

3. Fisiología de la implantación embrionaria en la vaca

*Aureliano Hernández Vásquez
Agustín Góngora Orjuela*

Introducción

En todas las especies animales, el resultado final de la actividad reproductiva es la conservación de su descendencia y una de las etapas que permite que este propósito se cumpla es la implantación embrionaria. Una vez ocurre la fertilización, el oviducto provee las condiciones para que se lleven a cabo los procesos de nutrición y desarrollo embrionario temprano hasta la llegada del embrión al útero al quinto día de la gestación.

El embrión establece una comunicación permanente con el oviducto y el útero e induce una serie de cambios bioquímicos, celulares y moleculares que le permitirán la implantación y, posteriormente, una relación más estrecha con la madre una vez se forma la placenta.

Para que los eventos descritos anteriormente se lleven a cabo debe existir, por un lado, un microambiente en el oviducto y útero óptimos, por el otro, la madre debe reconocer la presencia del embrión y evitar el rechazo inmunológico, como consecuencia de un 50 % de antígenos que le son extraños, provenientes del padre. Además, en el embrión ocurrirá la transcripción de importante genes que decidirán su desarrollo futuro.

El objetivo de este capítulo es presentar a los lectores los eventos celulares, endocrinos, morfológicos y fisiológicos durante la implantación en la vaca, que permita avanzar en el conocimiento e identificación de las causas de la muerte embrionaria temprana considerada particularmente alta en esta especie.

3.1 Aspectos celulares de la implantación

La implantación es un proceso complejo, que comprende una serie de etapas interactivas, que comienzan con la fijación del blastocisto al útero y termina con la formación de la placenta definitiva. Las etapas que intervienen en la implantación varían entre las diferentes especies animales (Weitlauf, 1994; Tabibzadeh y Babaknia, 1995). Existe en la actualidad controversia sobre el uso del término “implantación”, por cuanto en la vaca no existe una inserción o penetración del embrión dentro del endometrio como sí ocurre en los roedores y primates, por lo que el término más adecuado sería el de “adhesión” (Peippo et al., 2011). Sin embargo, dado que este término todavía no ha sido aprobado por el comité de nomenclatura reproductiva bovina, en el presente capítulo, se continuará utilizando el término implantación.

El éxito de la implantación depende de la “comunicación” entre el embrión, el oviducto y el endometrio, y de la sincronía entre el desarrollo del embrión y una compleja serie de eventos moleculares y celulares inducidos en el útero por los estrógenos (E2) y la progesterona (P4) (Harvey et al., 1995). La activación del genoma embrionario sucede en el estado de 16 células y es requisito para que ocurra la implantación (Artley et al., 1992). Después de la activación mencionada, el embrión crece rápidamente hasta el estado de blastocito, se libera de la zona pelúcida y adquiere la capacidad para continuar con las etapas siguientes (Paria et al., 2001).

Para los propósitos descriptivos y de estudio, la implantación se ha dividido en tres etapas: i) La **preadhesión** en la que ocurre la elongación del conceptus, ii) la **aposición** cuando ocurre el contacto celular entre el trofoblasto y el epitelio

uterino, y iii) la **adhesión** que corresponde a la etapa final del proceso y termina con un aumento de la estructura celular de la placenta epiteliocorial (Weitlauf, 1994; Guillomot, 1995).

No se conocen con exactitud los mecanismos que intervienen en la implantación, pero hay información acerca de la participación de 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 epitelio uterino (Frazier y Glaser, 1979).

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, aunque pueden cambiar al momento de la implantación.

Dentro de los componentes de la MEC, la laminina aparece tempranamente en los embriones de ratón de dos células y, posteriormente, en las áreas de contacto entre células en embriones de 8-16 células; el nidogen también aparece en este periodo (Dziadek y Timpl, 1985). Se ha detectado por inmunohistoquímica, el colágeno tipo III en embriones de 2-4 células en áreas intercelulares. A medida que se expande el blastocito y se forma el endodermo, aparecen la laminina y entactina en las áreas de desarrollo de la MEC (Dziadek y Timpl, 1985).

En la etapa de blastocisto tardío, se expresan en la masa celular interna (MCI) el colágeno tipo IV y la fibronectina, lo que coincide con la formación de la membrana basal temprana. Las integrinas, unas glicoproteínas que regula las interacciones celulares con la matriz extracelular, han sido implicadas en el establecimiento de la receptividad uterina en la implantación (MacIntyre et al., 2002).

Se ha reportado en embriones de ratón de 4-8 células, el sistema galactosiltransferasa/lactosaminoglicano, mediante estudios in vivo la instilación intrauterina de compuestos que interfieren con la galactosiltransferasa, inhibieron 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. En embriones de ratón, mediante tinciones selectivas y componentes de superficie marcados con I125, se reconoció un anticuerpo dirigido contra éste desde el estado de 2 células hasta el de blastocito (Dziadek et al., 1985).

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 llevó a sugerir que este mecanismo contribuye al proceso de adhesión (Chávez, 1990).

Algunos cambios observados alrededor de las células epiteliales, permitieron a Lunam y Murphy (1983), orientar la investigación por el citoesqueleto, encontrando que los microtúbulos estaban implicados en la transformación apical durante la preñez temprana. A su vez Luxford y Murphy (1989) mediante tinciones fluorescentes observaron cambios en los filamentos de actina durante el mismo periodo. La P4 y los Estrógenos tienen efectos opuestos sobre esta proteína (Luxford y Murphy, 1992b).

