



Veterinaria México

ISSN: 0301-5092

[rmp@servidor.unam.mx](mailto:rmp@servidor.unam.mx)

Universidad Nacional Autónoma de México  
México

Betancourt Alonso, Miguel Ángel; Flores Pérez, Fernando I.; Rosas Velasco, César; Pérez Martínez, Mario

Papel de las citocinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos

Veterinaria México, vol. 37, núm. 3, julio-septiembre, 2006, pp. 335-350

Universidad Nacional Autónoma de México

Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42337306>

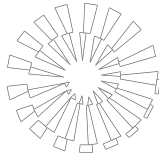
- [Cómo citar el artículo](#)
- [Número completo](#)
- [Más información del artículo](#)
- [Página de la revista en redalyc.org](#)

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



## Papel de las citocinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos

## Role of cytokines in embryo implantation in domestic mammals

Miguel Ángel Betancourt-Alonso\* Fernando I. Flores-Pérez\*\* César Rosas-Velasco\*  
Mario Pérez-Martínez\*

---

### Abstract

In the embryo implantation process there are various molecular mediators, including cytokines and growth factors, which act in an autocrine, paracrine, or juxtacrine manner. Although we know that the interactions between these factors are necessary, as a whole and in chronological order, their precise participation is not yet known in the different stages of early embryonic development. In this article we review different aspects related to the functional participation of cytokines, identified up to this point, in embryo implantation in domestic mammals such as interferon-*tau* (IFN- $\tau$ ) in ruminants, transforming growth factor (TGF) in pigs, and insulin growth factor (IGF) in horses.

**Key words:** CYTOKINES, EMBRYO IMPLANTATION, MAMMALS.

### Resumen

En el proceso de la implantación embrionaria existen mediadores moleculares que incluyen citocinas y factores del crecimiento, que actúan de manera autocrina, paracrina o yuxtacrina. Aunque sabemos que las interacciones entre estos factores son necesarios de manera integrativa y cronológica, su participación precisa aún no se conoce en las distintas etapas del desarrollo embrionario temprano. En esta revisión se abordan diferentes aspectos relacionados con la participación funcional de las citocinas identificadas hasta el momento, en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos, como el interferón-tau (IFN- $\tau$ ) en rumiantes, y los factores de crecimiento transformante (TGF) en cerdos y de crecimiento insulínico (IGF) en caballos, respectivamente

**Palabras clave:** CITOCINAS, IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA, MAMÍFEROS.

---

Recibido el 29 de septiembre de 2005 y aceptado el 22 de marzo de 2006.

\*Departamento de Morfología, Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción "Rosa E. Lavielle", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Autor para correspondencia: Mario Pérez-Martínez.

\*\*Campo experimental de Desarrollo e Investigación Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

## Introduction

The experimental evidence obtained up until now suggests that the immunological system is a local regulator of ovarian functions, which are essentially modulated by gonadotropins. Specifically, several studies have demonstrated that a variety of cytokines regulate the reproductive processes and have been implicated as regulators of gonad steroid secretion, function of the *corpus luteum*, embryo development and implantation.<sup>1</sup>

Cytokines are low molecular weight soluble glycoproteins that are generally monomers, with short life, that are found in low concentrations under physiological concentrations, which are synthesized by a great variety of cells as a response to a specific signal and coordinate the interactions between cells.<sup>2</sup>

These molecules have been classified according to their mode of action into: 1) Growth factors, such as erythropoietin (EPO), granulocyte-macrophages colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), stem cell colony stimulating factor (SC-CSF), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), tumor necrosis factor beta (TNF- $\beta$ ), leukemia inhibiting factor (LIF), transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), Heparin-bound epidermis growth factor (HB-EGF), fibroblast growth factor (FGF),<sup>3,4</sup> 2) Interleukin (IL): IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14;<sup>3,4</sup> 3) Interferons (IFN): IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ ;<sup>3,4</sup> and 4) Chemokines: interferon induction protein 10, lymphotactin, melanoma growth stimulating factor, monocyte activating and chemo-tactic factor, macrophage inflammatory protein 1-alpha and macrophage inflammatory protein 1-beta.<sup>3,4</sup>

### ***Tissue changes during early pregnancy***

Embryo implantation is a key action of the reproductive physiology in mammals, and it is the result from a series of complex tissue processes that is initiated with fixation of the blastocyst in the uterus and ends with the definitive formation of the placenta. During embryo implantation frequent alterations appear in domestic animals and up until now their molecular cause is unknown. Implantation success depends on two essential factors: the existence of an implantation-capable blastocyst, and at the same time the development of an endometrium that can receive the blastocyst.<sup>5,6</sup>

