


Fig.3. Il 17 β -estradiolo induce la secrezione di fattori mitogeni dall'embrione quiescente (da Lopes et al., 2004).

4.4. Le poliammine

Un'altra classe di composti presenti in tutte le cellule dei mammiferi sono le poliammine, in particolare putrescina, spermidina e spermina. A pH fisiologico, esse sono cariche positivamente e si legano alle molecole di DNA ed RNA (Wallace et al., 2003): così facendo modificano la struttura della cromatina, regolano il tasso di sintesi del DNA, influenzano la proliferazione cellulare e controllano l'espressione genica, sia a livello di trascrizione che di traduzione (Pavine et al., 2011). Derivano direttamente dalla dieta (Bardocz, 1993) oppure possono essere sintetizzate ex novo a partire da aminoacidi, come L-arginina ed L-metionina. L'ornitina decarbossilasi 1 (ODC1), essendo un enzima con breve emivita, regola il tasso di biosintesi delle poliammine, convertendo l' L-ornitina derivata dalla L-arginina in putrescina (Tabor and Tabor, 1964). Le poliammine sono essenziali per la gametogenesi e per la fertilizzazione (Kaipia et al., 1990; Bastilda et al., 2005) e sono indispensabili per lo sviluppo precoce dell'embrione (Alexandre, 1978). La somministrazione, nel giorno dell'impianto, di α -difluorometilornitina (DFMO) ne limita ed inibisce la biosintesi, causando un arresto dello sviluppo embrionale in topo, ratto e criceto (Fozard et al., 1980). In presenza di DFMO la riattivazione *in vitro* di blastocisti di topo in diapausa risulta ritardata, mentre l'escrescenza del trofoblasto, che riflette la riattivazione, si verifica quando la DFMO viene rimossa e/o sostituita dalle poliammine (Van Winkle and Campione, 1983). Nell'embrione di visone al termine della diapausa, è stata trovata una sovra espressione uterina di 3 geni codificanti per enzimi implicati nel metabolismo delle poliammine, tra cui ODC1. Gli esperimenti hanno dimostrato che il terzo giorno dopo la riattivazione dell'embrione c'è un significativo aumento dell'espressione di ODC1 rispetto alla diapausa. Il primo giorno dopo la riattivazione si è scoperto inoltre un forte aumento di ODC1 a livello proteico nell'epitelio ghiandolare e luminale dell'endometrio e nello stroma sub-epiteliale, se confrontato con la diapausa, nel corso della quale ODC1 si osserva solo nell'epitelio luminale e nello stroma sub-epiteliale. ODC1 può essere osservata anche nel citoplasma delle cellule

endometriali positive. Una distribuzione simile di questa proteina si riscontra in uteri sezionati nei giorni 3, 5 e 7 dopo la riattivazione della blastocisti (Pavine et al., 2011)

ODC1 codifica per l'enzima limitante il tasso di biosintesi delle poliammine ed è stato dimostrato che la quantità di queste poliammine tende ad aumentare rispetto alla diapausa verso il sesto giorno dopo la riattivazione, ma solo la concentrazione di putrescina si è rivelata essere statisticamente rilevante ($P = 0,05$). Se delle femmine gravide di visone vengono trattate con DFMO, dopo 5 giorni si osserva che le concentrazioni uterine di putrescina, spermidina e spermina risultano ridotte rispetto al contenuto di poliammine dell'utero di verifica, anche se concentrazioni statisticamente rilevanti si sono riscontrate solo per la putrescina e la spermidina ($P < 0.05$).

L'analisi dell'espressione genica globale ha dimostrato la sovra regolazione di geni controllanti la sintesi di poliammine associate alla riattivazione dell'embrione in diapausa. È stato quindi ipotizzato che queste proteine siano coinvolte nell'uscita dell'embrione di visone dalla dormienza. In generale, la mancanza di poliammine durante la ripresa dello sviluppo embrionale non danneggia la gestazione; ciononostante, la tempistica del processo d'impianto è ritardata nelle femmine sottoposte a mancanza di poliammine. La durata di questo ritardo artificialmente indotto è comparabile con la durata del trattamento con DFMO nel corso della prima parte della riattivazione, dimostrando così che una mancanza di poliammine al momento della riattivazione, posticipa l'impianto (Pavine et al., 2011).

Un'ulteriore ricerca riportava che il trattamento con DFMO potrebbe influenzare la produzione e la secrezione di progesterone, ma dagli esiti ottenuti tramite esperimenti atti a verificare tale ipotesi si evince che, all'inizio della riattivazione, la mancanza di poliammine indotta dal trattamento con DFMO non disgrega la luteinizzazione ovarica e la produzione di progesterone.

Il progesterone ovarico sostiene l'endometrio ed è essenziale per la riattivazione dell'embrione di visone dalla diapausa, ma è stato riportato che la mancanza di

poliammine indotta dal trattamento con DFMO incide sulla produzione di progesterone nel topo (Pavine et al., 2011). Al contrario, il trattamento con DFMO non disturba la sintesi di progesterone nel visone. Quindi, il posticipo dell'impianto embrionale associato al trattamento con DFMO nelle prime fasi della riattivazione, non risulta dal fallimento della steroidogenesi ovarica, ma piuttosto da conseguenze dirette della mancanza di poliammine nell'ambiente uterino durante gli eventi precedenti l'impianto. I risultati argomentano che la mancanza di poliammine provoca l'arresto mitotico, visto che la proliferazione cellulare in embrioni raccolti da femmine trattate con DFMO è sorprendentemente più bassa di quella degli embrioni del gruppo di controllo. L'espansione embrionale, che nel visone precede la ripresa della mitosi, non sembra essere influenzata dalla mancanza di poliammine. Le cellule del trofoblasto sono più colpite rispetto a quelle della massa cellulare interna, che invece manifesta attività proliferativa ed esistono prove convincenti dell'implicazione delle poliammine nella ripresa della proliferazione delle cellule del trofoblasto (Pavine et al., 2011). Gli eventi riguardanti l'impianto embrionale posticipato, sono una conseguenza diretta dell'arresto dello sviluppo embrionale che si verifica in seguito a riattivazione indotta dalla mancanza di poliammine all'emergenza dell'embrione dalla diapausa. I risultati *in vitro* sostengono le osservazioni *in vivo*, dimostrando che il trattamento della madre con l'inibitore della sintesi di poliammine, blocca la riattivazione embrionale. *In vitro*, le cellule del trofoblasto rispondono alla privazione di poliammine con un precipitoso declino della proliferazione cellulare. Inoltre, il fatto che la proliferazione riprende quando si rimuove l'inibitore, è coerente con la ripresa dello sviluppo embrionale e le gestazioni di successo osservate in femmine trattate con DFMO *in vitro* (Pavine et al., 2011). Cambiamenti nella morfologia cellulare sono inoltre in linea con un effetto delle poliammine sugli eventi mitotici: il trattamento causa la trasformazione di cellule piccole e compatte in cellule grandi e multinucleate; nelle cellule del trofoblasto private di poliammine c'è traslocazione della proteina ODC1 da siti subcellulari perinucleari a nucleari. La localizzazione subcellulare della proteina ODC1 pare

essere strettamente controllata durante il ciclo cellulare, con una forte localizzazione del nucleo e diffusa del citoplasma durante la fase M, in particolare durante la citocinesi, e localizzazione perinucleare durante le fasi G1 e G2 (Pavine et al., 2011). La ODC1 perinucleare e le poliammine si pongono accanto al reticolo endoplasmatico e ai poliribosomi, dove regolano la sintesi proteica (Fujiwara et al., 1998). Al contrario, la localizzazione nucleare e citoplasmatica di ODC1 suggerisce un ruolo delle poliammine nella formazione del fuso mitotico, intervenendo nel riordinamento del citoscheletro e nella condensazione della cromatina (Pavine et al., 2011). Recentemente, è stato riportato che ODC1 e le poliammine sono implicate nella polimerizzazione dell'actina (indispensabile per la citocinesi), regolando RhoA, un membro della famiglia delle GTP-asi. La mancanza di poliammine causa arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 come nelle cellule del trofoblasto di visone. Le poliammine sono perciò fondamentali per il mantenimento del ciclo cellulare nell'embrione, come dimostrato dal fatto che il trattamento simultaneo con putrescina e DFMO impedisce l'induzione di questo stato simile alla quiescenza nelle cellule del trofoblasto di visone (Pavine et al., 2011).