Algunas proteínas con la secuencia de tripéptidos RGD (argininaglicina- ácido aspártico), llamadas integrinas, están comprometidas 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). Recientemente se identificó una proteína llamada molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1) en el lumen y epitelio glandular en los días 20-22 de preñez de la vaca, lo que sugiere que la interacción célula a célula entre el conceptus y las células del epitelio uterino requieren de esta proteína (Bai et al., 2014).

En el día 6 de preñez en ratas, se encontró un aumento en la concentración de colesterol en la superficie apical de la membrana plasmática de las células epiteliales del útero. Se cree que éste actúa como un potente regulador de la permeabilidad de la membrana y junto con otros lípidos puede modular la expresión de proteínas de membrana; sin embargo, son pocos los estudios en este campo (Murphy, 1992).

3.2 Algunos cambios histológicos del útero y el trofoblasto

Sucedida la fertilización, 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 ocurre un aumento en la amplitud de las contracciones mediado posiblemente por el ovario o el cigote, la P4 más que el 17 β estradiol controla el transporte por el oviducto (Wijayagunawardane et al., 1996).

Al quinto día de la gestación, el cigoto ha descendido al útero y su supervivencia depende de la programación genética intrínseca, en este momento ocurre la expresión de los genes de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), además la expresión de ciertas anormalidades cromosómicas las cuales pueden ocasionar la muerte del embrión (Aguilar et al., 1997).

El desarrollo del embrión pre implantatorio, se caracteriza por tres etapas morfológicamente distintas: la compactación, la cavitación y la expansión del blastocele, las cuales requieren de una muy bien dirigida 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).

El trofoblasto de los 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 tejido maternos y fetales que conforman una barrera que empieza a ser poblada por células trinucleadas (Roberts et al., 1996).

En la vaca en el día 17 de preñez, la superficie epitelial del endometrio, se constituye de células columnares pseudoestratificadas y posee una estructura indistinguible 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.

Los cambios histológicos del trofoblasto y el epitelio uterino de revestimiento comienzan en la oveja y en la vaca hacia los días 16 y 18 de la gestación, respectivamente. Los eventos celulares que marcan el comienzo de la implantación en las especies mencionadas, son: i) el cambio del trofoblasto de epitelio simple cuboidal a uno de 2 a 4 capas celulares cuboidales, ii) la aparición de las células binucleadas en el trofoblasto, iii) la adhesión y fusión de la membrana celular del trofoblasto con la del epitelio de revestimiento del útero, iv) la modificación del último tejido mencionado, que cambia de epitelio pseudoestratificado a simple plano. La modificación del epitelio de revestimiento del útero solamente es evidente inicialmente cerca al embrión. Después, la modificación se observa en zonas más alejadas del embrión. Hacia el fin de la cuarta semana en la oveja y la sexta en la vaca, aquella ha sucedido en la mayoría del área ocupada por el conceptus dentro del útero. (Hernández, 1971; Gaviria y Hernández, 1994; Dlaikan et al., 1999). (Figuras 1 y 2).

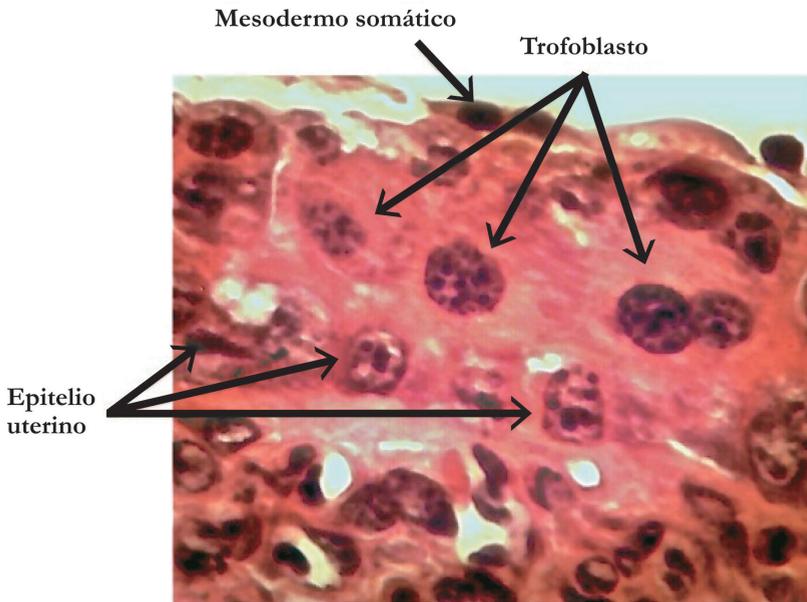


Figura 1. Proceso de implantación: el trofoblasto está en contacto con el epitelio uterino de revestimiento. Este se observa modificado, ha pasado de epitelio pseudoestratificado a cuboidal simple.



Figura 2. 28 días de gestación en la vaca. Epitelio uterino modificado (flechas). Los vasos sanguíneos aparecen dilatados debido al método de fijación (por perfusión).

Entonces comienza la formación de los cotiledones de la membrana corioalantoidea, los que penetrarán en las carúnculas uterinas para formar los placentomas o placentomas. Estos crecen y aumenta su número gradualmente. Tales procesos todavía continúan a los 60 y 80 días de gestación en la oveja y la vaca, respectivamente. Por lo anterior, en sentido estricto, debe entenderse que la placentación, tomada como un evento de consolidación morfológica y fisiológica de la placenta, ocurre lenta y gradualmente. Difiere en su cronología de la implantación de otras especies en las cuales el trofoblasto despliega un mayor grado de invasividad, como por ejemplo en primates y roedores.

