

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS Y ENDOCRINOS DURANTE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN RUMIANTES (Revisión de Literatura)

Góngora A *, Grajales H **, Hernández A **

* Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio.

** Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

Palabras claves: Implantación, desarrollo embrionario, endometrio, oviducto, blastocisto.

Key words: embryo implantation, embryonic development, endometrium, oviduct, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

En todos los animales el objetivo final de la actividad reproductiva es la preservación de las especies. El desarrollo embrionario temprano y el proceso de implantación son considerados de singular importancia. En estos períodos ocurren algunos cambios bioquímicos, celulares y moleculares en el oviducto, el útero y el conceptus, que permiten que se establezca una comunicación permanente entre el trofoblasto y el endometrio, la cual será más estrecha cuando se forme la placenta definitiva.

Para que lo anterior suceda deben existir, un microambiente en el oviducto y en el útero óptimos, y la madre debe evitar el rechazo inmunológico del embrión, como consecuencia de un 50% de antígenos que le son extraños, provenientes del padre. Además, en el embrión ocurrirá la transcripción de importantes genes que decidirán su desarrollo futuro. En razón de la abundante información sobre el tema, el objetivo de este artículo es analizar algunos aspectos claves de la implantación, etapa crítica para la supervivencia del embrión en el bovino.

Durante la implantación, ocurren muertes embrionarias, que constituyen pérdidas económicas considerables a la industria ganadera, especialmente en bovinos, ovinos y porcinos. En la medida en que se conozcan los eventos claves para el desarrollo normal de los embriones, particularmente los relacionados con la expresión de genes que determinan mayores tasas de

supervivencia embrionaria, será posible contribuir a aumentar la eficiencia reproductiva de especies de interés económico, a través de la aplicación de técnicas modernas.

ASPECTOS CELULARES DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

La implantación es un complejo proceso que comprende una serie de etapas interactivas, que comienzan con la fijación del blastocisto al útero y terminan con la formación de la placenta definitiva. Las etapas que intervienen varían en las diferentes especies (Weitlauf, 1994; Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

El éxito de la implantación depende de la sincronía e intercambio molecular madre-embrión inducidos en el útero, cuyo control se atribuye principalmente, a los estrógenos y la progesterona (P_4) (Harvey et al., 1995).

La implantación comprende tres etapas: (i) la *pre-adhesión*, el conceptus se elonga considerablemente, (ii) la *aposición*, caracterizada por el contacto celular entre el trofoblasto y el epitelio uterino y (iii) la *adhesión*, que comprende la etapa final del proceso el cual culmina con un aumento de la estructura celular de la placenta epiteliocorial. (Weitlauf, 1994; Guillomot, 1995).

* E-mail agongora60@hotmail.com

** E-mail dhgrajal@veterinaria.unal.edu.co

*** Email:dhernan@veterinaria.unal.edu.co

No se conocen con certeza, todos los mecanismos que intervienen en la implantación. Sin embargo, investigaciones recientes se han orientado al estudio de las interacciones trofoblasto-epitelio de revestimiento del útero, de las glicoproteínas de la superficie celular, moléculas de la matrix extracelular (MEC) y moléculas de adhesión célula-substrato, sobre la superficie del blastocito peri-implantatorio y el epitelio uterino. Así mismo, se han planteado varias hipótesis sobre los posibles mecanismos de aceptación del conceptus alogénico (Frazier y Glaser, 1979; Dlaikan et al., 1999; Bowen y Burghardt, 2000; Davies et al., 2000, Leung et al., 2000; Rodríguez et al., 2000).

Los estrógenos inducen cambios en los hialuronatos, lactosaminoglicanos, galactosiltransferasas, proteoglicanos y heparin-heparán sulfatos de la superficie de las células epiteliales (Weitlauf, 1994). Aún no se ha valorado la importancia de los mismos que se originan en el ovario, trofoblasto o la corteza adrenal.

Las anteriores moléculas hacen parte de diferentes sistemas de adhesión celular y se localizan en la superficie apical de las células epiteliales uterinas, donde son necesarias para la adhesión inicial del embrión. Estas pueden cambiar al momento de la implantación.

Entre los componentes de la MEC en el ratón, la laminina aparece tempranamente en el estado de dos células y posteriormente en las áreas de contacto entre células en embriones de 8-16 células; el nidogen también aparece en este período. En las áreas intercelulares, se expresa el colágeno tipo III en embriones de 2-4 células. A medida que se expande el blastocisto y se forma el endodermo, aparece la laminina y la entactina localizadas en las áreas de desarrollo de la MEC (Dziadek y Timpl, 1985).

En el blastocisto tardío, el colágeno tipo IV y la fibronectina, se expresan en la masa celular interna (MCI), hecho que coincide con la formación de la membrana basal temprana. Se conoce la distribución espacio-temporal para las moléculas de adhesión. Los anticuerpos dirigidos contra éstas, causan descompactación del estado de mórula e interrupción en la blastulación, lo que pone de manifiesto su importancia en la interacción célula-célula, más que en la adhesión al útero.

En embriones de ratón de 4-8 células, existe el sistema galactosiltransferasa/lactosaminoglicano. En estudios *in vivo*, mediante la instilación intrauterina de compuestos que inter-

fieren con la galactosiltransferasa, se inhibió el proceso de adhesión e inicio de la implantación (Weitlauf, 1994).

Otro glicoconjugado con función importante en los mecanismos de adhesión celular, es el heparin/heparán sulfato proteoglicanos. Un anticuerpo contra éste reconoció determinantes antigénicos en embriones de ratón preimplantatorios de 2 células hasta blastocisto (Dziadek et al., 1985). Tales propiedades se han podido confirmar mediante tinciones selectivas y componentes de superficie marcados con I¹²⁵.

Un evento importante que sucede durante la implantación, es la reducción en la polaridad de las moléculas tanto en la superficie uterina como en el trofoblasto, lo cual ha llevado a sugerir que esta reducción mutua puede contribuir al proceso de adhesión (Chávez, 1990).

Los cambios encontrados en el contorno superficial de las células epiteliales, ha llamado la atención por el estudio del citoesqueleto. Lunam y Murphy (1983), usando colchicina, demostraron que los microtúbulos probablemente están envueltos en la transformación apical durante la preñez temprana. Luxford y Murphy (1989) mediante técnicas de inmunofluorescencia, encontraron cambios en los filamentos de actina durante el mismo período. La P4 y los estrógenos tienen efectos opuestos sobre esta proteína (Luxford y Murphy, 1992).

Algunas proteínas con secuencia tripéptida arginina-glicina-ácido aspártico, llamadas integrinas, están envueltas en la interacción célula-célula y matrix-célula y cumplen diversas funciones en la migración celular, organización del citoesqueleto y transducción de diferentes señales (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

En el día 6 de preñez en ratas, se encontró un aumento en la concentración de colesterol solo en la superficie apical, el cual podría actuar como un potente regulador de la permeabilidad de la membrana y junto con otros lípidos, modular la expresión de proteínas de membrana. Sin embargo, son pocos los estudios en este campo (Murphy, 1992).

ALGUNOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y RESPUESTA FISIOLÓGICA AL EMBRIÓN

El oviducto provee las condiciones para el transporte espermático, la capacitación, transporte y maduración del óvulo y un medio ambiente óptimo para el clivaje y el desarrollo del cigote (Ellington, 1991). En el oviducto ipsilateral

No se conocen con certeza, todos los mecanismos que intervienen en la implantación. Sin embargo, investigaciones recientes se han orientado al estudio de las interacciones trofoblasto-epitelio de revestimiento del útero, de las glicoproteínas de la superficie celular, moléculas de la matrix extracelular (MEC) y moléculas de adhesión célula-substrato, sobre la superficie del blastocito peri-implantatorio y el epitelio uterino. Así mismo, se han planteado varias hipótesis sobre los posibles mecanismos de aceptación del conceptus alogénico (Frazier y Glaser, 1979; Dlaikan et al, 1999; Bowen y Burghardt, 2000; Davies et al., 2000, Leung et al., 2000; Rodríguez et al., 2000).

Los estrógenos inducen cambios en los hialuronatos, lactosaminoglicanos, galactosiltransferasas, proteoglicanos y heparin-heparán sulfatos de la superficie de las células epiteliales (Weitlauf, 1994). Aún no se ha valorado la importancia de los mismos que se originan en el ovario, trofoblasto o la corteza adrenal.

Las anteriores moléculas hacen parte de diferentes sistemas de adhesión celular y se localizan en la superficie apical de las células epiteliales uterinas, donde son necesarias para la adhesión inicial del embrión. Estas pueden cambiar al momento de la implantación.

Entre los componentes de la MEC en el ratón, la laminina aparece tempranamente en el estado de dos células y posteriormente en las áreas de contacto entre células en embriones de 8-16 células; el nidogen también aparece en este período. En las áreas intercelulares, se expresa el colágeno tipo III en embriones de 2-4 células. A medida que se expande el blastocisto y se forma el endodermo, aparece la laminina y la entactina localizadas en las áreas de desarrollo de la MEC (Dziadek y Timpl, 1985).

En el blastocisto tardío, el colágeno tipo IV y la fibronectina, se expresan en la masa celular interna (MCI), hecho que coincide con la formación de la membrana basal temprana. Se conoce la distribución espacio-temporal para las moléculas de adhesión. Los anticuerpos dirigidos contra éstas, causan descompactación del estado de mórula e interrupción en la blastulación, lo que pone de manifiesto su importancia en la interacción célula-célula, más que en la adhesión al útero.

En embriones de ratón de 4-8 células, existe el sistema galactosiltransferasa/lactosaminoglicano. En estudios *in vivo*, mediante la instilación intrauterina de compuestos que inter-

fieren con la galactosiltransferasa, se inhibió el proceso de adhesión e inicio de la implantación (Weitlauf, 1994).

Otro glicoconjugado con función importante en los mecanismos de adhesión celular, es el heparin/heparán sulfato proteoglicanos. Un anticuerpo contra éste reconoció determinantes antigénicos en embriones de ratón preimplantatorios de 2 células hasta blastocisto (Dziadek et al., 1985). Tales propiedades se han podido confirmar mediante tinciones selectivas y componentes de superficie marcados con I¹²⁵.

Un evento importante que sucede durante la implantación, es la reducción en la polaridad de las moléculas tanto en la superficie uterina como en el trofoblasto, lo cual ha llevado a sugerir que esta reducción mutua puede contribuir al proceso de adhesión (Chávez, 1990).

Los cambios encontrados en el contorno superficial de las células epiteliales, ha llamado la atención por el estudio del citoesqueleto. Lunam y Murphy (1983), usando colchicina, demostraron que los microtúbulos probablemente están envueltos en la transformación apical durante la preñez temprana. Luxford y Murphy (1989) mediante técnicas de inmunofluorescencia, encontraron cambios en los filamentos de actina durante el mismo período. La P4 y los estrógenos tienen efectos opuestos sobre esta proteína (Luxford y Murphy, 1992).

Algunas proteínas con secuencia tripéptida arginina-glicina-ácido aspártico, llamadas integrinas, están envueltas en la interacción célula-célula y matrix-célula y cumplen diversas funciones en la migración celular, organización del citoesqueleto y transducción de diferentes señales (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

En el día 6 de preñez en ratas, se encontró un aumento en la concentración de colesterol solo en la superficie apical, el cual podría actuar como un potente regulador de la permeabilidad de la membrana y junto con otros lípidos, modular la expresión de proteínas de membrana. Sin embargo, son pocos los estudios en este campo (Murphy, 1992).

ALGUNOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y RESPUESTA FISIOLÓGICA AL EMBRIÓN

El oviducto provee las condiciones para el transporte espermático, la capacitación, transporte y maduración del óvulo y un medio ambiente óptimo para el clivaje y el desarrollo del cigote (Ellington, 1991). En el oviducto ipsilateral

al cuerpo lúteo (en especies con ovulación única), ocurre un aumento en la amplitud de las contracciones del músculo liso del oviducto, mediado posiblemente por el ovario o el cigote. La progesterona, más que el 17 β estradiol controla el transporte del embrión en el oviducto (Wijayagunawardane et al., 1996).

Al día quinto de la gestación, el cigote ha descendido al útero, y su supervivencia depende de la programación genética intrínseca. La expresión de los genes de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ocurre muy temprano, así como la expresión de ciertas anomalías cromosómicas, las cuales pueden llevar a mortalidad embrionaria (Aguilar et al., 1997).

El desarrollo del embrión preimplantatorio se caracteriza por tres etapas morfológicamente distintas: compactación, cavitación y expansión del blastocelo, las cuales necesitan de una adecuada expresión de los genes derivados de la madre y/o el genoma embrionario. Mediante una transcriptasa reversa en la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se ha podido analizar *in vitro* la transcripción de importantes genes en el bovino, proceso que comienza en el estado de 2-4 células (Wrenzycki et al., 1997).

Se ha propuesto que el trofoblasto de rumiantes ungulados, posee una limitada invasividad (sinepiteliocorial) y requiere la migración de las células binucleadas del corión, para fusionarse con las células epiteliales uterinas. Como resultado de la unión célula-célula se forman extensos sincitios entre los tejidos maternos y fetales (aunque en algunos de ellos no participan las células binucleadas) presentándose una barrera que empieza a ser poblada por células trinucleadas (Roberts et al., 1996).

En el bovino en el día 17 la superficie del endometrio está conformada por un epitelio pseudoestratificado y posee una estructura indistinguible de la de un animal no preñado (King et al., 1981). El epitelio se hace más regular en apariencia en el día 18, comparado con el no preñado.