È stato dimostrato che la riattivazione *in vitro* di blastocisti di topo in diapausa è associata con l'innescamento di sistemi di trasporto per gli aminoacidi e con un aumento dell'incorporazione di questi composti da parte dei fluidi uterini (Weitlauf, 1973). Leucina ed arginina, uno dei precursori della putrescina, sono essenziali per la riattivazione *in vitro* della blastocisti di topo (Van Winkle et al., 2006). Sistemi di trasporto per la leucina e l'arginina sono attivati simultaneamente da un elevato gradiente di sodio (Na^+) (Van Winkle, 2001) e nel topo la concentrazione di Na^+ incrementa nei fluidi uterini al momento della riattivazione della blastocisti (Van Winkle and Campione, 1983). L'inibizione della riattivazione si osserva quando le blastocisti vengono poste in un mezzo con bassa concentrazione di Na^+ (Van Winkle, 1981). La leucina attiva il target mammifero della rapamicina, che stimola la traduzione di ODC1 da parte del fattore di inizio eucariotico 4E (Raught et al., 2000). Tutte queste indagini

suggeriscono che la produzione intraembrionale di poliammine è essenziale per la riattivazione della blastocisti di topo (Pavine et al., 2011). Il fatto che nel visone si sia misurato un aumento nei livelli uterini di poliammine al momento della riattivazione delle blastocisti non esclude il ruolo delle poliammine prodotte dall'utero e rilasciate nel fluido uterino al momento della riattivazione della blastocisti. Il concomitante aumento nell'espressione uterina di ODC1, l'enzima limitante il tasso di biosintesi delle poliammine e aumento dei livelli di poliammine all'emergenza dalla diapausa, avvalorano il fatto che esse siano i fattori principali supportanti la riattivazione embrionale nel visone. La mancanza di poliammine durante l'uscita dell'embrione dalla diapausa, la prolunga o la induce nuovamente, mantenendo le cellule del trofoblasto in uno stato di quiescenza. Poiché la rimozione dell'inibitore della sintesi delle poliammine risulta in un impianto posticipato dell'embrione ma non disturba la conseguente gestazione postimpianto, è verosimile che le poliammine siano fattori chiave della riattivazione embrionale che conclude la diapausa obbligatoria del visone (Pavine et al., 2011).

4.5. HMGN1 e SPARC

In seguito ad una sovra espressione dei geni HMGN1 e SPARC sono state dimostrate sostanziali modificazioni dell'utero di visone, quali il rimodellamento tissutale e della cromatina, associati con la riattivazione e l'uscita della blastocisti dalla diapausa (Lefèvre et al., 2011).

HMGN1 codifica per una proteina nucleare non istonica che si lega in modo specifico ai nucleosomi, promuove la decondensazione della cromatina e induce l'attivazione della trascrizione di geni a valle (Gerlitz, 2010). La distribuzione di HMGN1 nel citoplasma è associata alla mitosi, mentre la localizzazione nucleare di HMGN1 è piuttosto correlata con l'interfase (Louie et al., 2000), suggerendo che la proliferazione cellulare uterina al momento della riattivazione dell'embrione di visone può essere un processo dipendente in parte da HMGN1 durante l'emergenza dalla diapausa (Lefèvre et al., 2011).

SPARC codifica per una glicoproteina secreta appartenente alla superfamiglia delle proteine matricellulari, modulatrici delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, è coinvolta nel rimodellamento tissutale (Sage et al., 1984).

Il quinto giorno dopo la riattivazione, si verifica un lieve decremento dell'abbondanza di HMGN1 e SPARC: ciò potrebbe indicare che le modificazioni dell'ambiente uterino al momento della riattivazione della blastocisti di visone seguono eventi determinati cronologicamente.

È stato anche dimostrato un aumento dell'espressione genica di SPARC nell'utero di visone all'emergenza dalla diapausa (Lefèvre et al., 2011). Quindi, la sovra espressione di SPARC nell'utero del visone al momento della riattivazione può essere il risultato della riattivazione del corpo luteo e dell'aumentata secrezione di progesterone associata con la riattivazione embrionale (Murphy et al., 1983). SPARC è descritto come un fattore antiadesivo e può servire come importante elemento uterino che evita l'impianto embrionale precoce durante il periodo di riattivazione embrionale (Lefèvre et al., 2011).

Il metabolismo delle blastocisti dei Carnivori in diapausa non è completamente soppresso, in quanto l'assunzione di ossigeno, la sintesi di DNA, RNA e proteine continuano a ritmi ridotti. Il diametro di queste blastocisti aumenta gradualmente grazie all'accumulo di fluido all'interno del blastocele e può essere usato come parametro per determinare quando sono avvenute ovulazione e fertilizzazione (Yamaguchi et al., 2006).

5. FOCUS SU ALCUNE SPECIE RAPPRESENTATIVE.

5.1. Visone americano (*Neovison vison* – Schreber, 1777)

La massima fertilità del visone coincide con il fotoperiodo immediatamente precedente all'equinozio di primavera. Possono accoppiarsi nuovamente 10 giorni dopo la prima ovulazione: la sopravvivenza degli embrioni della prima ondata di follicoli (risultanti dal primo accoppiamento) è garantita dalla loro entrata in uno stato di diapausa obbligatoria (Polejaeva et al., 1997).

Quando le blastocisti entrano in diapausa sono composte da 250-500 cellule (Enders et al., 1986); in questa fase la crescita embrionale, l'assorbimento di liquidi e la replicazione cellulare vengono soppressi (Daniel, 1967). L'arresto dello sviluppo ha inizio nei tratti craniali dell'utero, quando il diametro delle blastocisti è compreso tra 0.2 e 2.0 mm (Stoufflet et al., 1989). Se però l'accoppiamento è avvenuto in ritardo, la durata della diapausa si abbrevia: più tardivo è stato l'accoppiamento, più corta sarà la diapausa (Hansson, 1947; Enders, 1952). Se infatti le femmine si riproducono dopo la metà di marzo, il periodo di diapausa si protrae solo per pochi giorni o è addirittura assente (Stoufflet et al., 1989). La manipolazione del fotoperiodo permette di accorciarne l'estensione fino a 5 giorni o di prolungarla fino a 55 giorni (Hansson, 1947; Murphy and James, 1974; Martinet et al., 1981). L'impianto non è invece correlato con la data in cui è avvenuto l'accoppiamento e non si osserva mai prima della fine di marzo (Stoufflet et al., 1989). Nei primi giorni dopo la riattivazione l'embrione si espande piuttosto lentamente, mentre tra i giorni 9 e 13 il procedimento diviene più rapido (Desmarais et al., 2004). Il meccanismo di accrescimento e l'aumento di volume sembrano imputabili all'assorbimento di liquidi e, a partire dal quinto giorno dopo l'attivazione, anche alla sintesi di nuove proteine (Daniel, 1967). L'inizio della secrezione di progesterone (all'aumentare delle ore di luce) fa riprendere la crescita della blastocisti e quando la sua concentrazione nel sangue è massima, si verifica l'impianto (Stoufflet et al., 1989), ovvero l'adesione embrionale e l'invasione dell'endometrio da parte del trofoblasto (Murphy, 1983). Le concentrazioni plasmatiche di progesterone cominciano a salire 7-10 giorni prima dell'impianto, raggiungono un picco 20 giorni prima del parto, quindi ridiscendono gradualmente a livelli basali (Møller, 1973; Murphy and Moger, 1977; Allais and Martinet, 1978; Einarsson, 1985). Il progesterone determina dunque la fine della diapausa, ma non riesce ad indurre l'impianto da solo, poiché sono probabilmente richiesti altri fattori proteici o steroidei. Tuttavia, durante la diapausa e l'impianto, le concentrazioni plasmatiche di estrone ed estradiolo non aumentano (Stoufflet et al., 1989), mentre un lieve

incremento degli estrogeni si riscontra nel furetto 5 giorni prima dell'impianto (Mead and McRae, 1982). Anche nel tasso, la cui diapausa si protrae per 10 mesi, non sembrano esserci variazioni della secrezione episodica di estradiolo in prossimità dell'impianto (Mondain-Monval et al., 1980). Al contrario, visone e moffetta mostrano diminuite concentrazioni di estradiolo, forse determinate dalla fine della crescita follicolare conseguente all'avvio della secrezione di progesterone (Martinet et al., 1981). Questa diminuzione non rispecchia la costante produzione da parte dell'ovaio e ciò può essere causato da una variazione del metabolismo nel corso della gestazione o dall'impossibilità di datare con precisione lo stadio della gestazione in base alle dimensioni della blastocisti (Stoufflet et al., 1989). La cellula luteale che sintetizza progesterone è inoltre capace di produrre androgeni e di convertirli in estrogeni (come manifestato anche dai corpi lutei di tasso, moffetta e furetto). Il tessuto luteale del visone produce più estrone che estradiolo (al contrario del furetto) e, come nel ratto, l'LH intensifica la produzione di androgeni. Durante gli ultimi stadi di crescita della blastocisti, aumenta la produzione di DHA (acido docosaesaenoico, acido grasso omega-3, polinsaturo) e degli ormoni steroidei androstenedione ed estrone. Il tessuto non luteale potrebbe accrescere la produzione di estradiolo, il quale però non sembra riuscire ad indurre l'impianto né nel visone, né in furetto e tasso. Il ruolo dell'estrone è quello di prolungare la durata della gestazione e quindi, probabilmente, anche della diapausa (Stoufflet et al., 1989). Il tessuto non luteale secerne androgeni ed estrogeni per tutta la diapausa e l'impianto: nei primi stadi, esso contiene sia follicoli in crescita che tessuto interstiziale, il quale si preserva anche una volta iniziata la secrezione di progesterone (Martinet et al., 1981). In seguito, è stato scoperto che il corpo luteo produce una proteina, che potrebbe essere il fattore necessario per l'impianto (Mead et al., 1988). Gli estrogeni partecipano comunque a questo processo, presumibilmente preparando le corna uterine (Stoufflet et al., 1989).