Durante la implantación ocurre el proceso de angiogénesis, el cual se inicia con la proliferación de los capilares y culmina con la formación de una red microcirculatoria de arteriolas, capilares y vénulas que son indispensables para el crecimiento y el desarrollo de todos los tejidos placentarios. La angiogénesis comprende tres etapas esenciales: i) la fragmentación de la lámina basal de los vasos sanguíneos existentes, ii) la migración de las células endoteliales de los vasos al estímulo angiogénico, y iii) la proliferación de las células endoteliales (Klagsbrum y D'amore, 1991).

Los vasos del tejido conectivo se forman a partir de las lagunas angiogénicas (derivadas de las células mesenquimales) del mesodermo espláncnico de la alantoides. La vascularización es lenta. Su velocidad de formación es menor en comparación con la de crecimiento del conceptus y por ello, aparecen zonas avasculares entre los días 16 y 60 de la gestación aproximadamente. Hacia el día 28 de la gestación de la vaca, aparecen las zonas necróticas en las extremidades del conceptus (Jiménez y Hernández, 1982). Entonces, es posible observar en conceptus viables una zona vascular, una avascular y las áreas de necrosis (Hernández y Rodríguez, 2008). (Figura 3).

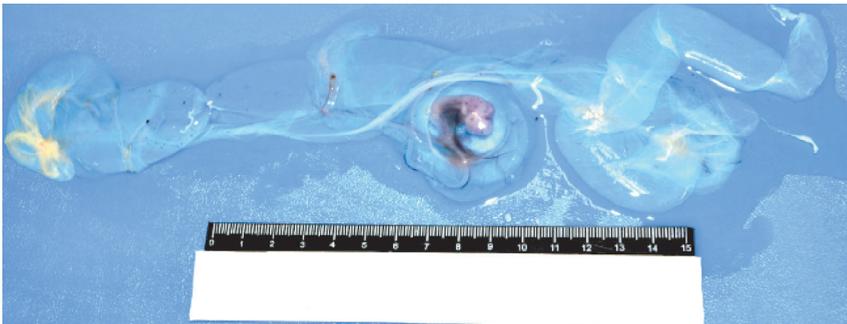


Figura 3. Conceptus bovino de 30 días de gestación (distancia corona-grupa:1.56 cm).

Las zonas avasculares se podrían relacionar con un ambiente hipóxico, que estimula la angiogénesis. Se ha reportado que la hipoxia “regula 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). Las sintasas de óxido nítrico y el VEGF producidas en el endometrio actúan durante la implantación en la oveja, como moduladores de la angiogénesis. Es de anotar que el trofoblasto también produce VEGF (Rivas et al., 2007).

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

Se ha purificado por cromatografía de intercambio iónico a partir del suero y la 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 la 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 la estructura endometrial durante la preñez temprana, sin embargo, se identificaron numerosos factores de crecimiento (FC) alrededor del embrión, aunque no se conocen sus funciones (Kane et al., 1992).

3.3 Señales moleculares en la implantación

Antes de que ocurra la fertilización, el complejo oocito-cumulus produce prostaglandinas PGF_{2a} y PGE₂ las cuales son necesarias para la maduración del oocito, y su producción se mantiene por 48 horas después de la fertilización. La fuente de PGs se cree que proviene de la granulosa y junto con la P4 son producidas después de la incubación *in vitro*; esta producción hormonal temprana parece tener una importante función durante el reconocimiento materno de la preñez cuando la PGF_{2a} y PGE₂ exhiben acciones opuestas (Gurevich et al., 1993; Asselin y Fortier 1996).

En el oviducto del bovino se identificaron los mRNA para TGF-a, TGF-b, PDGF y bFGF (Watson et al., 1992). El PDGF y las subunidades de inhibina-A y B se localizan en regiones específicas del oviducto (Gandolfi et al., 1992b).

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 evaluados dentro de las complejas interrelaciones de ese ambiente oviductal y su efecto en el proceso de implantación (Bavister y Fischer, 1991). Una ampliación de estos aspectos puede ser consultada en el capítulo sobre fisiología del oviducto.

La secreción del interferón tau IFN- τ por el conceptous bovino entre los días 15-30 de la preñez, es una de las principales señales durante la implantación (Naivar et al., 1995). Este interactúa con un complejo receptor uterino, suprimiendo la secreción de PGF2 α previniendo así la lisis del cuerpo lúteo (CL). Si no hay secreción de IFN- τ se presentará un nuevo ciclo estral (Thatcher et al., 1992; Spencer et al., 1996). (Figura 4).