These two actions are regulated by the ovarian steroid hormones: estrogen and progesterone. After the embryo has fixed, a signaling process between

## Introducción

Las evidencias experimentales obtenidas hasta el momento indican que el sistema inmunológico es un regulador local de las funciones ováricas, las cuales son esencialmente moduladas por las gonadotropinas. De manera específica, numerosos estudios han demostrado que una variedad de citocinas regulan los procesos reproductivos y están implicados como reguladores de la secreción esteroide gonadal, función del cuerpo lúteo, desarrollo embrionario e implantación.<sup>1</sup>

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular, solubles, generalmente monoméricas, con vida media corta, que se encuentran en muy bajas concentraciones en condiciones fisiológicas, que son sintetizadas por gran variedad de células como respuesta a una señal determinada y que coordinan las interacciones entre las células.<sup>2</sup>

Estas moléculas han sido clasificadas de acuerdo con su modo de acción en: 1) Factores del crecimiento, donde se encuentra la eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias macrófago-granulocitos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias de células madre (SC-CSF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), factor beta de necrosis tumoral (TNF- $\beta$ ), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento epidérmico unido a la heparina (HB-EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF),<sup>3,4</sup> 2) interleucinas (IL): IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14;<sup>3,4</sup> 3) interferones (IFN): IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ ;<sup>3,4</sup> y 4) quimiocinas: la proteína 10 inductora de interferón, linfotactina, factor estimulante de crecimiento de melanoma, factor activador y quimiotáctico de monocitos, proteína 1 alfa-inflamatoria de macrófagos y proteína 1 beta-inflamatoria de macrófagos.<sup>3,4</sup>

### ***Cambios tisulares durante la gestación temprana***

La implantación embrionaria es una acción clave de la fisiología reproductiva en los mamíferos y es resultado de una serie de procesos tisulares complejos que se inicia con la fijación del blastocisto en el útero y termina con la formación definitiva de una placenta. Durante la implantación embrionaria, con frecuencia se presentan alteraciones en los animales domésticos y a la fecha se desconocen las causas moleculares de estas fallas. Para que la implantación se efectúe con éxito se requieren dos factores esenciales: la existen-

blastocyst and uterus commences; in it the formation of the placenta is initiated (Table 1).<sup>7</sup>

In the dialogue between embryo and uterus several factors are involved such as prostaglandins, leukotrienes, growth factors, cytokines and ovarian steroid hormones.

Under normal conditions, the embryo expresses paternal antigens, but it is not rejected by the immunological system of the mother. Studies in mice and humans have demonstrated that the immune modulating mechanisms are present during the period surrounding implantation. The embryo escapes destruction by effector cells of the immunological system first by atypical expression of the major histocompatibility complex (MHC) as HLA-G,<sup>8,9</sup> that protect the invasiveness of the trophoblast against the attack of cytotoxic lymphocytes<sup>10</sup> and natural killer cells.<sup>11</sup>

Later, the embryo synthesizes factors that prevent the local activation of cytotoxic cells and induce changes in the phenotype of leucocytes,<sup>12,13</sup> and this stimulates the production of cytokines. After the inactivation of some immunological functions, the paracrine-autocrine messengers produced by leucocytes, uterine cells and the embryo induce a change in the responses of Th2 and the production of growth factors in the mother-embryo relationship.<sup>14,15</sup> The interaction of these actions ensure not only the survival of the embryo, but also its growth.

Recently it has been proposed that progesterone has a relevant role as immune modulation molecule,

cia de un blastocisto capaz de implantarse, y al mismo tiempo, el desarrollo de un endometrio que sea receptivo a ese blastocisto.<sup>5,6</sup>

La regulación de estas dos acciones está a cargo de las hormonas esteroides ováricas: estrógenos y progesterona. Después de la fijación del embrión, empieza un proceso de señalización entre el blastocisto y el útero; en éste da inicio la formación de la placenta (Cuadro 1).<sup>7</sup>

En el diálogo entre el embrión y el útero se encuentran involucrados varios factores, como las prostaglandinas, leucotrienos, factores del crecimiento, citocinas y hormonas esteroides ováricas.