Le concentrazioni plasmatiche di progesterone subiscono un rapido innalzamento se alle femmine di visone viene somministrata quotidianamente della prolattina

dal settimo giorno dopo l'accoppiamento. Tutto ciò succede con un anticipo di 10 giorni rispetto alle femmine non trattate, nelle quali anche il parto risulta posticipato di una settimana. Le concentrazioni plasmatiche di prolattina aumentano costantemente da 4 a 24 ng ml⁻¹ tra i giorni 3 e 38-48 di gestazione, attestandosi circa attorno ai 10 ng ml⁻¹ al momento dell'impianto (Martinet et al., 1981).

Nelle femmine che hanno subito ipofisectomia, l'iniezione di prolattina provoca l'attivazione del corpo luteo e l'impianto (Murphy, 1983). L'azione della prolattina è inibita dalla dopamina: agonisti di quest'ultima sono gli alcaloidi contenuti nella segale cornuta, che agiscono sull'ipofisi bloccando la secrezione di prolattina e, conseguentemente, l'attivazione luteale (Fluckiger, 1978). Esistono degli alcaloidi sintetici, come la bromocriptina (Papke et al., 1980; Martinet et al., 1981), che aumentano tale effetto, ma vi sono pure degli agenti farmacologici che antagonizzano l'azione della dopamina al fine di ottenere l'esito opposto, cioè una maggiore liberazione di prolattina (Murphy, 1983). Nel ratto, questo scopo è assolto da sostanze quali domperidone (antiemetico, causa rilascio a breve termine di prolattina, sia in vivo che in vitro (Carter et al., 1982)) e pimozide (farmaco neurolettico, antipsicotico, aumenta i livelli di prolattina circolante (Ojeda et al., 1974)). Il pimozide funge dunque da antagonista dopaminico, stimolando la liberazione di prolattina endogena e quindi l'attivazione del corpo luteo, indicata dalla maggiore secrezione di progesterone. Nel visone, determina impianto embrionale precoce, accorciando la diapausa di circa 10 giorni: questo è un bene, poiché pare che aumenti la sopravvivenza degli embrioni (Murphy, 1983). Se gli animali si accoppiano due volte a distanza di una settimana, il successo riproduttivo è dell'85%; se invece c'è stato un solo accoppiamento, il tasso si riduce, attestandosi attorno al 40% o meno (Murphy, 1979).

5.2. Moffetta (*Spilogale putorius* – Linnaeus, 1758)

Nel lasso di tempo compreso tra ottobre e marzo, mentre la blastocisti è quiescente, il suo diametro si espande lentamente, passando da circa 0.4 a 1.1 mm,

come conseguenza del graduale ma costante aumento del numero delle cellule del trofoblasto (Mead, 1968; Fazleabas et al., 1984). Come anche nelle altre specie prese in considerazione, il numero di cellule della massa cellulare interna rimane invece invariato (Mead, 1968). Osservando l'utero di moffette in diapausa, è possibile notare alcuni tratti distintivi, sebbene il suo aspetto e le sue dimensioni siano simili a quelli di animali in anestro. Una di queste peculiarità è l'epitelio che riveste l'endometrio, il quale si presenta cilindrico e non cuboidale; inoltre, le ghiandole uterine appaiono maggiormente sviluppate (Mead, 1968; Sinha and Mead, 1976).

Il momento della riattivazione embrionale è segnalato dall'iperemia uterina, che inizia a manifestarsi pressappoco 20-25 giorni prima dell'impianto e si fa via via più pronunciata; a tale sintomo si accompagna poi l'aumento del diametro uterino, che precede l'impianto di circa 3 giorni (Mead et al., 1979).

La blastocisti riprende quindi ad accrescersi verso fine marzo o i primi di aprile e in concomitanza ricomincia la sintesi proteica e di RNA, nonché l'attività mitotica della massa cellulare interna (Rourke and Mead, 1982; Enders et al., 1986). Tra i cambiamenti ultrastrutturali dell'embrione, accompagnati da modificazioni istologiche a livello di corpo luteo, si possono citare l'acquisizione di poliribosomi, mitocondri e reticolo endoplasmatico rugoso da parte del trofoblasto e della massa cellulare interna (Enders et al., 1986), come pure l'incrementata sintesi e secrezione di proteine da parte dell'utero stimolato dal progesterone (Mead et al., 1979). In aggiunta, le cellule del trofoblasto divengono cuboidali e i nucleoli si ingrandiscono, viene prodotto più rRNA che mRNA, verosimilmente per far fronte all'intensa sintesi proteica (Mead and Rourke, 1985). Durante le fasi precoci dell'attivazione, le dimensioni della blastocisti si espandono da 1.2 a 1.6 mm e si forma lo strato endodermico, mentre nelle 24-48 ore precedenti l'impianto essa si accresce rapidamente sino a raggiungere i 2.1 mm (Enders et al., 1986). Un po' di tempo prima dell'annidamento si verifica inoltre un aumento dei livelli di progesterone periferico, che in questo stadio oscillano da 6 a 12 ng/ml (Mead and Eik-Nes, 1969), mentre per i primi 10 giorni successivi

all'impianto essi possono anche superare i 20 ng/ml. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che il progesterone e l'attività luteale risultano più elevati se gli animali vengono esposti a 14 ore di luce al giorno. La mancanza di luce, comunque, comporta solamente un ritardo dell'annidamento, senza compromettere né questo né lo sviluppo embrionale, che prosegue. Anche mantenendo le moffette costantemente al buio non si riesce ad interferire o a modificare la stagione riproduttiva, ma solo ad allungare leggermente la durata della gestazione (Mead, 1971).

5.3. Tasso (*Meles meles* – Linnaeus, 1758)

Il tasso è un animale prevalentemente notturno e vive in gruppi sociali di cui fanno parte fino a 30 individui, che condividono una rete di tunnel e camere sotterranee (Neal and Cheeseman, 1996). Le femmine sono fisiologicamente ricettive per gran parte dell'anno ma, grazie alla diapausa, la data d'impianto risulta sincronizzata indipendentemente da quando è avvenuta la fecondazione e i parti si concentrano verso la fine dell'inverno e l'inizio della primavera. Circa 8-10 settimane più tardi i piccoli, che in media sono 3, escono dalla tana. Si pensa che nel tasso, come nel visone, ci siano casi di superfetazione (fenomeno in cui più maschi fecondano le uova di distinte ovulazioni; il secondo corredo di uova viene generalmente ovulato e fertilizzato quando la prima gravidanza è già in corso, indipendentemente dall'esito del parto). La superfetazione è un evento raro nei Mammiferi Euteri e di solito non comprende diapausa (Yamaguchi et al., 2006). Le femmine traggono diversi benefici dall'accoppiarsi con più partner, non ultimi i vantaggi derivanti da una maggiore variabilità genetica della cucciolata e dal mascheramento della paternità della prole per proteggerla da potenziali casi di infanticidio ad opera dei maschi (Wolff and Macdonald, 2004).