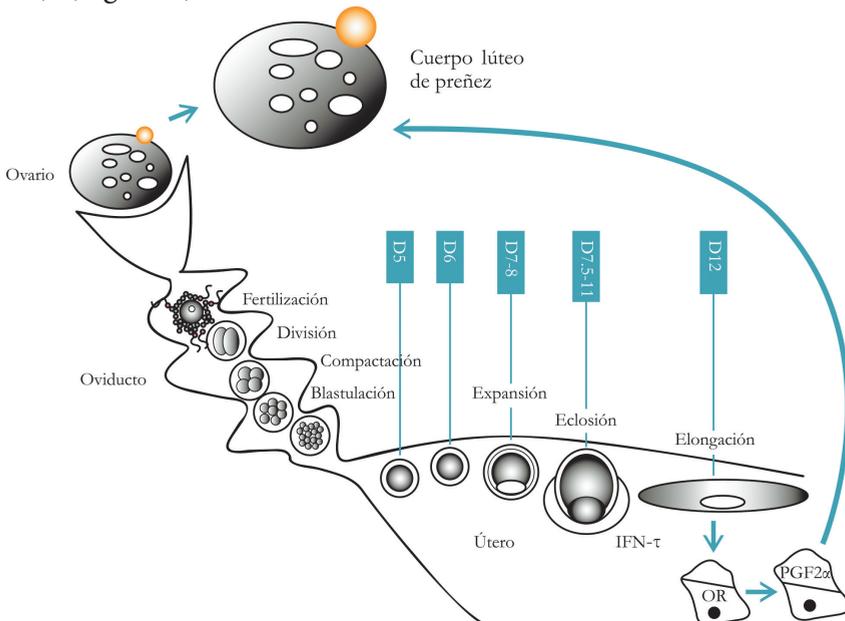


Figura 4. Reconocimiento materno de la gestación: la secreción de IFN- τ por el trofoectodermo al día 12 de la gestación coincide con la elongación del blastocito. Esta señal actúa sobre las células endometriales evitando la expresión de los receptores de oxitocina, al no ocurrir esto, no hay liberación de PGF2 α por tanto no ocurre la luteólisis y el CL de ese ciclo se convierte en el CL de gestación.

Estudios de hibridización *in situ*, usando sondas específicas de mRNA encontraron que la expresión del IFN-t se inicia simultáneamente con la elongación del blastocisto y se encuentra limitada al trofoectodermo (Thacher et al., 1997; Hue et al., 2012).

El IFN-t actúa en el epitelio uterino en donde suprime la transcripción de los genes para los receptores de estrógenos y oxitocina, para interrumpir 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; Bazer et al., 2009).

El IFN-t induce señales secundarias para el mantenimiento de la preñez, a través de un cambio 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 los mecanismos celulares y moleculares envueltos en este proceso (Thatcher et al., 1997).

A medida que se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos por los cuales el IFN-t regula la síntesis de PGF2a, se ha puesto en evidencia que la interrupción de su síntesis favorece la producción de anexinas, como la lipocortina, que inhibe la actividad de la fosfolipasa A (PLA2). Igualmente, varias quinasas, fosfatasa y lipasas pueden ser reguladas por el IFN-t para disminuir la síntesis de PGF2a (Thatcher et al., 1997).

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

Se cree que una 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 postuló como un marcador de preñez temprana en la vaca (Austin et al., 1996).

En la oveja se han identificado dos glicoproteínas de 57 y 55 kDa llamadas “proteínas de la leche uterina”, las cuales se sintetizan en grandes cantidades en el epitelio endometrial después de la implantación. Sin embargo, su importancia biológica no se ha estudiado en detalle (Murray y Sower, 1992).

Mediante el uso de oligonucleótidos marcados con biotina, se localizó un mRNA que codifica para el receptor de la hormona del crecimiento (GHR) en la masa celular interna del blastocisto en el día 6. Dos días después, hubo cantidades significativas de un transcritpo para GHR en las células del disco embrionario, lo que indica la importancia de esta hormona en el desarrollo embrionario temprano (Kolle et al., 1997).

En estudios posteriores se localizó mRNA para el receptor de GHR en el epitelio uterino, glándulas, vasos y amniocorión desde la sexta semana hasta el término de la preñez. Se cree que la GH está envuelta en el metabolismo de la placenta y desarrollo embrionario desde el inicio de la preñez hasta el nacimiento (Kolle et al., 1997). En este contexto, es interesante anotar que las células binucleadas del trofoblasto ovino contienen la llamada somatomamotrofina que es una hormona análoga a la GH y a la prolactina, dada su constitución química, la cual podría tener una importancia en el desarrollo del conceptus y de la placenta.

Las hormonas esteroides sintetizadas y metabolizadas por el conceptus bovino, representan otra señal que puede estar relacionada con el proceso de reconocimiento de la preñez. Además el E2 y la P4 regulan el flujo sanguíneo uterino (Thatcher et al., 1984).

El conceptus bovino en los días 13,15 y 16 produce P4, testosterona y pequeñas cantidades de estrógenos (Shemesh et al., 1979), que es menor a la producida por el conceptus del cerdo, el cual se considera la principal señal de reconocimiento y mantenimiento de la preñez.

3.4 Importancia de los factores de crecimiento durante la implantación

Los FC han sido implicados en muchas de las complejas interrelaciones durante la implantación. Estos son polipéptidos que cumplen diversas funciones y 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 que se les atribuyen se encuentran el control del crecimiento, la proliferación celular, además de otras funciones celulares básicas como la motilidad y la diferenciación (Granerus et al., 1993).

Se han identificado tres clases de FC que influyen preferencialmente durante el desarrollo embrionario: el factor de crecimiento asociado a la heparina, factor de

crecimiento asociado a la insulina (IGF) y el factor transformante de crecimiento- β (TGF- β) (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 periodo preimplantatorio y sobre el trofoblasto a través de la gestación (Beauchamp y Croy, 1991).