Las células cilíndricas tienen de 20-25 mm de alto y un 3% contienen dos núcleos. El desarrollo del trofoblasto no es uniforme en las diferentes zonas del conceptus, en áreas cercanas al embrión es más desarrollado mientras que en zonas alejadas mantiene su estructura simple cúbica (Hernández, 1975; Escobar y Hernández, 1996). En el día 19 y 20 se observan áreas definitivas de adhesión entre el trofoblasto y el epitelio endometrial (King et al., 1981).

Durante la implantación, que en los bovinos se inicia hacia el día 18 de la gestación (Dlaikan et al., 1999), hay una vascularización extensa, proceso que ocurre lentamente (Hernández, 1975; Jiménez y Hernández, 1982) tanto de los tejidos maternos como de los embrionarios (Umaña y Hernández, 1994) especialmente en estos últimos, así como de un marcado incremento del flujo sanguíneo en el útero como sucede en la oveja (Zheng et al., 1998).

El proceso de angiogénesis se inicia con la proliferación capilar y culmina con la formación de una red microcirculatoria compuesta por arteriolas, capilares y vénulas indispensables para el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos, incluidos los placentarios. Comprende tres etapas esenciales: (i) fragmentación de la lámina basal de los vasos existentes, (ii) migración de las células endoteliales de los vasos al estímulo angiogénico y (iii) proliferación de las células endoteliales (Klagsbrum y D'Amore, 1991).

Los vasos del tejido conectivo que sostienen el trofoblasto, se forman a partir de las lagunas angiogénicas (derivadas de las células mesenquimales) del mesodermo espláncico de la alantoides, la vascularización es lenta y con excepción de las áreas necróticas se completa en los días 60 y 90 de la gestación en oveja y vaca (Hernández y Rodríguez, 2000).

Las membranas embrionarias de ovinos y bovinos en fases iniciales de la implantación poseen grandes zonas avasculares (Hernández, 1971; Hernández y Rodríguez, 2000), las cuales pueden estar relacionadas con un ambiente hipóxico, el que a su vez estimularía la angiogénesis. Se ha reportado que la hipoxia podría "regular en alta" la producción de mRNA para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) el cual podría jugar un papel importante en la angiogénesis y estimulación de la proliferación e invasión de las células del trofoblasto (Taylor et al., 1997).

La abundante presencia de células cebadas en el tejido conectivo subepitelial en el oviducto y endometrio, sugieren que la histamina está envuelta en la angiogénesis (Pope, 1982), aunque su papel en la regulación de la expresión de los factores de crecimiento (FC) no ha sido determinada (Persson et al., 1997).

Recientemente, se ha purificado por cromatografía de intercambio iónico, a partir del suero y leche de bovinos, una proteína angiogénica básica, que se une fuertemente a un inhibidor de la ribonucleasa placentar. Por ser su actividad

angiogénica menor que la angiogenina, se le ha denominado angiogenina-2 (Strydom et al., 1997).

En ovejas como respuesta a la hipoxia, se ha observado un cambio en la arquitectura vascular y un aumento de la superficie de absorción materno-fetal para garantizar el intercambio de sustancias (Krebs et al., 1997).

No se conoce cómo el conceptus atrae los capilares maternos, ni cómo manipula el suministro sanguíneo y estructura endometrial en la preñez temprana. Sin embargo, en algunos estudios se indican numerosos FC, que se producen alrededor del embrión, sin que sus funciones hayan sido claramente definidas (Kane et al., 1992). Recientemente, se presentó evidencia de la existencia de un estímulo (en ovinos) proveniente del embrión, para la angiogénesis endometrial (Sánchez et al., 2001).

SEÑALES Y CICLOS MOLECULARES EN LA IMPLANTACIÓN.

Antes de que ocurra la fertilización, el complejo oocito-cumulus produce prostaglandinas (PGF2a y PGE2) que son importantes para la maduración del oocito, la cual se mantiene por 48 horas después de la fertilización. Las prostaglandinas probablemente se producen en las células de la granulosa del folículo ovárico y junto con la P4 son sintetizadas después de la incubación *in vitro*. Esta producción hormonal temprana parece tener una importante función durante el reconocimiento materno de la preñez, cuando la PGF2a y la PGE2 exhiben acciones opuestas (Gurevich et al., 1993; Asselin et al., 1996).

Existe evidencia de que los FC se expresan antes de la implantación. En oocitos de ratón y bovino los factores de TGF-a, TGF-b y PDGF se expresan antes de la fertilización (Watson et al., 1992). El efecto estimulante de los FC sobre el desarrollo embrionario, se ha reconocido cuando ellos se adicionan *in vitro*, lo que sugiere la existencia de un mecanismo autocrino de acción de estas moléculas (Gandolfi et al., 1993).

En el oviducto del bovino se han identificado mRNAs para TGF-a, TGF-b, PDGF y bFGF (Watson et al., 1992), mientras que el PDGF y las subunidades de inhibina-A y B solo se han localizado en regiones específicas del oviducto (Gandolfi et al., 1992).

La importancia de otras proteínas secretadas por el oviducto y restringidas a ciertas áreas específicas, además de la presencia de varios metabolitos como glucosa, oxígeno y otros

radicales, empiezan a ser evaluadas dentro de la complejas interrelaciones del ambiente oviductal y su efecto en el proceso de la implantación (Bavister and Fischer, 1991).

El interferón tau (IFN)-t secretado por el conceptus bovino entre los días 15-30 de la preñez, es una de las principales señales durante la implantación (Naivar et al., 1995), su interacción con un complejo receptor uterino altera la secreción de PGF2a previniendo la lisis del cuerpo lúteo (CL), de no secretarse el IFN-t se presentará un nuevo ciclo estral (Thatcher et al., 1992 ; Spencer et al., 1996).

En estudios de hibridación *in situ*, usando sondas específicas de mRNA, se encontró que la expresión del IFN-t se inicia con la elongación del blastocisto y se encuentra limitada al trofoectodermo (Thacher et al., 1997), aunque es claro que en el proceso participa también el mesodermo somático, es decir que la elongación se hace a expensas del corion (Hernández, 1971).

El IFN-t actúa a nivel del epitelio uterino suprimiendo la transcripción de los genes para los receptores de estrógenos y oxitocina, bloqueando los mecanismos luteolíticos como la liberación de los pulsos de la PGF2a, sin afectar la expresión del receptor para P4. El mantenimiento de la secreción de P4 por el CL, asegura el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Bazer et al., 1997).

El IFN-t es un inductor de señales secundarias para el mantenimiento de la preñez en el endometrio, mediante una alteración en la biosíntesis de eicosanoides y citoquinas; aunque los eventos moduladores del IFN-t sobre la secreción de PGF2a están bien estudiados, todavía existen grandes vacíos en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares comprometidos en este proceso (Thatcher et al., 1997).