Ciò porta a pensare che si tratti di un fenomeno adattativo e geneticamente determinato, probabilmente correlato a fattori ambientali quali fotoperiodo e temperatura: infatti, la ripresa dello sviluppo embrionale in inverno fa sì che i cuccioli nascano durante la stagione più favorevole, la primavera (Canivenc and

Bonnin, 1979). I livelli di progesterone si mantengono bassi quando la funzione luteale è assente, ovvero da febbraio a giugno (Canivenc et al., 1966) (ma soprattutto a maggio, giugno e luglio), poi però salgono e si mantengono elevati durante i mesi di luglio, agosto e settembre (Bonnin et al., 1978). Il progesterone pare avere origine ovarica e influenzare l'utero, che comincia ad assumere un aspetto secretorio. Anche prima dell'impianto le concentrazioni di progesterone aumentano, riflettendo l'accentuata attività luteale e facendo terminare la diapausa (Bonnin et al., 1978). Tuttavia, il progesterone non è sufficiente ad indurre l'impianto, come dimostrato attraverso la sua somministrazione a femmine di tasso intere e ovariectomizzate, e potrebbero quindi essere coinvolti altri fattori (Canivenc and Laffargue, 1958).

5.4. Orso bruno (*Ursus arctos* – Linnaeus, 1758)

Le femmine di orso bruno devono affrontare un notevole dispendio energetico se partoriscono durante il letargo, quando normalmente sono a digiuno, e allattano per 2-3 mesi prima di uscire dalla tana (Farley and Robbins, 1995). Accudire la prole richiede anche consumo di lipidi, proteine e minerali, per cui la condizione corporea delle madri e le riserve accumulate devono essere tali da consentirgli di far fronte a tali requisiti (Hilderbrand et al., 2000).

Le dimensioni corporee della madre incidono quindi positivamente su quelle dei giovani orsi di un anno, la cui massa è però anche correlata alla grandezza della cucciolata e diminuisce man mano che questa si accresce. La massa di questi animali risente poi della densità di popolazione perché, se essa aumenta, lo fa anche la competizione per il cibo: la disponibilità e qualità delle risorse limitano la crescita degli orsi. È più probabile che le madri si prendano cura dei cuccioli oltre l'anno di vita, se essi hanno una massa corporea minore e le loro chance di sopravvivenza sono più basse rispetto ai loro coetanei più pesanti.

Dimensioni maggiori sono sempre favorevoli, poiché riducono la possibilità di essere catturati ed uccisi, rendono inoltre i maschi più competitivi ed in grado di prevalere, dominare ed escludere i più piccoli (Dahle et al., 2006).

A tal proposito, bisogna ricordare che la principale causa di mortalità degli orsi di un anno è dovuta alla loro uccisione ad opera dei maschi adulti (Swenson et al., 1997), pratica che le femmine cercano di evitare accoppiandosi con più partner, in modo da rendere la paternità dei cuccioli incerta (Hrdy, 1979; Ebensperger, 1998). A tal fine le femmine, che normalmente vivono in gruppi matriarcali con altre femmine imparentate, quando sono in calore possono compiere degli spostamenti per aumentare le opportunità di incontrare potenziali compagni, tra cui selezionare il più adatto. Una volta partorito, i territori occupati dalle femmine si ridimensionano e si fanno più ristretti, forse anche per proteggere i cuccioli e limitare il rischio di perderli (Dahle and Swenson, 2003). La modificazione delle aree occupate può poi rispecchiare il cambiamento delle abitudini alimentari nel corso dell'anno (Dahle et al., 1998). Le cucciolate delle primipare sono di solito meno numerose e più soggette a casi di infanticidio, per la minore esperienza e capacità delle madri di difendere la propria prole. La riproduzione è comunemente soppressa nelle giovani femmine (generalmente si accoppiano per la prima volta a 3 anni), ma ciò non vale per quelle che disperdono al di fuori dell'home range, che invece si accoppiano prima. Solo le femmine si occupano delle cure della prole e non si riproducono prima che i cuccioli siano svezzati, il che rende gli intervalli interparto piuttosto lunghi e variabili (Dahle and Swenson, 2003).

5.5. Capriolo (*Capreolus capreolus* – Linnaeus, 1758)

Anche la diapausa del capriolo è caratterizzata da una minima attività mitotica del trofoblasto, completamente assente nella massa cellulare interna, che rimane perciò indifferenziata (Aitken et al., 1975). Durante la diapausa, la blastocisti passa da 1 a 5 mm circa ed è libera di migrare all'interno del lume uterino (Aitken et al., 1974a). L'entrata in diapausa avviene quando la blastocisti è formata da 20-30 cellule (Lambert et al., 2001) e all'epoca della riattivazione ha raggiunto approssimativamente lo stadio a 100 cellule (Lange et al., 1998). Essa si conclude infine quando le giornate cominciano ad allungarsi, poco dopo il solstizio d'inverno, facendo pensare ad un coinvolgimento del fotoperiodo, quale

segnale ambientale che può influire sulla ripresa dello sviluppo embrionale, modificando il sistema riproduttivo della madre.

Ciononostante, il processo non risulta condizionato dall'esposizione degli animali ad un fotoperiodo modificato, il quale però determina un anticipo nell'epoca della muta. Per questo motivo, si è portati a pensare che il decorso della diapausa dipenda da una sorta di ritmo endogeno che lega il momento dell'impianto alla data del concepimento (Lincoln et al., 1972). Pare infatti che l'embrione sia dotato di una specie di "orologio interno", il quale fa iniziare la trascrizione di geni specifici nella massa cellulare interna. Tali geni trascrivono l'mRNA che codifica per PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein = Glicoproteina Associata alla Gravidanza) da parte delle cellule del trofoblasto che circondano la blastocisti e in seguito formeranno la placenta. La peculiarità di questa PAG è che il suo profilo genetico è molto diverso da quello delle PAG di altre specie simili. Il suo bersaglio sono dei recettori endometriali, cui si lega permettendo alla madre di ricevere il messaggio: a questo punto si innesca un effetto a cascata, che comprende il rilascio di estrogeni. Così inizia la seconda parte della gestazione, contrassegnata dal rapido allungamento embrionale, che si protrae per 10-25 giorni e si conclude con l'adesione placentare e il proseguimento della crescita fetale (www.roedeer.com).

Verosimilmente, il basso tasso di divisione cellulare nel corso della diapausa (solo 1 cellula su 1000 in divisione a inizio dicembre) condiziona anche la formazione della cromatina sessuale, che però procede in modo graduale nonostante le secrezioni endometriali siano assenti fino a gennaio. Il fatto che a metà dicembre l'82% delle cellule sia positivo alla cromatina sessuale testimonia che essa si forma già prima dell'impianto (Aitken, 1974b).

Valutando le dimensioni, il contenuto di progesterone e l'aspetto istologico del corpo luteo di capriolo si può concludere che esso è attivo nel corso della diapausa, contrariamente a quello di altri animali, che si "risveglia" solo poco prima dell'impianto (Sempéré, 1977). Tale attività dei corpi lutei sembrerebbe spiegare perché nell'endometrio di capriolo si rilevano alti livelli di zinco, forse

necessario per il legame degli ormoni steroidei (in particolare 17- β estradiolo) a recettori endometriali (Aitken, 1974c).

In aggiunta, le femmine non gravide esibiscono corpi lutei funzionanti per i 5 mesi corrispondenti alla lunghezza della diapausa, che poi regrediscono quando nelle femmine gravide si ha la riattivazione (Lambert et al., 2001). Da questo momento, i corpi lutei delle femmine non gravide vanno incontro a degenerazione; se invece è presente un embrione, l'ambiente uterino si modifica per permettergli di accrescersi, prolungando la vita funzionale del corpo luteo stesso (Aitken et al., 1973). In ogni caso la blastocisti mantiene, per mezzo dei corpi lutei e sino alla fine di dicembre, un ambiente uterino ottimale e non vi sono differenze sostanziali nemmeno nelle concentrazioni periferiche di progesterone, che restano costanti durante la diapausa per poi salire dopo l'impianto, come fanno anche gli estrogeni (Lambert et al., 2001).

Le concentrazioni di progesterone plasmatico sono praticamente trascurabili negli esemplari maschi, nelle giovani femmine e in quelle adulte ovariectomizzate, mentre divengono rilevanti nelle femmine adulte, soprattutto in corrispondenza dell'allungamento e presunta adesione embrionale, quando raggiungono i 3.90 ± 1.85 ng/ml (contro il valore medio di 2.60 ± 0.66 ng/ml della diapausa). Questo incremento del progesterone non causa la crescita embrionale, ma piuttosto ne è il risultato (Sempéré, 1977). La riattivazione non utilizza quindi progesterone ed estradiolo come innesco ormonale materno, però l'attività secretoria della blastocisti aumenta anch'essa, producendo quella specifica PAG che sembrerebbe dare avvio ad una risposta da parte dell'endometrio (Lambert et al., 2001).