3.5 Importancia de los esteroides gonadales en la implantación

El principal miembro de la familia de los estrógenos, el estradiol, forma un complejo con receptores nucleares de alta afinidad, se aumenta la transcripción por la unión a regiones específicas de los cromosomas, lo que permite un incremento en la síntesis de proteínas específicas que median los efectos biológicos de la estimulación hormonal. El E2 estimula la hipertrofia, hiperplasia, actividad mitótica de las células uterinas y un aumento en la síntesis de ácidos nucleicos (Eriksson, 1994).

El útero es insensible a la P4 a menos que primero sea expuesto a los estrógenos, esto ha sido explicado por la estimulación de síntesis de receptores, aumentando la capacidad del útero para responder a la P4. La cantidad de receptores a la P4 en el útero de la rata y hámster se ven reducidos considerablemente luego de la ovariectomía, pero pueden ser restituidos por tratamiento con E2 (Leavitt y Balha, 1972; Walters y Clark, 1977). El aumento 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 estimulación de los receptores, probablemente este envuelta RNA y síntesis de proteínas.

El E2 también induce un aumento en los receptores para los FC, esto ha sido comprobado para EGF, IGF-I, TGF-a. Igualmente, se ha encontrado una interrelación entre E2, FC y protooncogenes nucleares (Murphy et al., 1987). La inducción de los protooncogenes c-fos, c-myc y c-jun, ha sido demostrada en el útero de ratas tratadas con estrógenos, 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).

3.6 Importancia de las gonadotropinas en la implantación

Los estudios sobre las necesidades hormonales durante la implantación en animales, revelan que la pituitaria es un órgano esencial en este proceso (Bindon, 1969). De las hormonas producidas, solo la LH es necesaria 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).

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 humano; sin embargo, estos también se han encontrado en el miometrio de cerdas, conejas y ratas (Rao y Sanfilippo 1997).

En el bovino la concentración de receptores LH/hCG varió 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 *in vitro* de útero de rata, incrementó el contenido de P4, posiblemente por un mecanismo dependiente de cAMP. Igualmente, se identificó un aumento de la ciclooxigenasa entre los días 15-17, lo que 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 que se unió con I125-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, este efecto fue dependiente de la dosis y el tiempo en presencia de estrógeno y P4 sugiriendo a la vez un efecto permisivo de estas hormonas (Han et al., 1995).

A partir de estudios en humanos, se ha podido demostrar que la PGE2 puede inducir la diferenciación de las células del estroma en presencia de estrógeno y P4, la producción local de la PGs ha llevado a sospechar que estas actúan como mediadores de otras hormonas primarias como LH y hCG (Rao y Sanfilippo, 1997). La detección de receptores LH/hCG en los vasos sanguíneos uterinos, sugiere que las gonadotropinas tienen efectos directos sobre el flujo sanguíneo, funciones que se habían atribuido por evidencias circunstanciales a E2/P4 (Toth, et al., 1994).

Está por esclarecerse si LH/hCG son hormonas primarias que actúan regulando los niveles de receptores a E2, P4, y/o otras sustancias vasoactivas en los vasos sanguíneos (Rao y Sanfilippo, 1997).

Se ha encontrado que los linfocitos T contienen receptores para LH/hCG, por lo que se cree que estas hormonas tengan 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 la produce (Heap et al., 1979). Esto lleva a pensar que el pico preovulatorio de LH junto con el E2 y la P4 inician la cascada de eventos endometriales requeridos para la implantación.

Una estrategia farmacológica tendiente a disminuir las pérdidas de mortalidad embrionaria es el uso de hCG 5 días posteriores a la inseminación, lo que resulta en un incremento en la síntesis de INF-t y una correlación positiva con la P4, lo que favorece 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.

3.7 Reconocimiento materno de la preñez y rescate del cuerpo lúteo

El reconocimiento materno de la preñez se define como la alteración de la fisiología materna como consecuencia de la señales enviadas por el embrión, que advierten su presencia en el útero, lo que permite prolongar la vida del CL (Spencer et al., 2004). 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). Durante la preñez ocurre una inmunosupresión con una reducción en la expresión de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) ocasionada por el trofoblasto, que permite el reclutamiento de macrófagos al útero preñado y una modulación de los genes relacionados con la inmunidad en respuesta a la presencia del conceptus (Olivera et al., 2012).

Una respuesta inmune inapropiada puede rechazar el conceptus; sin embargo, esta es bloqueada en parte por una reducida expresión del MHC.

Concurrentemente, se requiere un microambiente uterino 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 CMH en el bovino se denomina antígeno leucocitario (BoLa) y 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 que es importante para la sobrevivencia fetal (Hansel, 1997).

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

La P4 por sí 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 sangre y placenta, por lo que se cree que induce la síntesis de otras moléculas uterinas que tienen mayor actividad (Hansel, 1997).

Tres proteínas específicas de preñez están envueltas en el RMP, 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. 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 anormalidades placentarias, mortalidad embrionaria o aborto (Ectors et al., 1997; Martal et al., 1997).

A pesar de considerarse el RMP esencial para la sobrevivencia del embrión y de la especie, se cree que estos mecanismos no se conservan durante la evolución (Niswender et al., 1994).

Un marcado incremento en las tasas de mortalidad embrionaria, se ha observado entre los días 7-10 posinseminación en épocas de verano (Ryan et al., 1993), también se ha observado una disminución en el peso del conceptus y el CL en vacas expuestas a estrés por calor los días 8-16 de la gestación (Biggers et al., 1987), estos hallazgos coinciden con la fase de RMP y se cree que ocasionan una disminución en la secreción de IFN-t.