En condiciones normales, el embrión expresa antígenos paternos, pero éste no es rechazado por el sistema inmunológico de la madre. Estudios en ratones y humanos han demostrado que los mecanismos inmunomoduladores están presentes durante el periodo de periimplantación. El embrión escapa de la destrucción por células efectoras del sistema inmunológico, primero por la expresión atípica del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), como la HLA-G,<sup>8,9</sup> que protegen la invasividad del trofoblasto contra el ataque de linfocitos citotóxicos<sup>10</sup> y células asesinas naturales.<sup>11</sup>

Posteriormente, el embrión sintetiza factores que previenen la activación local de células citotóxicas, que inducen cambios en el fenotipo de leucocitos,<sup>12,13</sup> y esto estimula la producción de citocinas. Después de la inactivación de algunas funciones inmunológicas, los mensajeros paracrin-autocrin producidos por

**Cuadro 1**

DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES EN LA DURACIÓN DEL ESTADO DE BLASTOCISTO, TIEMPO DE ENTRADA AL ÚTERO, INICIO DE LA IMPLANTACIÓN Y TIPOS DE PLACENTACIÓN<sup>79</sup>

DIFFERENCES BETWEEN SPECIES IN THE DURATION OF THE BLASTOCYST STAGE, TIME OF ENTRY INTO THE UTERUS, INITIATION OF IMPLANTATION AND TYPES OF PLACENTA FORMATION<sup>79</sup>

<i>Species</i>	<i>Blastocyst (day)</i>	<i>Entry to uterus (day)</i>	<i>Implantation (day)</i>	<i>Placenta (histology)</i>
Humans	4-5	4-5	6.5-20	Hemochorial
Cattle	8-9	3-4	17-20	Epitheliochorial
Ovine	6-7	2-4	15-16	Epitheliochorial
Goats	6-7	2-4	15-16	Epitheliochorial
Swine	5-6	2-2.5	11-14	Epitheliochorial
Horses	8-9	4-10	28-40	Epitheliochorial
Dogs	5-6	8-15	17-21	Endotheliochoria
Cats	5-6	4-8	13-14	Endotheliochoria
Rabbits	3	3	7	Hemochorial
Rat	4	2-3	5	Hemochorial
Mouse	5	3.5	5	Hemochorial

since progesterone-specific receptors have been identified in lymphocytes of pregnant women. These findings suggest a relationship between the expression of the progesterone receptor in the lymphocytes and the stage of pregnancy.<sup>16</sup>

### **Recently discovered functions of cytokines at the onset of pregnancy in domestic mammal species**

#### **Ruminants**

Some studies have concentrated on the immunomodulating events during the period around embryo implantation in domestic ruminants.<sup>17</sup> It has been reported that in these domestic species, due to the placenta type they have, which is less invasive than that of rodents, the role of the maternal immunological system does not have a determinant role in the success of pregnancy.<sup>17</sup>

Interferons (IFN) that are synthesized by the trophoblast were first detected in ruminants<sup>18-22</sup> and later reported in other species.<sup>23,24</sup> In ruminants, interferon-tau (IFN- $\tau$ ), known as trophoblastin or trophoblast protein-1 (TP-1), has been considered as the molecule responsible of emitting the recognition signals during pregnancy. Interferon-tau prevents luteolysis, at least in part by the inhibition of the expression of estrogen receptors.<sup>25,26</sup> In sheep, the peak of expression of this molecule occurs exactly two days before embryo implantation occurs (day 15). As well as other interferons, interferon-tau inhibits cellular proliferation<sup>27,28</sup> and presents antiviral activity, although it has a reduced cytotoxic activity when compared to other interferons.<sup>29</sup>

It has been observed that progesterone is required by IFN- $\tau$ , as they act together to generate an anti-luteolytic activity.<sup>30</sup> This steroid hormone also stimulates the synthesis of that protein.<sup>31</sup>

Another property of IFN- $\tau$  is that it stimulates the expression of cycle-oxygenase-2 (COX-2), as well as the production of PGE<sub>2</sub> in cultures of epithelial and uterine stroma epithelium.<sup>32</sup> Because PGE<sub>2</sub> stimulates the expression of GM-CSF,<sup>33,34</sup> it has been demonstrated that interferon-tau stimulates GM-CSF indirectly in uterine lymphocytes due to the presence of PGE<sub>2</sub> in endometrial cells.<sup>34</sup> It has also been reported that IFN- $\tau$  presents several forms at the moment of expression within the embryo of cattle and sheep, up to the initiation of placenta formation.<sup>35,36</sup>

In the sheep, the molecule is synthesized in the trophoectoderm and secreted between days 10 and 23 of pregnancy. It also acts in a paracrine manner in the epithelium of the endometrium and the glandular epithelium by inhibiting the transcription of genes

leucocitos, células uterinas, y el embrión inducen un cambio entre las respuestas de Th2 y la producción de factores del crecimiento entre la relación madre-embrión.<sup>14,15</sup> La interacción de estas acciones aseguran no solamente la sobrevivencia del embrión, sino también su crecimiento.