Studiando l'ultrastruttura del trofoblasto durante la diapausa si osserva che esso è rivestito da microvilli ramificati e presenta delle inclusioni elettrone-dense o granulari nel citoplasma, mentre mancano mitocondri, ribosomi, apparato del Golgi e reticolo endoplasmatico (Aitken, 1975). Le dimensioni e il numero dei microvilli si riducono quando inizia la rapida crescita embrionale (anche nel ratto e nel topo), presumibilmente al fine di favorire l'intima apposizione ed adesione

dell'embrione all'epitelio uterino. Le inclusioni potrebbero racchiudere materiale derivante dal lume uterino e scompaiono negli stadi più avanzati della diapausa; inoltre il trofoblasto accoglie numerose goccioline lipidiche (Aitken et al., 1973). Nel lume uterino, un po' alla volta, si accumula una sostanza secreta dalle ghiandole endometriali che, forse stimolate dagli estrogeni, la rilasciano a gennajo affinché induca e supporti l'allungamento embrionale. Da ciò si deduce che le ghiandole endometriali controllano la crescita della blastocisti (Aitken, 1974a). L'allungamento è contraddistinto da alcuni cambiamenti: l'altezza dei microvilli diminuisce, le inclusioni scompaiono e gli organelli si sviluppano per supportare la maggiore attività cellulare. Infine, durante gli ultimi stadi dell'allungamento e sotto lo stimolo degli estrogeni, pare che l'endometrio liberi delle vescicole chiare dall'epitelio ghiandolare e duttale, nonché delle secrezioni apocrine ed olocrine (Aitken, 1975). L'incrementata concentrazione plasmatica di estrogeni e permeabilità dei capillari endometriali è sottolineata dal marcato edema che contraddistingue l'endometrio durante il rapido accrescimento embrionale.

È plausibile che il prodotto delle ghiandole endometriali sia ricco in calcio; quest'ultimo potrebbe però anche derivare dalla trasudazione di liquidi dai capillari endometriali, la cui permeabilità cresce, assieme alle concentrazioni di calcio ed estrogeni, proprio in corrispondenza dell'allungamento embrionale. Diversamente si può dire per le concentrazioni di zinco, che calano leggermente forse in seguito al richiamo di acqua nei tessuti prodotto dall'edema (Aitken, 1974c).

Sia i maschi che le femmine di capriolo traggono beneficio dal fatto che gli accoppiamenti siano anticipati all'estate. I primi ne risultano avvantaggiati poiché gli consente di recuperare, durante l'autunno, una condizione corporea adeguata per affrontare la stagione invernale: essi infatti, dovendo occuparsi della difesa del territorio e muovendosi quindi maggiormente, hanno meno tempo a disposizione da dedicare all'alimentazione e subiscono dunque un considerevole calo di peso durante il periodo riproduttivo (Flint and Krzywinski, 1997). D'altro canto, è utile anche alle femmine allattanti, il cui fisico risente del tasso metabolico

evidentemente più elevato, soprattutto nei 3 mesi successivi al parto (Mauget et al., 1997).

I fattori che influenzano ed incidono sul successo riproduttivo delle femmine di capriolo sono riassumibili come segue:

- la condizione corporea della madre determina il livello di poliovulazione e, conseguentemente, le dimensioni della cucciolata;
- l'età della madre diviene irrilevante una volta che essa ha raggiunto i 15 mesi e quindi la maturità sessuale. Tuttavia le femmine sottili, a fronte della loro minore massa corporea, producono di norma meno corpi lutei; inoltre, man mano che esse invecchiano, il numero di blastocisti fertilizzate che si impiantano con successo si riduce progressivamente, specialmente oltre i 7 anni;
- disfunzioni fisiologiche (ad esempio, blastocisti multiple che interferiscono tra loro) possono determinare il fallimento dell'impianto, che spesso riguarda l'intera cucciolata;
- condizioni climatiche particolarmente avverse, agendo sulla quantità e qualità di risorse alimentari disponibili, possono anch'esse condurre ad un esito negativo dell'impianto. La diapausa fornirebbe dunque la possibilità di adeguare lo sforzo riproduttivo alle condizioni ambientali (Hewison and Gaillard; 2001).

5.6. Uomo

Negli animali, come precedentemente sottolineato, la diapausa è solitamente la conseguenza di fattori di stress fisiologici (fotoperiodo, lattazione), mentre è meno probabile che si verifichino stress psicologici (Ptak et al., 2013).

Al contrario, negli uomini, la principale causa di impianto ritardato è correlata agli stress psicologici e alla pratica di fumare marijuana o nicotina (Dey et al., 2004; Campagne, 2006). Tutti questi fattori di stress agiscono attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, portando a disfunzione luteale e alterando di conseguenza la recettività uterina oppure attraverso l'asse

ipotalamo-ipofisi-surrene, bloccando direttamente la ricettività dell'utero (Kondoh et al., 2009). I meccanismi di questo blocco sono simili in tutte le specie: in risposta ai fattori di stress, vengono prodotti elevati livelli di glucocorticoidi (Arck et al., 2007). Questi ormoni, a loro volta, mediano la sotto-espressione delle gonadotropine. Poiché le gonadotropine sono essenziali per lo stabilirsi della ricettività uterina, l'impianto dell'embrione viene compromesso ogni qual volta l'organismo materno è sotto l'azione di fattori stresso geni (Parker and Douglas, 2010).

In uteri umani e di topo poco ricettivi, la concentrazione di anandamide (AEA), cannabinoide endogeno, aumenta di molto. È stato dimostrato che AEA innesca l'arresto reversibile dell'embrione legandosi ai recettori del cannabinoide sulla blastocisti, sia in specie esibenti diapausa (come il topo) che in specie in cui il tratto non compare (come la pecora) (Turco et al., 2008). L'anandamide partecipa alla modulazione delle emozioni e dell'ansia (Kathuria et al., 2003): livelli elevati di cannabinoidi nell'utero umano, secreti in risposta a stress emotivi (o dovuti al fumo di marijuana), possono quindi rendere impossibile l'impianto e la diapausa può essere vista come una naturale conseguenza di questi influssi. All'opposto, pare che negli animali l'impianto ritardato accresca il potenziale di sviluppo embrionale, come dimostrato in diverse specie. Questa accentuata capacità di sviluppo degli embrioni dei Mammiferi esibenti diapausa può essere dovuta alla loro riparazione cellulare durante il periodo di arresto. Si è quindi ipotizzato che l'aumentato numero di aborti spontanei riportato nella specie umana in seguito ad impianto ritardato sia dovuto al fatto che lo stress era presente anche dopo l'impianto. In queste circostanze, il conceptus impiantato, non essendo più in grado di manifestare diapausa, risulta danneggiato dalle condizioni uterine sfavorevoli e la gravidanza si conclude con aborto spontaneo. È meno probabile che una tale circostanza accada negli animali nei quali, una volta che l'allattamento o la stagione sfavorevole alla progressione della gestazione finiscono, l'embrione si accresce senza ulteriori interruzioni (Ptak et al., 2013).

Recenti studi (Lohstroh et al., 2006) sulla specie umana hanno comunque confutato l'associazione dell'impianto ritardato con la perdita della gravidanza.

Per motivi principalmente etici, non è possibile testare sperimentalmente se la diapausa avviene nella donna. Si potrebbe tuttavia approcciare l'argomento usando metodi indiretti (osservazione di pazienti gravide che forniscano campioni di sangue ed urina al fine di misurare gli ormoni dello stress e, in base ad essi, identificare il giorno dell'ovulazione e dell'impianto, nonché l'esito della gravidanza) e diretti (sottoponendo dei primati a fattori stressanti riprodotti sperimentalmente e studiando i loro effetti sui tempi d'impianto).

La misura dell'effettiva data d'impianto attraverso un semplice apparecchio farmaceutico simile a quelli che attualmente misurano la concentrazione di hCG sarebbe di immenso valore, aiutando a ridurre l'incertezza e ad evitare interventi chirurgici inutili. Questi test dovrebbero essere fatti almeno in quelle gravidanze in cui è alto il rischio di complicazioni o di ridotta crescita fetale, come quelle ottenute grazie alla fecondazione assistita. Se il potenziale sviluppo dell'embrione può essere favorito attraverso la diapausa, il fatto di sottoporvi gli embrioni ottenuti mediante riproduzione assistita potrebbe essere suggerito come approccio terapeutico (Ptak et al., 2013).