3.8 Formación de la placenta

No existe una clara diferenciación entre el momento en que finaliza la implantación y el comienzo de la formación de la placenta, pero en ambos casos un denominador común es la invasión del epitelio endometrial en aquellas especies que poseen trofoblasto invasivo (Rao y Sanfilippo, 1997). Las nuevas investigaciones sobre las características morfológicas de la placenta de la vaca, la clasifican como “cotiledonaria sinepiteliocorial” y su formación completa ocurre entre los 40-50 días de gestación (Peter, 2013). La antigua denominación de “sindesmocorial” que estuvo basada en el mal entendido concepto del número y forma de capas histológicas entre la circulación materno fetal, no es apropiada en la actualidad (Peter, 2013).

Se conoce más recientemente, que durante el proceso de formación de la placenta no hay pérdida del epitelio uterino, lo que ocurre durante la aposición del trofoectodermo al epitelio uterino es una modificación del epitelio y la formación de extensos sincitios maternofetales híbridos que son colonizados por la migración de las células gigantes binucleadas del trofoblasto (Peter, 2013).

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 inmunológicamente

la aceptación materno del semiinjerto fetal y produce hormonas que regulan los órganos fetales y maternos (Jerome et al., 1996). Figura 5.



Figura 5. Gestación de 54 días en la vaca (distancia corona-grupa: 6.9 cm).

Además de la cantidad de hormonas que produce, la placenta es capaz de sintetizar 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 placental (PL) y proteínas relacionadas a la prolactina (PRP), sus funciones no han sido claramente determinadas, pero existe evidencia de su importancia en la modulación del metabolismo fetal y materno (Anthony et al., 1995).

Diferentes fenotipos de células del trofoblasto conforman la placenta, las cuales cumplen funciones especializadas (transporte/intercambio, endocrinas), en algunas especies las funciones son combinadas, mientras en otras son realizadas por diferentes fenotipos (Jerome et al., 1996).

La placenta está posicionada para utilizar los precursores de esteroides aportados por la madre y el feto, existiendo una fuerte evidencia de que la placenta participa en un diálogo mediado por los esteroides entre la pituitaria materna, los ovarios y la corteza adrenal fetal (Jerome et al., 1996).

Existe controversia en los rumiantes, sobre la capacidad esteoidogénica de las células de la placenta, algunos autores la atribuyen a las células binucleadas (Wooding, 1992), mientras otros han encontrado enzimas como la P450 en células mononucleadas (Ben-David y Shemesh 1989).

Las células binucleadas, producen el LP ovino o bovino y lo secretan a la circulación materna migrando y fusionándose con el sincitio o epitelio endometrial, siendo las cantidades liberadas distintas entre estas especies, así como la detección en la circulación materna (Anthony et al., 1995).

La función ovárica puede ser modulada por el LP en forma directa o indirecta, el uso de rbLP incrementó el tamaño del CL, aumentando las concentraciones de P4 plasmáticas, lo que 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 dehidroisoandosterona 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).

La principal proteína producida por las membranas corioalantoideas bovinas ha sido identificada como carboxil-propeptido o alfa-1colágeno tipo III; su expresión solo ocurre después del día 21 que coincide con el desarrollo de la alantoides, la cual se fusiona progresivamente con el corión para formar la placenta corioalantoidea (Shang et al., 1997).

Bibliografía

Aguilar B, Vos PLAM, Beckers JF, Hensen EJ, Dieleman SJ. The role of the major histocompatibility complex in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 1997; 47:111-120.

Anthony RV, Pratt SL, Liang R, Holland MD. Placental-fetal hormone interactions: Impact on fetal growth. *J Anim Sci.* 1995; 73:1861-1871.

Anthony RV, Liang R, Kay EP, Pratt SL. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. *J Reprod Fertil Suppl* 1995; 49: 83-95.

Artley JK, Braude PR, Johnson MH. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Hum Reprod.* 1992; 7: 1014-1021.

Asselin E, Goff AK, Bergeron H, 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* 1996; 54, 371-379.

Asselin E, Fortier MA. Trophoblastic interferons produced by the embryo modulate prostaglandins E2 (PGE2) production in bovine endometrial cells in vitro through induction of the cyclooxygenase-2 messenger. *Theriogenology.*

Austin KJ, Ward SK, Teixeira MG, Dean VC, Moore DW, Hansen TR. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. *Biol Reprod* 1996; 54, 600-606.

Badinga L, Thacher WW, Wilcox CJ, Morris G, Entwistle K, Wolfenson D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17b, progesterone and luteinizing hormone in lactating holstein cows. *Theriogenology* 1994; 42:1263-1274.

Bavister BD, Fischer BF. What is physiological oxygen tension for mammalian pre- and early postimplantation embryos? *J Reprod Fertil* 1991 (Abst. Ser.) 7:7.

Bazer FW, Spencer TE, Ott TL. Interferon tau: A novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:412-420.

Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 2009; 138: 195–209.

Ben-David E, Shemesh M. Ultrastructural localization of cytochrome P-450 scc in the placentome using protein A-gold technique. *Biol Reprod* 1989; 42:131-138.

Biggers BG, Geisert RD, Wetteman RP, Buchanan DS. Effect of heat stress on early embryonic development in the cow. *J Anim Sci.* 1987; 64 : 1512-1518.

Bindon BM. The role of the pituitary gland in implantation in the mouse: delay of implantation by hypophysectomy and neurodepressive drugs. *J Endocrinol* 1969; 43:225-235.

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).