Recientemente se ha propuesto que la progesterona tiene un papel relevante como molécula inmunomoduladora, pues se han identificado receptores específicos a la progesterona en linfocitos de mujeres gestantes, estos hallazgos sugieren una relación entre la expresión del receptor a progesterona en los linfocitos y el estado de gestación.<sup>16</sup>

### **Funciones recientemente conocidas de las citocinas en el inicio de la gestación en especies de mamíferos domésticos**

#### **Rumiantes**

Algunos estudios se han concentrado sobre los eventos inmunomoduladores durante el periodo de periimplantación en rumiantes domésticos.<sup>17</sup> Se ha mencionado que en estas especies domésticas, debido al tipo de placentación que presentan, que es menos invasiva a la de los roedores, el papel del sistema inmunológico materno no juega un papel tan determinante para el éxito de la gestación.<sup>17</sup>

Los interferones (IFN) sintetizados por el trofoblasto se detectaron primero en rumiantes<sup>18-22</sup> y más tarde se encontraron en otras especies.<sup>23,24</sup> En rumiantes, el interferón-tau (IFN- $\tau$ ), conocido como trofoblastina o proteína trofoblástica-1 (TP-1), se ha considerado como la molécula encargada de emitir las señales de reconocimiento de la gestación. El interferón-tau previene la luteólisis, al menos en parte por la inhibición de la expresión de receptores a estrógenos.<sup>25,26</sup> El pico de expresión de esta molécula en la oveja se da justamente dos días antes de que la implantación se lleve a cabo (día 15), así como otros tipos de interferones, el interferón-tau inhibe la proliferación celular<sup>27,28</sup> y también exhibe actividad antiviral, aunque éste tiene una actividad citotóxica menor a la de otros interferones.<sup>29</sup>

Se ha observado que la progesterona es requerida por el IFN- $\tau$ , ya que actúan de manera conjunta para generar una acción antiluteolítica;<sup>30</sup> esta hormona esteroideal estimula también la síntesis de dicha proteína.<sup>31</sup>

Otra propiedad del IFN- $\tau$  consiste en que estimula la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la producción de la PGE<sub>2</sub> en cultivos de células del epitelio y del estroma uterino.<sup>32</sup> Debido a que la PGE<sub>2</sub> estimula la expresión de GM-CSF,<sup>33,34</sup> se ha demostrado que el interferón-tau estimula al GM-CSF indirectamente

coding estrogen and oxytocin receptors *in vivo*.<sup>26</sup> Also in this species the participation of IGF-I and II has been observed, as well as their receptors that are located in the endometrium and the embryo.<sup>37,38</sup> Furthermore, it has been reported that IGF-I stimulates the growth of the embryo during its transport in the oviduct, while IGF-II participates in placental development.<sup>39</sup>

On the other hand, LIF participates in this species by maintaining the development of the embryo, which has been reported to be controlled by the secretion of estradiol and progesterone.<sup>40</sup>

In goats, EGF has been detected in the glandular and luminal epithelium during days 22 to 30 of pregnancy, while TGF- $\alpha$  is expressed in epithelial cell and uterine stroma.<sup>41</sup>

IL-1 also participates in this molecular dialogue, with two agonists IL- $\alpha$  and IL- $\beta$  and one antagonist: the antagonist receptor IL-1 (IL-1RA).<sup>42, 43</sup> There is evidence of the production of IL- $\beta$  during early gestation, both by the embryo as well as by the uterine epithelium. This interleukin has been seen to regulate the development of the embryo in cattle *in vivo* and that the nature of this regulation depends on the density of the embryo.<sup>44</sup> The expression of other components of IL-1 in the reproductive tract of cattle and within the embryo is still to be determined.