Sono stati comunque riportati alcuni casi di gravidanze uterine ed ectopiche con comparsa tardiva di hCG (Human Corionic Gonadotropin = gonadotropina corionica umana) e impianto ritardato, che sarebbe però interpretabile con un rallentamento dello sviluppo piuttosto che un arresto temporaneo quale quello che contraddistingue la diapausa (Tarín and Cano, 1999). In gravidanze ottenute mediante fecondazione *in vitro*, può infatti capitare che l'hCG sierico compaia con 3-4 giorni di ritardo rispetto al normale (Englert et al., 1984). Tale condizione potrebbe anche originare da differenze transitorie dei tassi di sviluppo degli embrioni, quando questi si trovano a dover affrontare condizioni non ottimali, sfavorevoli o stressanti.

Il fatto che gli embrioni umani possano entrare in diapausa prima dell'impianto sarebbe invece testimoniato da quelle gravidanze che terminano con la nascita di

feti piuttosto piccoli per la loro età gestazionale. Certamente non è facile stabilirne le motivazioni, anche perché è un tratto multifattoriale, e il temporaneo arresto dello sviluppo non va escluso, ma anzi preso in considerazione. Se, come avviene in altre specie, gli embrioni umani si accrescessero durante la diapausa, allora potrebbe essere indotta artificialmente e addirittura auspicabile, come nei seguenti casi:

- in seguito a procedure di gelo-disgelo, biopsie o altre pratiche sperimentali che tendono a far diminuire il numero di cellule o il tasso di divisione degli embrioni, per minimizzarne i potenziali danni e aumentare la vitalità degli stessi;
- dopo il trasferimento uterino di embrioni ottenuti tramite fecondazione *in vitro*, per alzare i tassi di impianto;
- quando la ricettività endometriale non è ideale, per mantenere gli embrioni quiescenti finché vengono ripristinate condizioni favorevoli all'impianto.

Osservare poi il manifestarsi della diapausa, servirebbe a capire meglio i meccanismi e i fattori che intervengono nel processo ed incidono sull'endometrio o sullo stesso conceptus (Tarín and Cano, 1999).

6. CONCLUSIONI

Da quanto esposto appare evidente che la diapausa embrionale assicura notevoli benefici alle specie che la esibiscono, creando e favorendo le condizioni adatte a migliorare il successo riproduttivo, agevolando in tal modo sia le madri che i neonati.

I meccanismi coinvolti nella sua regolazione fanno capo ad fattori simili, anche se intervengono nel processo innescando risposte e producendo effetti diversi nelle varie specie.

Talvolta gli esperimenti forniscono esiti discordanti o non completamente chiari e necessitano quindi di ulteriori indagini, in modo da confermare o confutare quanto già scoperto ed acquisire nuove conoscenze in merito all'argomento.

Rimangono dunque degli interrogativi ancora aperti, ma molto è già stato spiegato e ha permesso di far luce su parecchi degli aspetti ricorrenti della diapausa.

Si ipotizza che possa avvenire in numerose altre specie, mentre tante di quelle che presumibilmente esibivano questo processo l'hanno perso nel corso dell'evoluzione, una volta venutesi a creare le condizioni ambientali favorevoli, per cui la diapausa non si rende più necessaria.

Ciononostante, nelle specie in cui persiste, riveste un ruolo di grande importanza per la loro conservazione, contribuendo indubbiamente alla diffusione che esse hanno raggiunto.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aitken RJ (1974a). Delayed Implantation in Roe deer (*Capreolus capreolus*). J. Reprod. Fert., 39, 225-233.
2. Aitken RJ (1974b). Sex chromatin formation in the blastocyst of the Roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. J. Reprod. Fert. 40, 235-239.
3. Aitken RJ (1974c). Calcium and zinc in the endometrium and uterine flushings of the Roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. J. Reprod. Fert. 40, 333-340.
4. Aitken RJ (1975). Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the Roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. J. Anat. 119, 2, 369-384.
5. Aitken RJ, Burton J, Hawkins J, Kerr-Wilson R, Short RV, Steven DH (1973). Histological and ultrastructural changes in the blastocyst and reproductive tract of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. J. Reprod. Fert. 34, 481-493.
6. Alexandre H (1978). Effect of inhibitors of polyamine biosynthesis on primary differentiation of mouse egg. C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D. 286, 1215-1217.
7. Allais C, Martinet L (1978). Relation between day-light ratio, plasma progesterone levels and timing of nidation in mink (*Mustela vison*). J. Reprod. Fert. 54, 133-136.

8. Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J (2007). Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 58, 268–279.
9. Bardocz S (1993). The role of dietary polyamines. *Eur J. Clin. Nutr.* 47, 683–690.
10. Bastida CM, Cremades A, Castells MT, López-Contreras AJ, López-García C, Tejada F, Peñafiel R (2005). Influence of ovarian ornithine decarboxylase in folliculogenesis and luteinization. *Endocrinol.* 146, 666–674.
11. Bonnin M, Canivenc R, Ribes CL (1978). Plasma progesterone levels during delayed implantation in the European badger (*Meles meles*). *J. Reprod. Fert.* 52, 55-58.
12. Campagne DM (2006). Should fertilization treatment start with reducing stress? *Hum. Reprod.* 21, 1651–1658.
13. Canivenc R, Bonnin M (1979). Delayed implantation is under environmental control in the badger (*Meles meles*). *Nature* 278, 849-850.
14. Canivenc R, Laffargue M (1957). Relation des corps jaunes et des blastocystes au cours de la nidation différée du Blaireau européen (*Meles meles*). *L. C. r. Séanc. Soc. Biol.* 151, 561-564.
15. Canivenc R, Laffargue M (1958). Action des différents équilibres hormonaux sur la phase de vie libre de l'oeuf fécondé chez le Blaireau européen (*Meles meles*). *L. C. r. Séanc. Soc. Biol.* 152, 58-61.

16. Canivenc R, Short RV, Bonnin-Laffargue M (1966). Etude histologique et biochimique du corps jaune du Blaireau européen (*Meles meles*). L. Annls Endocr. 27, 401-413.
17. Carter DA, Pennington JM, Whitehead SA (1982). *In-vivo* and *in-vitro* effects of domperidone on the release of prolactin and LH in male and female rats. J. Reprod. Fert. 64, 191-197.
18. Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK (1996). Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. J. Mol. Endocrinol. 16, 107-22.
19. Chang MC (1968). Reciprocal insemination and egg transfer between ferrets and mink, J. Exp. Zool. 168, 49-55.
20. Dahle B, Sørensen OJ, Wedul H, Swenson JE, Sandegren F (1998). The diet of brown bears in central Scandinavia: effect of access to free-ranging domestic sheep. Wildl. Biol. 3, 147-158.
21. Dahle B, Swenson JE (2003). Seasonal range size in relation to reproductive strategies in Brown bears (*Ursus arctos*). J. Anim. Ecol. 72, 660-667.
22. Dahle B, Zedrosser A, Swenson JE (2006). Correlates with body size and mass in yearling brown bears. J. Zool. 269, 273-283.
23. Daniel JC Jr (1967). Studies on the growth of the mink blastocyst. J. Embryol. Exp. Morphol. 17, 293-302.

24. Daniel JC Jr (1970). Dormant embryos of mammals. *BioScience* 20 (7), 411-415.
25. Desmarais JA, Bordignon V, Lopes FL, Smith LC, Murphy BD (2004). The escape of the Mink embryo from obligate diapause. *Biol. Reprod.* 70, 662-670.
26. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H (2004). Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* 25, 341-373.
27. Dickman Z, DeFeo VJ (1967). The rat blastocyst during normal pregnancy and during delayed implantation, including an observation on the shedding of the zona pellucid. *J. Reprod. Fert.* 13, 3-9.
28. Douglas DA, Houde A, Song JH, Farookhi R, Concannon PW, Murphy BD (1998a). Luteotropic hormone receptors in the ovary of the mink (*Mustela vison*) during delayed implantation and early-postimplantation gestation. *Biol Reprod* 59, 571-578.
29. Douglas DA, Song J-H, Moreau GM, Murphy BD (1998b). Differentiation of the corpus luteum of the Mink (*Mustela vison*): mitogenic and steroidogenic potential of luteal cells from embryonic diapause and postimplantation gestation. *Biol. Reprod.* 58, 1163-1169.
30. Ebensperger LA (1998). Strategies and counterstrategies to infanticide in mammals. *Biol. Rev.* 73, 321-346.
31. Einarsson EJ (1985). The time of increase in plasma progesterone during pregnancy in mink (*Mustela vison*). *Theriogenology* 24, 375-383.