Denker HW. Endometrial receptivity: Cell biological aspects of an unusual epithelium. A review. *Ann Anat* 1994; 176:53-60.

Dlaikan H, Hernández A, Cortés A. 1999. 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.* 1999; 31(2):197-203.

Dziadek M, Fujiwara S, Paulsson M, Timpl R. Immunological characterization of basement membrane types of heparan sulfate proteoglycan. *Embo J.* 1985; 4:905-912.

Ellintong JE. The oviduct and its role in reproduction : A review of literature. *Cornell Vet.* 1991; 81: 313-328.

Ectors FJ, Sulon J, Delval A, Remy B, Drion PV, Beckers JF. 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.* 1997; 32: 1-2.

Eriksson H. Regulation of growth factor expression via estrogens. In: *30 th Conference on physiology and pathology of Reproduction.* *Reprod Dom Anim* 1997; 32;1-2:195-198.

Frazier W, Glaser L. Surface components and cell recognition. *Annu Rev Biochem* 1979; 48: 491-523.

Freidman S, Gurevich M, Shemesh M. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin binding sites. *Biol Reprod* 1995; 52: 1020-1026.

Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Passoni L, 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 1992b.

Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Bianchi R, Passoni L. Role of the oviduct during early embryogenesis. In: Regulation of embryonic growth mechanisms in mammals. *Reprod Dom Anim*. 1993; 28, 4: 145-216.

Gaviria MT, Hernández A. 1994. Morphometry of implantation in the sheep. I. Trophoblast attachment, modification of the uterine lining, conceptus size and embryo location. *Theriogenology*. 1994; 41:1139-1149.

Granerus M, Petterson E, Gustafsson L, Lake M, Tally M, Schofield P, et al. Growth Factors in early embryogenesis In: Regulation of embryonic growth mechanisms in mammals. *Reprod Dom Anim*. 1993; 28, 4: 145- 216.

Gurevich M, Harel-Markowitz E, Marcus S, Shore LS, 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*. 1993; 5: 281-283.

Guillomot M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Supl*. 1995; 49:39.

Han SW, Lei ZM, 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, Blair RM. The role of lipoxigenase products of arachidonic acid metabolism in bovine corpus luteum function. *Reprod Dom Anim*.1996; 31: 427-429.

Hansen PJ. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology* 1997; 47:121-130.

Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Roles of growth factors during peri-implantation. *Mol Hum Reprod* 1995; 10:712-718.

Heap RB, Flint AP, Gadsby JE. Role of the embryonic signals in the establishment of pregnancy. *Br Med Bull* 1979; 35:129-135.

Hernández A. *Lecturas sobre Reproducción Bovina. III. Aspectos Morfofisiológicos de la Implantación.* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 1995.

Hernández, A, Rodríguez JM. Implantación embrionaria y reconocimiento materno de la gestación. En: *Reproducción en la vaca. Fisiología y aplicaciones.* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá. 2008.

Hue I, Degrelle SA, Turenne N. Conceptus elongation in cattle: Genes, models and questions. *Animal Reproduction Science* 2012; 134: 19–28 Humphrey KW. The induction of implantation in the mouse after ovariectomy. *Steroids* 1967; 0:591-600 1967.

Jerome F, Strauss III, Martinez F, Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis. Unique features and Unanswered question. *Biol Reprod* 1996; 54:303-311.

Jiménez L, Hernández, A. 1982. Morfología del alantocorion bovino entre los 27 y 88 días de gestación. *Rev. ACOVEZ (Bogotá-Colombia)* 9:32:44.

Kane MT, Carney EW, Ellington JE. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in sevelopment of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology* 1992; 38:297-313.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology.* 1997; 47:703-714.

Klasgbrum M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:217.

Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D, 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.* 1997; 32,1-2.

Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D, Waters MJ. Differential expression of the growth hormone receptor and its transcript in bovine uterus and placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 131:127-136.

Krebs C, Longo LD, Leiser R. Term ovine placental vasculature: Comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta.* 1997; 18: 43-51.

Leavit WW, Blaha GC. An estrogen-stimulated, progesterone-binding system in the uterus and vagina. *Steroids* 1972; 19:263-274.

Low BG, Hansen PJ, Drost M, Gogolin-Ewens KJ. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. *J Reprod Fertil.* 1990; 90:235-243.

Low BG, Hansen PJ. Immunosuppressive actions of steroids and prostaglandins secreted by the placenta and uterus of the cow and sheep. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 18:71-75.

Lunam CA, Murphy CR. Alterations in microvilli of uterine epithelial cells after colchicine treatment. *Z. Mikrosk-anat Forsch Leipzig.* 1983; 97: 1005-1008.

Luxford KA, Murphy CR. Changes in the apical microfilaments of rat uterine epithelial cells in response to estradiol and progesterone. *Anat Rec.* 1992b; 233: 521-526.

MacIntyre DM, Lim HC, Ryam K, Kimmins S, Small JA, MacLaren LA. Implantation-associated changes in bovine uterine expression integrins and extracellular matrix. *Biol Reprod.* 2002; 66:1430-1436.

Martal J, Chene N, Camous S, Huynh L, Lantier F, Hermier P, et al. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: The

role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev.* 1997; 9:355-380.

Matthew CL, Byatt JC, Currant TL, Curran DF, 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.* 1994; 50: 1136-1144.