It has been shown that during the initial stage of gestation in ruminants there are chemotactic proteins known as monocyte chemotactic protein 1 and 2 (MCP-1 and -2) that recruit natural killer cells towards the uterus. These proteins that are produced by eosinophils are attracted to the gestating uterus and produce several growth factors and cytokines favorable for the recognition and establishment of gestation.<sup>45</sup>

### Swine

In the sow, between days 10 and 25 of gestation, the morphology of the embryo changes rapidly from a spherical form to a filament one. These changes are regulated through a communication between the embryo and the dam, as mentioned previously. During the adhesion period of the embryo, the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in its three isoforms (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) and the TGF- $\beta$ s receptors are synthesized by the embryo and are independent of the TGF- $\beta$  receptors of the dam.<sup>46,47</sup> The expression of the genes that code for these proteins is induced by themselves through autocrine and paracrine interactions.<sup>48,49</sup>

The expression of TGF- $\beta$ 1 increases between days 12 and 14 of gestation, while it is not as marked in other growth factors. These growth factors participate in cellular proliferation, cellular differentiation,

en linfocitos uterinos debido a la PGE<sub>2</sub> en células endometriales.<sup>34</sup> También se ha visto que el IFN- $\tau$  presenta varias formas al momento de expresarse en el embrión del bovino y el ovino, hasta el inicio de la placentación.<sup>35,36</sup>

En el ovino esta molécula es sintetizada en el trofoectodermo y secretada entre los días 10 y 23 de la gestación, y actúa de manera paracrina en el epitelio del endometrio y en el epitelio glandular inhibiendo la transcripción de genes de receptores hacia estrógenos y oxitocina *in vivo*.<sup>26</sup> En esta especie también se ha observado la participación de IGF-I y II y sus respectivos receptores, los cuales se han localizado en el endometrio y en el embrión.<sup>37,38</sup> Asimismo, se ha visto que IGF-I estimula el crecimiento del embrión durante su transporte por el oviducto, mientras que IGF-II participa en el desarrollo placentario.<sup>39</sup>

Por otra parte, el LIF participa en esta especie manteniendo el desarrollo del embrión, en donde se ha visto que es controlado por la secreción de estradiol y progesterona.<sup>40</sup>

En las cabras se ha detectado EGF en el epitelio glandular y luminal durante los días 22 a 30 de gestación, mientras que el TGF- $\alpha$  se expresa en células epiteliales y en el estroma uterino.<sup>41</sup>

La IL-1 también participa en este diálogo molecular, presentando dos agonistas: IL- $\alpha$  y IL- $\beta$ , y un antagonista: el receptor antagonista a IL-1 (IL-1RA).<sup>42,43</sup> Durante la gestación temprana, existe evidencia de la producción de IL- $\beta$ , tanto por el embrión como por el epitelio uterino. Por lo que se ha visto que esta interleucina regula el desarrollo de embriones bovinos *in vitro* y que la naturaleza de esta regulación depende de la densidad del embrión.<sup>44</sup> La expresión de otros componentes de la IL-1 en el aparato reproductor bovino y el embrión, permanecen por ser determinadas.

Durante el periodo inicial de la gestación en los ruminantes se ha visto que existen proteínas quimiotácticas conocidas como proteínas quimiotácticas de monocitos 1 y 2 (MCP 1 y 2) que reclutan células asesinas naturales hacia el útero; estas proteínas producidas por eosinófilos son atraídas al útero gestante y producen diversos factores del crecimiento y citocinas favorables para el reconocimiento y establecimiento de la gestación.<sup>45</sup>

### Porcinos

En la cerda, entre los días 10 y 25 de gestación, la morfología del embrión cambia rápidamente de una forma esférica a filamentosa. Estos cambios son regulados a través de una comunicación entre el embrión y la madre, como ya se mencionó. Durante el periodo de adhesión del embrión, el factor de crecimiento trans-

modification of integrins and extracellular matrix proteins, tissue repair, angiogenesis and immunosuppression.<sup>50</sup> All of these actions occur during the early gestation period as well as during the estrous cycle.

During the implantation period, the capacity of the embryo to modulate the uterine environment is restricted to a specific period,<sup>51</sup> pig embryos also produce interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) which can influence maternal production of IL-6 and GM-CSF.<sup>34, 52, 53</sup>

It seems that the presence of IL-6 in gestating dams coincides with the production of IFN- $\gamma$ , TGF $\beta$ 2 and PGE2 during the implantation period; therefore, the presence of the embryo could be responsible for the expression of IL-6.<sup>54</sup>

### Horses

In this species the insulin-like growth factor (IGF) has an important role as it has been documented that IGF-II participates in the implantation and placenta-forming in this species.<sup>55</sup> Another associated growth factor is the insulin-like growth factor-bound protein 3 (IGFBP3) that is expressed from day ten of gestation onwards. It seems its function is to increase the size of the horse embryo.<sup>56</sup>