A la par de los mecanismos por los cuales el IFN-t regula la síntesis de PGF2a se sabe que la inhibición de su síntesis favorece la producción de anexinas como por ejemplo la lipocortina, la cual inhibe la actividad de la PLA2. Igualmente, varias quinasas, fosfatasa y lipasa pueden ser reguladas por el IFN-t para disminuir la síntesis de PGF2a (Thatcher et al., 1997).

En respuesta a la aplicación de interferon-tau recombinante bovino (rb IFN-t) en vacas multíparas, se han purificado tres proteínas endometriales de 8,16 y 28 kDa, respectivamente (P8, P16 y P28), las cuales se relacionan con la función del CL y la nutrición y el desarrollo del conceptus (Naivar et al., 1995).

Se cree que una nueva proteína de 16 kDa llamada "proteína de reacción cruzada ubicua bovina" (bUCRP) puede estar asociada a la red de citoquinas y las complejas interacciones entre las células epiteliales del estroma y endoteliales en el endometrio, igualmente se postula que pueda servir como un marcador de preñez temprana en la vaca (Austin et al., 1996).

En ovejas dos glicoproteínas de 57 y 55 Kda conocidas como "proteínas de la leche uterina" son sintetizadas en grandes cantidades por el epitelio endometrial después de la implantación, sin embargo su importancia biológica no se ha estudiado en detalle (Murray and Sower, 1992).

La discutida importancia de la hormona del crecimiento (GH) en el desarrollo embrionario temprano se ha confirmado en la actualidad. Kolle et al. (1997) usando oligonucleótidos marcados con biotina localizaron un mRNA que codifica para el receptor de esta hormona (GHR), en la masa celular interna del blastocisto en el día 6. Cuarenta y ocho horas más tarde se encontraron cantidades significativas de un transcripto para GHR en las células del disco embrionario.

En estudios posteriores se ha localizado mRNA para GHR en el epitelio uterino, glándulas, vasos y amniocorion de la placenta, desde la sexta semana hasta el término de la preñez. Estos resultados confirman que la GH participa en el metabolismo de la placenta y desarrollo embrionario desde el inicio de la preñez hasta el nacimiento (Kolle et al., 1997 a, b).

Las hormonas esteroideas sintetizadas y metabolizadas por el conceptus bovino representan otra señal que puede estar relacionada con el proceso de reconocimiento de la preñez (Thacher et al., 1984). Además, los E2 y la P4 regulan el flujo sanguíneo uterino, la relación E2/P4 está asociada temporalmente con el flujo sanguíneo uterino durante el ciclo estral.

El conceptus bovino produce P4 en los días 13,15 y 16 de la gestación, alguna testosterona y limitadas cantidades de estrógenos (Shemesh et al., 1979), siendo la cantidad de estrógenos muy pequeña comparada con la que sintetiza el conceptus del cerdo. Estas hormonas se consideran la principal señal en el reconocimiento y mantenimiento de la preñez en esta especie.

IMPORTANCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Se ha postulado la participación de los FC de crecimiento en muchas de las complejas interrelaciones madre-conceptus

durante la implantación. Los FC son polipéptidos multifuncionales que ejercen su efecto biológico interactuando con receptores de membrana, los cuales traducen y retransmiten las señales al interior de la célula. Dentro de las funciones atribuidas, están el control del crecimiento y proliferación celular, afectando otras funciones celulares como la motilidad, diferenciación y sobrevivencia (Granerus et al., 1993).

Se han identificado tres FC que tienen mayor influencia preferencialmente durante el desarrollo embrionario: el factor de crecimiento asociado a la heparina, el de crecimiento asociado a la insulina y el transformante de crecimiento-b (TGF-b) (Granerus et al., 1993).

El crecimiento del conceptus también es regulado por citoquinas provenientes de linfocitos, entre ellas el TGF-b en unión con el factor de crecimiento trofoblástico básico y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Hansel, 1997). La expresión adicional del factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) se ha reportado durante el período preimplantatorio y sobre el trofoblasto a través de la gestación (Beauchamp y Croy, 1991).

IMPORTANCIA DE LOS ESTEROIDES GONADALES

El estradiol, el principal miembro de la familia de los estrógenos, está involucrado en la regulación del crecimiento y expresión de genes específicos en el tejido reproductivo. Los mecanismos por los cuales ejercen su función han sido determinados parcialmente. Inicialmente se forma un complejo con receptores nucleares de alta afinidad, actuando como un factor de aumento de la transcripción por la unión a regiones específicas de los cromosomas, esto permite un incremento en la síntesis de unas proteínas específicas que median los efectos biológicos del estímulo hormonal (Ericksson, 1994).

El E2 bajo condiciones *in vivo* induce un marcado crecimiento uterino, estimulando la hipertrofia, hiperplasia y actividad mitótica de las células uterinas, 24-36 horas después de su administración. Igualmente, existe un aumento en la síntesis de ácidos nucleicos (Ericksson, 1994).

El útero es insensible a la P4 al menos que primero haya sido expuesto a los estrógenos. Esto se explica por el estímulo de la síntesis de receptores, aumentando la capacidad del útero para responder a la P4. Los niveles de receptores a P4 en el útero de la rata y hámster, se ven reducidos considerablemente luego de la ovariectomía, pero pueden ser restitui-

dos por tratamiento con E2 (Leavitt and Balha, 1972; Walters and Clark, 1977). El incremento del número de receptores a P4 en el epitelio uterino puede ser bloqueado por la adición de cicloheximida y actinomicina D, lo cual indica que en la activación de los receptores probablemente estén participando el RNA y la síntesis de proteínas.

El E2 también induce un aumento en los receptores para los FC. Esto ha sido comprobado para EGF, IGF-I, TGF- α . Aparentemente hay una interrelación entre E₂, FC y algunos protooncogenes nucleares. (Murphy et al., 1987). Los estrógenos inducen los protooncogenes c-fos, c-myc y c-jun, en el útero de ratas. Estos genes pertenecen a la clase de competencia inmediatamente temprana y se piensa que su expresión induce la cascada de eventos a través de la mitosis del ciclo celular (Weisz et al., 1990).

IMPORTANCIA DE LAS GONADOTROPINAS

La LH es esencial en la implantación y sus efectos son mediados por la síntesis de esteroides ováricos, planteándose que el E₂ induce la implantación y la P4 mantiene el blastocito y condiciona el endometrio para la implantación (Humphrey, 1967; Bindon, 1969).

La hipótesis de la importancia de la LH y su homólogo estructural y funcional, la gonadotropina coriónica humana (hCG) en la implantación, proviene del hallazgo de receptores de LH/hCG en el endometrio y miometrio de humanos, cerdas, conejas y ratas (Rao y Sanfilippo, 1997).

En el bovino la concentración de receptores LH/hCG varía durante el ciclo estral, con valores altos entre los días 15-17 (3.1 fmol/mg proteína) y bajos (1.2 fmol/mg de proteína) entre los días 2-4 (Friedman, 1995).