Murphy CR. Structure of the plasma membrane of uterine epithelial cells in blastocyst attachment: a Review. *Reprod Fertil Dev.* 1992; 4: 633-643. Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. Estrogen induction of N-myc and c-myc protooncogen expression in the rat uterus. *Endocrinol* 1987; 120:1282-1288.

Murray MK, Sower SA. Estrogen- and Progesterone-Dependent secretory changes in the uterus of the sheep. *Biol Reprod.* 1992; 47: 917-924. Naivar KA, Ward SK, Austin KJ, Moore DW, Hansen TR. Secetion of bovine uterine proteins un response to type I interferons. *Biol Reprod.* 1995; 52: 848-854.

Niswender KD, Li J, Loos KR, Powell MR, Roberts RM, Keisler DH, et al. The effect of mutations near carboxyl terminus of interferon- on luteal lifespan in sheep. *Biol Reprod.* 1994; 50 (Suppl 1) :89 (Abst.138).

Oliveira LJ, Barreto RSN, Perecin F, Mansouri-Attia N, Pereira FTV, Meirelles FV. Modulation of Maternal Immune System During Pregnancy in the Cow. *Reprod Dom Anim* 2012; 47 (Suppl. 4), 384–393.

Paria BC, Song H, Dey SK. Implantation: molecular basis of embryouterine dialogue *Int J Dev Biol.* 2001; 45: 597-605.

Peippo J, Machaty Z, Peter A. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology* 2011; 76: 1373–1379.

Peter AT. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology* 2013; 80: 693–705.

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.* 1997; 32,1-2.

Pope WF. Uterine asynchrony : A cause of embryonic loss. *Biol Reprod.* 1982; 39: 999-1003.

Rao, ChV, Sanfilippo JS. New understanding in the biochemistry of implantation: Potential direct roles of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *The Endocrinologist* 1997; 7:2:107-111.

Rivas, PC, Rodríguez-Márquez, JM, Hernández, A. Cuantificación de células endoteliales que expresan VEGF, iNOS y eNOS en el endometrio ovino a los 20, 28 y 35 días de la gestación. *Rev col cienc pec .* 2007; 20(3):280-287.

Roberts RM, Xie S, Mathialagan N. Maternal Recognition of pregnancy. *Biol Reprod.* 1996; 54: 294-302.

Ryan DP, Blakewood EG, Lynn JW, Munyakazi I, Goke RA. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J Anim Sci* 1993; 70:3490-3497.

Shang WR, Dore JJE, Godkin JD. Developmental gene expression of procollagen III in bovine extraembryonic membranes during early pregnancy. *Mol Reprod Dev.* 1997; 48:18-24.

Shemesh M, Milaguir F, Ayalon N, Hansel W. Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J Reprod Fertil.* 1979; 56:181.

Shupnik MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod.* 1996; 54: 279-286.

Solomon, S. The primate placenta as an endocrine organ : Steroids In: E. Knobil JD, Neill GS, Greenwald CC, Market, Pfaff DW. (Ed.) *The Physiology of Reproduction* (2nd Ed.) pp 863-873. Raven Press, New York, 1994.

Sonkuti SG, Yuan L, Fritz MA, Lessey BA. Epidermal growth factor and sex steroids dynamically regulate a marker of endometrial receptivity in Ishikawa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 62, 7 : 2192-2197.

Spencer TE, Ott TL, Bazer FW. Interferon: Pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc Exp Biol Med.* 1996; 213: 215-229.

Strauss III, JF, Martinez F, Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: Unique features and unanswered questions. *Biol Reprod.* 1996; 54: 303-311.

Strydom DJ, Bond MD, Vallee BL. An angiogenic protein from bovine serum and milk-purification and primary structure of angiogenin-2. *Eur J Bioch.* 1997; 247:535-544.

Tabibzadeh S, 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.

Taylor CM, Stevens H, Anthony FW, Wheeler T. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines. *Placenta.* 1997; 18:451-458.

Templeton JW, Tipton RC, Garber T, Bondioli K, Kraemer DC. Expression and genetic segregation of parental BoLA serotypes in bovine embryos. *Anim Genet.* 1987; 18:317-322.

Thatcher WW, Bartol FF, Knickerbocker J, Curl JS, Wolfenson D. Maternal recognition of pregnancy in cattle. *J Dairy Sci.* 1984; 67:2797-2811.

Thatcher WW, Danet-Desnoyers G, Wetzels C. Regulation of bovine endometrial prostaglandin secretion and the role of bovine trophoblast protein-1 complex. *Reprod Fertil Dev.* 1992; 4:329-334.

Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples CR, Ambrose JD, Coelho S. Anti-luteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology.* 1997; 47:131-140.

Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GS. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev.* 1992; 31: 87-95.

Walters MR, Clark JH. Cytosol progesterone receptors of the rat uterus: assay and receptor characteristics. *J Steroid Biochem.* 1977; 8:1137-1144.

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.

Weisz A, Cicatiello LM, Persico E, Scalona M, Bresciani F. Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogen. *Molec Endoc.* 1990; 4:1041- 1050.

Wijayagunawardane MPB, Cerbito WA, Miyamoto A, Acosta TJ, Takagi M, Miyazawa K. et al. Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. *Theriogenology* 1996; 46, 1149-1158.

Wooding FBP. Current topic: the synepiteliochorial placenta of ruminants binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta.* 1992; 13:101-113. 1992.

Wrenzycki, C., Hermann, D., Lemme, E., Eckert, J., Carnwath, J.W. and Heilmann, H. Expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos generated in vitro. *Theriogenology.* 1997.