It has been reported that TGF- $\beta$ 1 accumulates in epithelial and glandular cells of the horse endometrium at the time implantation occurs. This has led to think that the factor regulates growth and differentiation of the trophoblast,<sup>57</sup> together with TNF- $\alpha$ . This factor is also produced by the invasive trophoblast between days 30 and 55 of gestation. It has been reported that TNF- $\gamma$  also participates in regulating leukocyte populations.<sup>58</sup>

Furthermore, IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  have been observed to be expressed within the endometrial cups and the uterine tubes during gestation, although it has been noted that this particular IFN- $\gamma$  is not indispensable for the invasion of the trophoblast in this specie.<sup>58</sup>

### Canines

Few research studies have been carried out in canine species. Up until now, plasmatic concentration of proteins have been measured in gestating bitches between days 28 and 37 of gestation.<sup>59</sup> It was reported that these only increase when there is an inflammatory process, an infection or neoplasia. In these studies, emphasis was made in the fact that the increase of these proteins in plasma occurs as a response to the adhesion of the blastocyst, and that this contact with the uterus causes an antigenic reaction. In this phase an increase in IL-6 and TNF has also been detected.<sup>60</sup>

formante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en sus tres isoformas (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3) y sus receptores TGF- $\beta$ s, son sintetizados por el propio embrión y son independientes de los receptores TGF $\beta$  de la madre.<sup>46, 47</sup> La expresión de los genes que codifican para estas proteínas es inducida por ellos mismos a través de interacciones auto-crinas y paracrinas.<sup>48, 49</sup>

La expresión de TGF $\beta$ -1 se incrementa entre los días 12 y 14 de la gestación, mientras que en los otros factores del crecimiento no es tan marcado este incremento; estos factores del crecimiento participan en la proliferación celular, diferenciación celular, modificación de las integrinas y proteínas de la matriz extracelular, reparación de los tejidos, angiogénesis e inmunosupresión.<sup>50</sup> Todas estas acciones ocurren durante el periodo de gestación temprana e incluso durante el ciclo estral.

Durante este periodo de implantación, la habilidad de los embriones para modular el ambiente uterino está restringida a un periodo específico,<sup>51</sup> los embriones porcinos también secretan interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que a su vez puede influir en la producción materna de IL-6 y GM-CSF.<sup>34, 52, 53</sup>

Al parecer la presencia de IL-6 en cerdas gestantes coincide con la secreción de IFN- $\gamma$ , TGF $\beta$ 2 y PGE2 durante el periodo de implantación; por lo que se puede decir que la presencia del embrión es responsable de la expresión de la IL-6.<sup>54</sup>

### Equinos

En esta especie el factor de crecimiento insulínico (IGF) tiene importante participación, ya que se ha visto que el IGF-II participa en la implantación y en la placentación de esta especie;<sup>55</sup> otro factor de crecimiento que participa es el factor de crecimiento similar a la insulina, unido a la proteína 3 (IGFBP3), que se expresa a partir del día diez de la gestación en adelante; al parecer, su función es la de agrandar al embrión equino.<sup>56</sup>

Se ha visto que el TGF- $\beta$ 1 se acumula en las células epiteliales y glandulares del endometrio del equino en el momento en que ocurre la implantación, esto último conduce a pensar que tal factor regula el crecimiento y diferenciación del trofoblasto,<sup>57</sup> junto con el TNF- $\alpha$ , que también es secretado por el trofoblasto invasivo entre los días 30 y 55 de gestación, se ha visto que el TNF- $\alpha$  participa también en la regulación de las poblaciones de leucocitos.<sup>58</sup>

Por último, se ha observado que la IL-2, IL-4 y el IFN- $\gamma$  se expresan en las copas endometriales y en las tubas uterinas durante el periodo de gestación, aunque se ha detectado que este IFN- $\gamma$  no es indispensable para la invasión del trofoblasto en esta especie.<sup>58</sup>

## Rodents and lagomorphs

Due to the fact that these species are widely used as models for biomedical research, there is more information about the behavior of these molecules during early gestation (Table 2).