La adición de hCG a cultivos de útero de rata incrementó el contenido de P4, posiblemente por un mecanismo dependiente de cAMP. Igualmente se ha encontrado un incremento de la ciclooxigenasa entre los días 15-17 lo cual sugiere alguna importancia en el proceso de luteólisis (Friedman, 1995).

El aislamiento de transcritos de 4.3, 3.6, 2.4, 1.8, 1.0 kb en el epitelio glandular y estroma uterino en humanos y una proteína receptora de 80 kDa, la que se unió con I²⁵-hCG, sugiere que la LH/hCG afecta la diferenciación celular, ya que la adición de hCG altamente purificada, indujo cambios morfológicos y funcionales en las células del estroma, efecto dependiente de la dosis

y el tiempo, que ocurre en presencia de estrógeno y P4, lo cual sugiere un efecto permisivo de estas hormonas (Han et al., 1995).

En humanos se ha demostrado que la PGE₂ induce la diferenciación de las células del estroma uterino en presencia de estrógeno y P4. Las PGs, producidas localmente, podrían actuar como mediadores de otras hormonas primarias como la LH y hCG (Rao y Sanfilippo, 1997).

Los receptores LH/hCG en los vasos sanguíneos uterinos, pueden indicar que las correspondientes gonadotropinas tienen efectos directos sobre el flujo sanguíneo, funciones que anteriormente se habían atribuido por evidencias circunstanciales a E₂/P4. Está por esclarecerse si LH/hCG son hormonas primarias que actúan regulando los niveles de receptores a E₂, P4, y/o otras sustancias vasoactivas (Rao y Sanfilippo, 1997).

Los linfocitos T contienen receptores para LH/hCG, por lo que se cree que estas hormonas tienen una función inmunosupresora durante la preñez, evitando de esta forma el rechazo del blastocisto (Rao y Sanfilippo, 1997). Por otro lado, se conoce que la fuente de LH/hCG no solo proviene de la pituitaria, sino que el blastocisto también las produce (Heap et al., 1979). Es posible que el pico preovulatorio de LH junto con los E₂ y la P4 inicien la cascada de eventos endometriales necesarios para la implantación.

Una estrategia farmacológica tendiente a disminuir las pérdidas de mortalidad embrionaria mediante el uso de hCG 5 días posterior a la inseminación, resulta en un incremento en la síntesis de INF-g y una correlación positiva con la P4 lo cual sugiere un mejor ambiente uterino para el conceptus. El mismo tratamiento indujo la presencia de CL adicionales los cuales aumentaron significativamente el nivel de P4 (Kerbler et al., 1997). Es de interés poder demostrar si esta hCG exógena bajo las mismas condiciones experimentales actúa directamente sobre el endometrio aumentando el número de receptores para P4, creando unas mejores condiciones del ambiente uterino.

RECEPTIVIDAD UTERINA.

La sensibilización de los esteroides sexuales sobre el epitelio uterino se considera crítica para el inicio de la implantación, estableciendo una "fase receptiva" conocida como "ventana de la implantación" (Denker, 1994).

En esta fase hay participación de una serie de eventos moleculares y celulares cuya expresión es inducida coordi-

nadamente en espera del arribo del blastocisto. Algunos de estos eventos ocurren en ausencia del blastocisto dentro del endometrio, mientras la inducción de otros requieren un diálogo entre ellos (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

En especies en las cuales se ha establecido la ventana de la implantación, hay un adelgazamiento del glicocalix y pérdida generalizada de sitios aniónicos, así como una mayor capacidad del epitelio de unirse a ciertas lectinas, lo cual indica la existencia de cambios en los residuos de carbohidratos de los glicoconjugados en la superficie celular (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

La fase receptiva se inicia el día 5 de la gestación en el ratón (Shiotani et al., 1993) y en la mujer dura cerca de 2 días (Rao y Sanfilipo, 1997). No es claro si esta receptividad ocurre en los bovinos, aunque hay algunos estudios en los cuales se han identificado integrinas en la superficie del epitelio de revestimiento del útero (Bowen y Burghardt, 2000).

Mediante tratamientos hormonales se puede inducir una fase neutral, una receptiva y otra no-receptiva. En la rata la inducción experimental de la receptividad requiere mantener el endometrio mínimo 3 días con P4, seguido de pocas cantidades de estrógenos. A su vez, el "estado neutral" puede ser inducido en ratas ovariectomizadas por la administración temprana de P4 (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

Las integrinas son marcadores de receptividad endometrial en el humano. Estas son glicoproteínas heterodiméricas presentes en la superficie de todas las células y participan en interacciones célula-célula y substrato célula con la matrix extracelular (Somkuti et al., 1997).

Hay tres integrinas específicas de ciclo para los receptores del colágeno, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, para fibronectina y $\alpha v\beta 3$ para vitronectina. Ellas se expresan únicamente durante la ventana de la implantación. La supresión de la expresión de estas integrinas puede ser dada por los E2 y P4 o al contrario, estimulada por el EGF (Somkuti et al., 1997).

RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ (RMP)

Es la alteración de la fisiología materna como consecuencia de la presencia del embrión, necesaria para el mantenimiento de la preñez. Los cambios en la función materna son mediados por las señales del conceptus y potencialmente incluyen la detección de antígenos por el sistema inmune materno (Hansel, 1997).

Una respuesta inmune inapropiada puede rechazar el conceptus, Sin embargo, ésta es bloqueada en parte por una reducida expresión del MHC sobre la superficie del conceptus. También se requiere un microambiente uterino adecuado para que los tejidos maternos y el trofoblasto secreten moléculas inhibitoras de linfocitos que reducen la reactividad inmune (Hansel, 1997).

El MHC contiene varios genes y se ha dividido en tres regiones: clase I, II y III, las moléculas I y II son glicoproteínas integradas a la membrana y están envueltas en interacciones moleculares de inmunidad celular. El sistema BoLA se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 23 (Aguilar et al., 1997).

El conceptus bovino es alogénico a la madre y la expresión de serotipos de antígenos clase I del MHC provenientes de los padres se han detectado en embriones de 7 días (Templeton et al., 1987). Durante la preñez tardía y media, la expresión de estas moléculas continúa sobre el epitelio coriónico e interplacentomas, pero ausente de los vasos coriónicos del cotiledón (Low et al., 1990).

Estudios del patrón de localización de las proteínas del MHC en la placenta bovina, indican que existe una "regulación en baja" en la expresión de estas moléculas lo cual es importante para la viabilidad fetal (Hansel, 1997).

Hay tres moléculas producidas por el trofoblasto que inhiben la función de los linfocitos T en cultivo. La PGE2 puede inhibir su proliferación en concentraciones menores de 10^{-8} M, y el IFN-g el que además induce el incremento en la producción de la proteína-2 quimioatráctica de granulocitos y una proteína inmunosupresora de ~ 800.000 de PM que contiene lactosaminoglicano (Hansel, 1997).