32. Enders RK (1952). Reproduction in the mink (*Mustela vison*). Proc. Am. Phil. Soc. 96, 691-755.
33. Enders AC, Mead RA (1996). Progression of trophoblast into the endometrium during implantation in the Western spotted skunk. Anatomical Record. 244, 297-315.
34. Enders AC, Schlafke S, Hubbard NE, Mead RA (1986). Morphological changes in the blastocyst of the Western spotted skunk during activation from delayed implantation. Biol. Reprod. 34, 423-437.
35. Englert Y, Roger M, Belaisch-Allart J et al. (1984). Delayed appearance of plasmatic chorionic gonadotropin in pregnancies after *in vitro* fertilization and embryo transfer. Fertil. Steril. 42, 835-838.
36. Farley SD, Robbins CT (1995). Lactation, hibernation, and mass dynamics of American black bears and grizzly bears. Canadian J. Zool. 73, 2216-2222.
37. Fazleabas AT, Mead RA, Rourke AW, Roberts RM (1984). Presence of an inhibitor of plasminogen activator in uterine fluid of the Western spotted skunk during delayed implantation. Biol. Reprod. 30, 311-322.
38. Fletcher TP, Jetton AE, Renfree MB (1988). Influence of progesterone and oestradiol-17 β on blastocysts of the tammar wallaby during seasonal diapause. J. Reprod. Fertil. 83, 193-200.
39. Flint APF, Krzywinski A (1997). Sex differences in time budgeting in Roe deer during the rut. Acta Theriologica 42 (3), 313-320.

40. Flint APF, Krzywinski A, Semp AJ, Mauget R, Lacroix A (1994). Luteal oxytocin and monoestry in the Roe deer (*Capreolus capreolus*). J. Reprod. Fert. 101, 651-656.
41. Fluckiger E (1978). Effects of bromocryptine on the hypothalamo-pituitary axis. Acta Endocrinol. Suppl. 216, 111-117.
42. Foresman KR, Mead RA (1973). Duration of post-implantation in a Western subspecies of the spotted skunk (*Spilogale putoi*). J. Mammal. 54, 521-523.
43. Foresman KR, Mead RA (1978). Luteal control of nidation in the Ferret (*Mustela putorius*). Biol. Reprod. 18 490-496.
44. Fozard JR, Part ML, Prakash NJ, Grove J, Schechter PJ, Sjoerdsma A, Koch-Weser J (1980). L-Ornithine decarboxylase: an essential role in early mammalian embryogenesis. Science. 208, 505-508.
45. Fujiwara K, Bai G, Kitagawa T, Tsuru D (1998). Immunoelectron microscopic study for polyamines. J. Histochem. Cytochem. 46, 1321-1328
46. Gerlitz G (2010). HMGNs, DNA repair and cancer. Biochim. Biophys. Acta. 1799, 80-85.
47. Given RL, Weitlauf HM (1981). Resumption of DNA synthesis during activation of delayed implanting mouse blastocysts. J. Exp. Zool. 218, 253-259.

48. Gulyas BJ, Daniel JC (1967). Oxygen consumption in diapausing blastocysts. *J. Cell. Physiol.* 70, 33-36.
49. Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK (2004). Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *PNAS.* 101, 10326–10331.
50. Hansson A (1947). The physiology of reproduction in mink (*Mustela vison* Schreb.) with special reference to delayed implantation. *Acta Zool.* 28, 1-136.
51. Hewison AJM, Gaillard JM (2001). Phenotypic quality and senescence affect different components of reproductive output in Roe deer. *J Anim. Ecol.* 70, 600-608.
52. Hilderbrand GV, Schwartz CC, Robbins CT, Hanley TA (2000). Effect of hibernation and reproductive status on body mass and condition of coastal Brown bears. *J. Wildl. Manage.* 64(1), 178-183.
53. Hrdy SB (1979). Infanticide among animals: a review, classification and examination of the implications for the reproductive strategies of females. *Ethology and Sociobiology.* 1, 1–13.
54. Huang JL, Powell M, Mead RA (1993). Luteal protein secretion during preimplantation in the ferret. *Biol Reprod* 48, 647–654.
55. Johnson DC, Chatterjee S (1993). Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J. Reprod. Fert.* 99, 557–559.

56. Kaipia A, Toppari J, Mali P, Kangasniemi M, Alcivar AA, Hecht NB, Parvinen M (1990). Stage- and cell-specific expression of the ornithine decarboxylase gene during rat and mouse spermatogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 73, 45–52.
57. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* 9, 76–81.
58. Kondoh E, Okamoto T, Higuchi T, Tatsumi K, Baba T, Murphy SK, Takakura K, Konishi I, Fujii S (2009). Stress affects uterine receptivity through an ovarian-independent pathway. *Hum. Reprod.* 24, 945–953.
59. Kostal V, Shimada K, Hayakawa Y (2000). Induction and development of winter larval diapause in a drosophilid fly (*Chymomyza costata*). *J. Insect Physiol.* 46, 417–428.
60. Lambert RT, Ashworth CJ, Beattie L, Gebbie FE, Hutchinson JSM, Kyle DJ, Racey PA (2001). Temporal changes in reproductive hormones and conceptus–endometrial interactions during embryonic diapauses and reactivation of the blastocyst in European Roe deer (*Capreolus capreolus*). *Reproduction* 121, 863–871.
61. Lane ME, Sauer K, Wallace K, Jan YN, Lehner CF, Vaessin H (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell.* 87, 1225–1235.
62. Lange A, Broich A, Gilles M, Hermes R, Glatzel P, Hildebrandt T, Goëritz F (1998). New approaches to embryonic development in European roe

- deer (*Capreolus capreolus*) using embryo transfer. J. Reprod. Fert. Abstract Series 22 33 (Abstract).
63. Lefèvre PLC, Palin MF, Beaudry D, Dobias-Goff M, Desmarais JA, Llerena VEM, Murphy BD (2011). Uterine signaling at the emergence of the embryo from obligate diapauses. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Vol. 300, no. E800–E808.
64. Lefèvre PLC, Palin MF, Chen G, Turecki G, Murphy BD (2011). Polyamines are implicated in the emergence of the embryo from obligate diapause. Endocrinol. 152, 1627-1639.
65. Lincoln GA, Guinness FE (1972). Effect of altered photoperiod on delayed implantation and moulting in Roe deer. J. Reprod. Fert. 31, 455-457.
66. Lohstroh P, Dong H, Chen J, Gee N, Xu X, Lasley B (2006). Daily immunoactive and bioactive human chorionic gonadotropin profiles in periimplantation urine samples. Biol. Reprod. 75, 24–33.
67. Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD (2004). Embryonic diapause and its Regulation. Reproduction 128, 669-678.
68. Louie DF, Gloor KK, Galasinski SC, Resing KA, Ahn NG (2000). Phosphorylation and subcellular redistribution of high mobility group proteins 14 and 17, analyzed by mass spectrometry. Protein Sci. 9, 170–179.
69. Marois G (1982). Inhibition of nidation in mice by modification of the environment and pheromones. Re-establishment by prolactin and thioproperazine. Ann. Endocrinol. 43, 41–52.

70. Martinet L, Allais C, Allain D (1981). The role of prolactin and LH in luteal function and blastocyst growth in mink (*Mustela vison*). J. Reprod. Fert. 29, 119-130.
71. Mauget C, Mauget R, Sempéré A (1997). Metabolic rate in female European roe deer (*Capreolus capreolus*), incidence of reproduction. Canadian J. Zool. 75, 731-739.
72. Mead RA (1968). Reproduction in western forms of the spotted skunk (Genus *Spilogale*). J. Mammal. 49, 373-390.
73. Mead RA (1971). Effects of light and blinding upon delayed implantation in the Spotted skunk. Biol. Reprod. 5, 214-220.
74. Mead RA (1993). Journal of Experimental Zoology Special Issue: Comparative gestation and placentation in vertebrates. Part II Vol. 266, Issue 6, 629-641.
75. Mead RA, Eik-Nes KB (1969). Seasonal variation in plasma levels of progesterone in western forms of the spotted skunk. J. Reprod. Fert. 6, 397-403.
76. Mead RA, Joseph MM, Neirinckx S and Berria, M (1988). Partial characterization of a luteal factor that induces implantation in the ferret. Biol. Reprod. 38, 798-803.
77. Mead RA, McRae M (1982). Is estrogen required for implantation in the ferret? Biol. Reprod. 27, 540-547.