It has been reported that in rodents there are different molecules that intervene in the embryo implantation process, such as the leukemia inhibiting factor (LIF), colony stimulating factors, epidermal growth factors (EGF), transforming growth factor  $\alpha$  and  $\beta$  (TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ), that have been strongly implicated in uterine regulation for remodeling, implantation and placenta-formation. In this context, the coordinated action of these molecules on uterine and extra-embryo cells seems to be a fundamental mechanism for maintaining gestation and its success (Table 2).<sup>61</sup>

It has been demonstrated that in rodents implantation is facilitated by a transitory increase of estrogen that helps implantation through factors such as LIF, which is expressed in the mouse at the level of glandular epithelium at the time of ovulation and day four of gestation.<sup>62</sup>

The increase in estrogen in mice at day four of gestation induces the synthesis of transcription factors, cell growth and proliferation factors in the stroma of uterine cells. Transcription of LIF is regulated by the glandular epithelium after one hour after the administration of estrogens, and persists after five to six hours later.<sup>63</sup> Mice that experimentally do not have this factor do not respond to the presence of the blastocyst; therefore, the luminal epithelium enters into an apoptosis process. These LIF-deficient mice, when the factor is administered via an intraperitoneal injection, do not fail in embryo implantation.<sup>63</sup> This reveals

## Caninos

Respecto de las especies caninas, han sido escasas las investigaciones realizadas. Hasta el momento, se han medido concentraciones plasmáticas de proteínas en perras gestantes entre los días 28 y 37 de gestación<sup>59</sup> y se ha observado que éstas sólo se incrementan cuando existe un proceso de inflamación, infección y crecimiento neoplásico; en estas investigaciones se hizo énfasis en que el aumento de estas proteínas a nivel plasmático, se da como respuesta a la adhesión del blastocisto y que ese contacto con el útero provoca una reacción antigénica; también se han detectado en esta fase aumentos de IL-6 y TNF.<sup>60</sup>

## Roedores y lagomorfos

Debido a que estas especies son ampliamente utilizadas como modelos en la investigación biomédica, es ahí donde más información se ha obtenido del comportamiento de estas moléculas durante la gestación temprana (Cuadro 2).

En los roedores se ha informado de diferentes moléculas que intervienen en el proceso de implantación embrionaria, como el factor inhibidor de la leucemia (LIF), factores estimuladores de colonias, factores del crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF  $\alpha$  y TGF $\beta$ ), que han sido fuertemente implicados en la regulación uterina tanto para su remodelación, implantación y placentación. En este contexto, la acción coordinada de estas moléculas sobre las células uterinas y extra-embriónicas parece ser un mecanismo fundamental para que la gestación se mantenga y sea exitosa (Cuadro 2).<sup>61</sup>

En los roedores se ha demostrado que la implant-

**Cuadro 2**

EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE CITOCINAS EN DIFERENTES TEJIDOS DE ROEDORES  
EXPRESSION AND FUNCTION OF CYTOKINES IN DIFFERENT RODENT TISSUES

<i>Cytokine</i>	<i>Tissue</i>	<i>General function</i>
CTGF	EL and EG	Distributes several structures of the embryo <sup>61</sup>
LIF	EGF	Essential for initiating implantation <sup>62</sup>
TGF- $\beta$ 1	EL, EG and decidua	Cell growth, differentiation and migration <sup>67</sup>
TGF- $\beta$ 2	EL and EG	Cell growth, differentiation and migration <sup>67</sup>
TGF- $\beta$ 3	Myometrium	Cell growth, differentiation and migration <sup>67</sup>
HB-EGF	EL and EG	Mediator of blastocyst adhesion <sup>68,69</sup>
EGF	EL and EG	Local mediator in the embryo-uterus interaction <sup>70</sup>
INF- $\gamma$	EL	Remodels uterine arteries <sup>73-76</sup>
IGF-I	EL and EG	Regulates endocrine mechanisms <sup>80</sup>
IGF-II	Myometrium	Promotes fetal growth and development <sup>81</sup>

that LIF is essential for the initiation of implantation, but it is not required for embryo development or maintaining gestation (Table 3).<sup>63</sup>

It has been shown that in the rabbit the production of LIF is stimulated by progesterone, contrary to the effects of estrogen; therefore, it is evident that the progesterone requirements are essential for the implantation of rabbit blastocyst. The synthesis of LIF starts to increase at day three and reaches its peak level during days five and six, although the mechanism by which progesterone directly or indirectly regulates LIF is not yet fully known.<sup>64</sup>