La P4 por si misma es inhibitoria de los linfocitos (Low y Hansel, 1988); sin embargo, las concentraciones requeridas son mucho más altas que las que se encuentran en la sangre y la placenta, por lo que se cree que la P4 induce la síntesis de otras moléculas uterinas que tienen mayor actividad (Hansel, 1997).

La proteína B específica de preñez (PSP-B) o PAG-1 la cual se encuentra localizada en los gránulos de las células binucleadas de la capa externa de la placenta, podría participar en el RMP. El mRNA para PAG-1 se expresa en forma abundante poco antes de la implantación hasta la gestación a término, su potencial como prueba diagnóstica de preñez se ha hecho evidente (Roberts et al., 1996).

Otra proteína conocida como PSP60 y las glicoproteínas asociadas a la preñez bovina (bPAG) son indicadoras del crecimiento y actividad remodeladora del trofoblasto. Por tal razón, la determinación de sus niveles en el flujo sanguíneo materno se utiliza para predecir la salud fetal y de ayuda en la detección de anomalías placentarias, mortalidad embrionaria o aborto (Ectors et al., 1997; Martal et al., 1997).

A pesar de considerarse el RMP esencial para que el embrión sobreviva, y la preservación de la especie, se cree que este mecanismo no se conserva durante la evolución (Niswender et al., 1994).

Hay un marcado incremento en las tasas de mortalidad embrionaria entre los días 7-10 en épocas de verano (Ryan et al., 1993), como disminución en el peso del conceptus y CL en vacas expuestas a estrés por calor los días 8-16 de la gestación. Estos hallazgos coinciden con la fase de RMP y se cree que sean debidos a la disminución en la secreción de IFN-g (Biggers et al., 1987).

PLACENTACIÓN.

No existe una clara distinción entre el momento en que finaliza la implantación y el comienzo de la placentación, pero en ambos casos un denominador común es la destrucción de los tejidos maternos, en aquellas especies que poseen trofoblasto invasivo (Rao y Sanfilippo, 1997).

La placenta cumple importantes funciones durante la preñez, físicamente, fija el feto al útero, transporta nutrientes de la circulación materna al feto, excreta metabolitos fetales dentro del compartimento materno, modula la aceptación materna del semi-injerto fetal y produce hormonas que regulan los órganos fetales y maternos (Jerome et al., 1996).

La placenta también sintetiza un amplio número de proteínas, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas bioactivas. Las hormonas producidas pertenecen a la familia de la prolactina/hormona del crecimiento (GH/PRL), lactógeno placentar (PL) y proteínas relacionadas a la prolactina (PRP), sus funciones no han sido claramente determinadas, pero existe evidencia de su importancia en el control del metabolismo fetal y materno (Anthony et al., 1995, a y b).

La placenta tiene variedad de células especializadas que cambian de acuerdo con la especie, con funciones específicas (transporte/intercambio, endocrinas). En algunas especies las funciones se realizan en un solo tipo celular, mientras que en otras, son realizadas por diferentes fenotipos (Jerome et al., 1996).

La placenta utiliza los precursores de esteroides aportados por la madre y el feto. Hay evidencia de que la placenta participa en un diálogo mediado por los esteroides entre la pituitaria materna, el ovario y la corteza adrenal fetal (Jerome et al., 1996).

Algunos autores circunscriben la capacidad esteroidogénica de las células de la placenta en rumiantes a las células binucleadas (Wooding, 1992), mientras que otros, la refieren a las células mononucleadas (Ben-David y Shemesh, 1989).

Las células binucleadas secretan cantidades variables de LP ovino o bovino en hacia a la circulación materna (Anthony et al., 1995) y otras moléculas (Wooding, 1992).

El LP podría modular la función ovárica en forma directa o indirecta; el uso de rbLP, incrementó el tamaño del CL, aumentando las concentraciones de P4 plasmáticas, lo cual demuestra que este se une a la membrana del CL. Un mRNA producido por el conceptus bovino al día 17 sugiere una acción local del bLP sobre el útero y la función ovárica (Matthew et al., 1994).

Durante la gestación temprana la placenta puede convertir colesterol a pregnenolona y dihidroisoandrosterona a estrógenos. La pregnenolona es fácilmente convertida a P4 por la gran abundancia de 3 β -ol-dehidrogenasa-D⁵-D⁴-isomerasa en el tejido, la P4 es transportada al feto y la mayor parte termina en el compartimento materno como pregnanediol en la orina. En el compartimento fetal la P4 sirve como precursor para muchos D⁴-3- ketoesteroides, cuyo principal miembro es el cortisol (Solomon, 1994).

El carboxil-propéptido o alfa-1colágeno tipo III, es una proteína producida por la membrana corioalantoidea bovina. Su expresión después del día 21 de la gestación, coincide con el desarrollo de la alantoides, que se fusiona progresivamente con el corion para formar la corioalantoide (Shang et al., 1997).

CONCLUSIÓN

Aunque se han establecido las características morfológicas generales del proceso de la implantación, amén de las influencias de los Estrógenos y P₄ (también en sentido global), todavía no hay claridad acerca de la participación de otras sustancias secretadas por el trofoblasto y/o el útero en el control endocrino de la implantación y la ausencia de rechazo inmunológico.

La investigación de estos aspectos en la especie bovina es aún escasa frente a lo que se conoce en otras especies (humanos, rata,

ratón, por ejemplo). Es posible que la lentitud relativa del proceso de implantación redunde en mayor vulnerabilidad del conceptus, y la mortalidad embrionaria sea en algunos (o muchos) casos el resultado de esa condición, además del tipo de placentación.