78. Mead RA, Rourke AW (1985). Accumulation of RNA during embryonic diapause and the periimplantation period in the western spotted skunk. *J. Exp. Zool.* 235, 65-70.
79. Mead RA, Rourke AW, Swannack H (1979). Changes in uterine protein synthesis during delayed implantation in the western spotted skunk and its regulation by hormones. *Biol. Reprod.* 21, 39-46.
80. Møller OM (1973). Progesterone concentrations in the peripheral plasma of mink (*Mustela vison*) during pregnancy. *J. Endocrinol.* 56, 121-132.
81. Mondain-Monval M, Bonnin M, Canivenc R and Scholler R (1980). Plasma estrogen levels during delayed implantation in the European badger (*Meles meles*). *Gen. comp. Endocr.* 41, 143-149.
82. Murphy BD (1979). Effects of GnRH on plasma LH and fertility in mink. *Can. J. Anim. Sci.* 59, 25-33.
83. Murphy BD (1983). Precocious induction of luteal activation and termination of delayed implantation in Mink with the dopamine antagonist Pimozide. *Biol. Reprod.* 29, 658-662.
84. Murphy BD (2012). Embryonic diapause: advances in understanding the enigma of seasonal delayed implantation. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (Suppl. 6), 121-124.
85. Murphy BD, Concannon PW, Travis HF, Hansel W (1981). Prolactin: the hypophyseal factor that terminates embryonic diapauses in Mink. *Biol. Reprod.* 25, 487-491.

86. Murphy BD, DiGregorio GB, Douglas DA, Gonzalez-Reyna A (1990). Interactions between melatonin and prolactin during gestation in mink (*Mustela vison*), J. Reprod. Fert. 89, 423–429.
87. Murphy BD, Mead RA, McKibbin PE (1983). Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink. Biol. Reprod. 28, 497–503.
88. Murphy BD, Moger WH (1977). Progestins of mink gestation: the effects of hypophysectomy. Endocr. Res. Commun. 4, 45–60.
89. Mustoni A, Pedrotti L, Zanon E, Tosi G (2002). Ungulati delle alpi. Biologia – Riconoscimento – Gestione. Nitida Immagine Editrice. 131-191.
90. Neal EG, Cheeseman C (1996). Badgers. London: T. & A. D. Poyser Natural History.
91. Ojeda SR, Harms PG, McCann SM (1974). Effect of blockade of dopaminergic receptors on prolactin and LH release: median eminence and pituitary sites of action. Endocrinol. 96, 1650- 1657.
92. Papke RL, Concannon PW, Travis HF, Hansel W (1980). Control of luteal function and implantation in mink by prolactin. J. Anim. Sci. 50, 1102-1107.
93. Paria BC, Das SK, Mead RA, Dey SK (1994). Expression of epidermal growth factor receptor in the preimplantation uterus and blastocyst of the Western spotted skunk. Biol. Reprod. 51, 205-213.

94. Paria BC, Lim H, Wang XN, Liehr J, Das SK, Dey SK (1998). Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholestrogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinol.* 139, 5235–5246.
95. Parker VJ, Douglas AJ (2010). Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects. *J. Reprod. Immunol.* 85, 86–92.
96. Pearson OP, Enders RK (1944). Duration of pregnancy in certain mustelids. *J. Exp. Zool.* 95, 21-25.
97. Pilbeam TE, Concannon PW, Travis HF (1979). The annual reproductive cycle of mink (*Mustela vison*). *J. Anim. Sci.* 48, 578-584.
98. Polejaeva IA, Reed WA, Bunch TD, Ellis LC and White KL (1997). Prolactin-induced termination of obligate diapause of mink (*Mustela vison*) blastocysts in vitro and subsequent establishment of embryonic stem-like cells. *J. Reprod. Fert.* 109, 229-236.
99. Ptak GE, Modlinski JA, Loi P (2013), Embryonic diapause in humans: time to consider? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:92.
100. Ptak GE, Tacconi E, Czernik M, Toschi P, Modlinski JA, Loi P (2012). Embryonic diapause is conserved across mammals. *PLoS ONE* 7(3): e33027.
101. Rasweiler JJ, Badwaik NK (1997). Delayed development in the short-tailed fruit bat (*Carollia perspicillata*). *J. Reprod. Fert.* 109, 7–20.

102. Raught B, Gingras AC, Gygi SP, Imataka H, Morino S, Gradi A, Aebersold R, Sonenberg N (2000). Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J.* 19, 434–444.
103. Renfree MB, Shaw G (2000). Diapause. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 353-375.
104. Renfree MB, Tyndale-Biscoe CH (1973). Intra-uterine development after diapauses in the marsupial. *Macropus eugenii*. *Dev. Biol.* 32,28–40.
105. Rourke AW, Mead RA (1982). Blastocyst protein synthesis during obligate delay of implantation and embryo activation in the western spotted skunk. *J. Exp. Zool.* 221, 87-92.
106. Sage H, Johnson C, Bornstein P (1984). Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.* 259, 3993–4007.
107. Schulz LC, Bahr JM (2004). Potential endocrine function of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase during implantation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 283–287.
108. Selwood L (2000). Marsupial egg and embryo coats. *Cells Tissues Organs.* 166, 208–219.
109. Sempéré A (1977). Plasma progesterone levels in the Roe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Reprod. Fert.* 50, 365-366.

110. Shanbhag BA, Saidapur SK, Radder RS (2003). Lowering body temperature induces embryonic diapause during prolonged egg retention in the lizard (*Calotes versicolor*). *Naturwissenschaften* 90, 33–35.
111. Sinha A, Mead RA (1976). Morphological changes in the trophoblast, uterus and corpus luteum during delayed implantation and implantation in the western spotted skunk. *Am. J. Anat.* 145, 331-356.
112. Spindler RE, Renfree MB, Gardner DK (1996). Carbohydrate uptake by quiescent and reactivated mouse blastocysts. *J. Exp. Zool.* 276, 132–137.
113. Stocco C, Telleria C, Gibori G, (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28, 117–149.
114. Stoufflet I, Mondain-Monval M, Simon P, Martinet L (1989). Patterns of plasma progesterone, androgen and oestrogen concentrations and in-vitro ovarian steroidogenesis during embryonic diapause and implantation in the Mink (*Mustela vison*). *J. Reprod. Fert.* 87, 209-221.
115. Surani MAH (1975). Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implantation and embryonic diapause. *J. Reprod. Fert.* 43, 411-417.
116. Swenson JE, Sandegren F, Bjärvall A, Wabakken P, Söderberg A, Franzén R (1997). Infanticide caused by hunting of male bears. *Nature.* 386, 450–451.

117. Tabor H, Tabor CW (1964), Spermidine, spermine, and related amines. *Pharmacol. Rev.* 16, 245–300.
118. Tarín JJ, Cano A (1999). Do human concepti have the potential to enter into diapause? *Hum. Reprod.* 14, 2434-2436.
119. Turco MY, Matsukawa K, Czernik M, Gasperi V, Battista N, Della Salda L, Scapolo PA, Loi P, Maccarrone M, Ptak G (2008). High levels of anandamide, an endogenous cannabinoid, block the growth of sheep preimplantation embryos by inducing apoptosis and reversible arrest of cell proliferation. *Hum. Reprod.* 23, 2331–2338.
120. Tyndale-Biscoe CH, Hinds LA (1984). Seasonal patterns of circulating progesterone and prolactin and response to bromocriptine in the female tammar (*Macropus eugenii*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 53, 58–68.
121. Van Winkle LJ (1981). Activation of amino acid accumulation in delayed implantation mouse blastocysts. *J. Exp. Zool.* 218, 239–246.
122. Van Winkle LJ (2001). Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol. Reprod.* 64, 1–12.
123. Van Winkle LJ, Campione AL (1983). Effect of inhibitors of polyamine synthesis on activation of diapausing mouse blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 68, 437–444.
124. Van Winkle LJ, Tesch JK, Shah A, Campione AL (2006). System B0, + amino acid transport regulates the penetration stage of blastocyst

- implantation with possible long-term developmental consequences through adulthood. *Hum. Reprod. Update.* 12, 145–157.
125. Wang H, Matsumoto H, Guo Y, Paria BC, Roberts RL, Dey SK (2003). Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *PNAS.* 100, 14914–14919.
126. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376, 1–14.
127. Weichert CK (1940). The experimental shortening of delayed pregnancy in the albino rat. *Anatomical Record.* 77, 31–48.
128. Weitlauf HM (1973). *In vitro* uptake and incorporation of amino acids by blastocysts from intact and ovariectomized mice. *J. Exp. Zool.* 183, 303–308.
129. Wolff JO, Macdonald DW (2004). Promiscuous females protect their offspring. *Trends Ecol. Evol.* 19, 127-134.
130. Yamaguchi N, Dugdale HL, Macdonald DW (2006). Female receptivity, embryonic diapause, and superfetation in the European badger (*Meles meles*): implications for the reproductive tactics of males and females. *Q. Rev. Biol.* 81, 33-48.

8. SITOGRAFIA

<http://www.roedeer.com/>