La mortalidad embrionaria constituye un problema de considerable importancia económica en vacunos destinados a la producción de alimentos para consumo humano y en la medida que puedan identificarse marcadores biológicos de supervivencia (o muerte) embrionaria, será posible desarrollar programas de selección tendientes a aumentar la eficiencia reproductiva.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar B, Vos PLAM, Beckers JF, Hensen EJ and Dieleman SJ. The role of the major histocompatibility complex in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 47:111-120, 1997.
- Anthony RV, Pratt SL, Liang R and Holland MD. Placental fetal hormone interactions: Impact on fetal growth. *J. Anim. Sci.* 73:1861-1871, 1995.
- Anthony RV, Liang R, Kay EP, Pratt SL. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. *J. Reprod. Fertil Suppl* 49: 83-95, 1995.
- Asselin E, Goff AK, Bergeron H and Fortier MA. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2a and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 54, 371-379, 1996.
- Austin KJ, Ward SK, Teixeira MG, Dean VC, Moore DW and Hansen TR. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. *Biol Reprod.* 54, 600-606, 1996.
- Bavister BD and Fischer BF. What is physiological oxygen tension for mammalian pre- and early postimplantation embryos? *J. Reprod. Fertil (Abst. Ser.)* 7:7, 1991.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott, TL. Interferon tau: A novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproductive Immunology.* 37:412-420, 1997.
- Ben-David E, Shemesh M. Ultrastructural localization of cytochrome P-450 sec in the placenta using protein A-gold technique. *Biol Reprod.* 42:131-138, 1989.
- Biggers BG, Geisert RD, Wetteman RP and Buchanan DS. Effect of heat stress on early embryonic development in the cow. *J. Anim. Sci.* 64: 1512-1518 1987.
- Bindon BM. The role of the pituitary gland in implantation in the mouse: delay of implantation by hypophysectomy and neurodepressive drugs. *J. Endocrinol* 43:225-235, 1969.
- Bowen JA and Burghardt RC. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals- *Cel. Develop. Biol.* 11:93-104, 2000.
- Chavez DJ. Possible involvement of D-galactose in the implantation process. In: *Trofoblast invasion and endometrial receptivity: Novel aspects of the cell biology of embryo implantation* (eds H.W. Denker and J. D. Aplin) pp 259-272, 1990 (Plenum Press: New York).
- Davies CJ, Fisher PJ and Schlafer DH. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine Uterine/Placental interface. *Placenta* 21(2-3): 94-202, 2000.
- Denker, H-W. Endometrial receptivity: Cell biological aspects of an unusual epithelium. *Ann Anat* 176:53-60, 1994.
- Dlaikan H, Hernández A y Cortés A. Modificación del epitelio de revestimiento del útero y desarrollo trofoblástico, a los 21, 23, 28 y 36 días de la gestación en la vaca. *Arch. Med. Vet.* 31(2):197-203, 1999.
- Dziadek M and Timpl R. Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and teratocarcinoma cells. *Dev. Biol* 111372-382 1985.
- Dziadek M, Fujiwara S, Paulsson M and Timpl R. Immunological characterization of basement membrane types of heparan sulfate proteoglycan. *Embo J.* 4:905-912, 1985.
- Ellington JE. The oviduct and its role in reproduction: A review of literature. *Cornell Vet.* 81, 313-328, 1991.
- Ectors FJ, Sulon J, Delval A, Remy B, Drion PV and Beckers, J.F. Bovine pregnancy associated glycoprotein profiles as indicators of trophoblastic function after in vitro manipulation or culture. In: 30 th Conference on physiology and pathology of Reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 32,1-2, 1997.
- Eriksson H. Regulation of growth factor expression via estrogens. In: 30 th Conference on physiology and pathology of Reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 32,1-2: 195-198, 1997.
- Escobar F y Hernández A. Vascularización, crecimiento alantocoriónico y ubicación del embrión (o feto) durante la implantación en la vaca. *Rev Med. Vet. Zoot. (Colombia).* 44(1):7-11, 1996.
- Frazier W and Glaser L. Surface components and cell recognition. *Annu Rev Biochem* 48: 491-523, 1979.
- Freidman S, Gurevich M and Shemesh M. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin binding sites. *Biol Reprod.* 52, 1020-1026, 1995.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Passoni L and Lauria A. Maternal control of early embryonic development. In: "Embryonic development and manipulation in animal production" A. Lauria & F. Gandolfi (eds.) Portland Press. London pp.93-102, 1992.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Bianchi R and Passoni L. Role of the oviduct during early embryogenesis. In: Regulation of embryonic growth mechanisms in mammals. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 4 145-216, 1993.
- Graner M, Petterson E, Gustafsson L, Lake M, Tally M, Schofield P and Engstrom. W. Growth Factors in early embryogenesis. In: Regulation of embryonic growth mechanisms in mammals. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 4 145-216, 1993.
- Gurevich M, Harel-Markowitz E, Marcus S, Shore LS and Shemesh M. Prostaglandin production by oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of the early bovine embryo. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 281-283, 1993.
- Guillomot M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:39, 1995.
- Han SW, Lei ZM and Rao ChV. Human chorionic gonadotropin as a new regulator of human endometrial stromal cells differentiation into decidua. In *The Program of the Endocrine Society Annual Meeting* P2-84, 1995.
- Hansel W and Blair RM. The role of lipoxygenase products of arachidonic acid metabolism in bovine corpus luteum function. *Reprod Dom Anim.* 31, 427-429, 1996.
- Hansen PJ. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology* 47:121-130, 1997.
- Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR and Schultz GA. Roles of growth factors during peri-implantation. *Mol Hum Reprod* 10:712-718, 1995.
- Heap RB, Flint AP and Gadsby JE. Role of the embryonic signals in the establishment of pregnancy. *Br Med Bull* 35:129-135, 1979.
- Hernández A. The development of the extremities of the placenta of the domestic sheep. M.Sc. Thesis. University of Bristol, England, 1971.
- Hernández A. Descripción de las extremidades necróticas de la placenta de la vaca. *Rev. ICA* 10:1,235-242, 1975.
- Hernández A y Rodríguez J. *Lecturas sobre Reproducción Bovina. III. Aspectos Morfofisiológicos de la Implantación.* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 2000.
- Humphrey KW. The induction of implantation in the mouse after ovariectomy. *Steroids* 10:591-600, 1967.
- Jerome F, Strauss III, Martinez F and Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: Unique features and Unanswered question. *Biol Reprod.* 54:303-311, 1996.
- Jiménez L y Hernández A. Morfología del alantocorión bovino entre los 27 y 88 días de gestación. *Rev. ACOVEZ (Bogotá-Colombia)* 9,32:44-51, 1982.
- Kane MT, Carney EW and Ellington JE. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology* 38:297-313, 1992.
- Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE and Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology.* 47:703-714, 1997.
- King GJ, Atkinson BA and Robertson HA. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. *J. Reprod. Fertil* 61:469, 1981.
- Klasgrum M and D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol* 53:217, 1991.

44. Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D and Palma GA. Expression of growth hormone receptor and its transcript during bovine early embryonic development. In: 30 th Conference on physiology and pathology of Reproduction. *Reprod Dom Anim.* 32:1-2, 1997.
45. Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D, and Waters MJ. Differential expression of the growth hormone receptor and its transcript in bovine uterus and placenta. *Mol Cell Endocrinol* 131:127-136, 1997.
46. Krebs C, Longo LD and Leiser R. Term ovine placental vasculature: Comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta.* 18, 43-51, 1997.
47. Leavit WW and Blaha GC. An estrogen-stimulated, progesterone-binding system in the uterus and vagina. *Steroids* 19:263-274, 1972.
48. Leung ST, Derecka K, Mann GE and Flint APF. Wathes, D.C. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *J. Reprod. Fert.* 119: 25, 2000.
49. Low BG, Hansen PJ, Drost M and Gogolin-Ewens KJ. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. *J. Reprod. Fert.* 90:235-243, 1990
50. Low BG and Hansen PJ. Immunosuppressive actions of steroids and prostaglandins secreted by the placenta and uterus of the cow and sheep. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18:71-75, 1988.
51. Lunam CA and Murphy CR. Alterations in microvilli of uterine epithelial cells after colchicine treatment. *Z. Mikrosk-anat. Forsch. Leipzig.* 97, 1005-1008, 1983.
52. Luxford KA and Murphy CR. Changes in the apical microfilaments of rat uterine epithelial cells in response to estradiol and progesterone. *Anat Rec.* 233, 521-526, 1992.
53. Martal J, Chene N, Camous S, Huynh L, Lantier F, Hermier P, Haridon RL, Charpigny G and Charlier M. Chaouat, G. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: The role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod. Fert. Dev.* 9:355-380, 1997.
54. Murphy CR. Structure of the plasma membrane of uterine epithelial cells in blastocyst attachment: a Review. *Reprod. Fert. Dev.* 4, 633-643, 1992.
55. Murphy LJ, Murphy LC and Friesen HG. Estrogen induction of N-myc and c-myc protooncogen expression in the rat uterus. *Endocrinol* 120:1282-1288, 1987.
56. Murray MK and Sower SA. Estrogen- and Progesterone-Dependent secretory changes in the uterus of the sheep. *Biol Reprod.* 47, 917-924, 1992.
57. Mattew CL, Byatt JC, Currant TL, Curran DF and Collier RJ. Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biol Reprod.* 50, 1136-1144, 1994.
58. Naivar KA, Ward SK, Austin KJ, Moore DW and Hansen TR. Secretion of bovine uterine proteins un response to type I interferons. *Biol Reprod.* 52, 848-854, 1995
59. Niswender KD, Li J, Loos KR, Powell MR, Roberts R M, Keisler DH, Smith MF. The effect of mutations near carboxyl terminus of interferon-t on luteal lifespan in sheep. *Biol Reprod.* 50 (Suppl 1) :89 (Abst.138), 1994.
60. Persson E, Rodriguez-Martinez H and Dantzer V. Immunocytochemical localization of IGF-1, PDGF-A and PDGF-receptors in the porcine and bovine female reproductive tract. In: 30 th Conference on physiology and pathology of Reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 32:1-2, 1997
61. Pope WF. Uterine asynchrony : A cause of embryonic loss. *Biol Reprod.* 39, 999-1003, 1982.
62. Rao ChV and Sanfilippo JS. New understanding in the biochemistry of implantation: Potential direct roles of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *The Endocrinologist* 7:2:107-111, 1997.
63. Ryan DP, Blakewood EG, Lynn JW, Munyakazi I and Goke RA. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J Anim Sci* 70:3490-3497, 1993.
64. Roberts RM, Xie S and Mathialagan N. Maternal Recognition of pregnancy. *Biol Reprod.* 54, 294-302, 1996.
65. Rodriguez J, Jiménez C y Hernández A. A microscopical study of uterine lining modification, binucleate cells number and trophoblastic development, at days 14, 20, and 24 of gestation in single and multiple pregnancies in sheep. *Small ruminants research* 35(2):163-168, 2000.
66. Sánchez JA, Rodríguez-Márquez JM y Hernández A. Área capilar sub-epitelial en el endometrio ovino en los días 0 y 14 del ciclo estral y en los 14, 20 y 24 días de gestación. *Revista científica. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias.* 11(1):69-74, 2001.
67. Solomon S. The primate placenta as an endocrine organ : Steroids In: E. Knobil, J.D., Neill, G.S. Greenwald, C.C. Market, and D.W. Pfaff (Ed.) *The Physiology of Reproduction* (2nd Ed.) pp 863-873. Raven Press, New York, 1994.
68. Shang WR, Dore JJE and Godkin JD. Developmental gene expresion of procollagen III in bovine extraembryonic membranes during early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 48:18-24, 1997.
69. Shemesh M, Milaguir F, Ayalon N and Hansel W. Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 56:181, 1979.
70. Shupnik MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod.* 54, 279-286, 1996.
71. Sonkuti S G, Yuan L, Fritz MA and Lessey BA. Epidermal growth factor and sex steroids dynamically regulate a marker of endometrial receptivity in ishihawa cells. *J Clin. Endocrinol Metab.* 62, 7 : 2192-2197, 1997.
72. Spencer TE, Ott TL and Bazer FW. t-Interferon: Pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc. Exp. Biol. Med.* 213, 215-229, 1996.
73. Strauss III JF, Martinez F and Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: Unique features and unanswered questions. *Biol Reprod.* 54, 303-311, 1996.
74. Strydom DJ, Bond MD and Vallee BL. An angiogenic protein from bovine serum and milk-purification and primary structure of angiogenin-2. *Eur. J. Bioch.* 247:535-544, 1997.
75. Tabibzadeh S and Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Molecular Human Reproduction Vol. 1, Human Reproduction* 10, 6: 1579-1602, 1995.
76. Taylor CM, Stevens H, Anthony FW and Wheeler T. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines. *Placenta* 18:451-458, 1997.
77. Templeton JW, Tipton RC, Garber T, Bondioli K and Kraemer DC. Expression and genetic segregation of parental BoLA serotypes in bovine embryos. *Anim. Genet.* 18:317-322, 1987.
78. Thatcher WW, Bartol FF, Knickerbocker J, Curl JS and Wolfenson D. Maternal recognition of pregnancy in cattle. *J. Dairy Sci.* 67:2797-2811 1984.
79. Thatcher WW, Danet-Desnoyers G and Wetzels C. Regulation of bovine endometrial prostaglandin secretion and the role of bovine trophoblast protein-1 complex. *Reprod. Fert. Dev.* 4:329-334, 1992.
80. Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples CR, Ambrose JD and Coelho S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology.* 47:131-140, 1997.
81. Umaña J y Hernández A. Densidad capilar en el útero bovino durante la implantación. *Rev. ACOVEZ.* 19:10-12, 1994.
82. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE and Schultz GS. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 87-95, 1992.
83. Walters MR and Clark JH. Cytosol progesterone receptors of the rat uterus: assay and receptor characteristics. *J. Steroid Biochem.* 8:1137-1144, 1977.
84. Weitlauf HM. Biology of Implantation. In: *The physiology of reproduction.* Chapter 7. Ed. Knobil, E. & Neill J. et, al Raven Press., Ltd. New York. 1994. pp 391, 1994
85. Weisz A, Cicatiello LM, Persico E, Scalona M, Bresciani F. Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogen. *Molec Endoc.* 4:1041-1050, 1990.
86. Wijayagunawardane MPB, Cerbito WA, Miyamoto A, Acosta TJ, Takagi M, Miyazawa K and Sato K. Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. *Theriogenology* 46, 1149-1158, 1996
87. Wooding FBP. Current topic: the synepiteliochorial placenta of ruminants binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta,* 13:101-113, 1992.
88. Wrenzycki C, Hermann D, Lemme E, Eckert J, Carnwath JW and Heimann H. Expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos generated in vitro. *Theriogenology,* 1997.
89. Zheng J and Redmer D. Characterization of Heparin-Binding Endothelial Mitogen (s) Produced by the Ovine Endometrium During Early Pregnancy. *Biochemistry Cellular Biology,* 76: 89-96, 1998.