Steroid hormones have been also seen to control in mice the expression of ligands in the EGF family as well as their receptors in the gestating uterus.<sup>65</sup> This interaction results from the cellular differentiation or proliferation of the epithelium and stroma. Recent research has shown that the expression of the estrogen receptors occurs temporarily and specifically. At day two, it is located primarily in the glandular and luminal epithelium; at days three and four it is found accumulated in the cells of the stroma, as well as present in the epithelium. From day six to eight of gestation the accumulation of ER-alpha RNAm is located in the second decidua zone and more abundantly in the sub-epithelial cells of the mesometrial pole. Here the distribution of EGF Is similar to that of ER RNAm indicating that EGF is probably involved in the signaling pathway of estrogen that regulates cellular proliferation and differentiation.<sup>66</sup>

In mice, TGF- $\alpha$  and the heparin-bound epidermis growth factor (HB-EGF) are expressed within the uterus at the time implantation occurs. TGF- $\alpha$  is manifested in large quantities in the uterus of this species during the period around implantation; nevertheless, its role in this stage is questionable because in mice without TGF- $\alpha$  are apparently fertile, although it is possible that the absence of TGF- $\alpha$  is compensated by other members of the EGF family.

acción es facilitada por un aumento transitorio de estrógenos, que ayuda a la implantación a través de factores como el LIF que se expresa en el ratón a nivel del epitelio glandular al momento de la ovulación y en el cuarto día de gestación.<sup>62</sup>

El aumento de estrógenos al cuarto día de la gestación del ratón induce la síntesis de factores de transcripción, factores del crecimiento y proliferación celular en el estroma de las células uterinas. La transcripción del LIF es regulada en el epitelio glandular después de una hora de haber administrado estrógenos, esta expresión persiste después de cinco a seis horas.<sup>63</sup> Los ratones que experimentalmente carecen de este factor no responden al blastocisto, por lo que el epitelio luminal entra en un proceso de apoptosis. A estos ratones deficientes del LIF se les administra una inyección vía intraperitoneal de este factor al inicio de la gestación para evitar la falla en la implantación, ello revela que durante el ciclo de vida del ratón, el LIF es esencial para el inicio de la implantación, pero no es requerida para el desarrollo embrionario o para el mantenimiento de la gestación (Cuadro 3).<sup>63</sup>

En el conejo se ha demostrado que la producción del LIF es estimulada por la progesterona, lo que es contrario al efecto de los estrógenos, por lo que es evidente que los requerimientos de progesterona son esenciales para la implantación del blastocisto de conejo. La síntesis del LIF empieza a incrementarse el día tres y alcanza sus niveles más altos durante los días cinco y seis, aunque el mecanismo por el cual la progesterona regula el LIF ya sea de manera directa o indirecta aún no se conoce plenamente.<sup>64</sup>

También se ha visto que en el ratón las hormonas esteroidales controlan la expresión de los ligandos de la familia del EGF y sus receptores en el útero gestante.<sup>65</sup> Esta interacción resulta de la diferenciación o proliferación celular del epitelio y del estroma. Investigaciones recientes han mostrado que la expresión del receptor de estrógenos (ER) ocurre de manera

**Cuadro 3**

CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA FALTA DE CITOCINAS EN EL INICIO DE LA GESTACIÓN EN RATONES *KNOCKOUT*

PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES OF THE LACK OF CYTOKINES AT THE START OF GESTATION IN *KNOCK-OUT* MICE

<i>Missing cytokine</i>	<i>Consequence</i>
CSF-M	Blastocyst with less number of cells <sup>1</sup>
GM-CSF	Blastocyst with less number of cells <sup>1</sup>
LIF	Failure at implantation <sup>62</sup>
TGF- $\alpha$	High levels of apoptosis <sup>67</sup>
EGF-R	Failure at implantation <sup>70</sup>
IGF-II	Deficient development of organs <sup>81</sup>

ER is induced in the uterine epithelium at day four, and it seems to be an important activator of erbB1 in the uterus and blastocyst, as it has an intra-uterine communication role.<sup>67</sup>

The HB-EGF is apparently highly relevant in the implantation process, since it is expressed in the luminal epithelium surrounding the blastocyst between six and seven hours after its contact with the uterine wall. This suggests that the signals from the blastocyst induce the luminal epithelium to express HB-EGF.<sup>68</sup>

Both erbB1 and erbB4 are expressed within the blastocyst of mice through the interaction with HB-EGF. In general, the expression of multiple ligands and receptors of the EGF family could be a mechanism of protection that ensures a high probability that the embryo develops and implants in the uterine epithelium.<sup>69</sup>

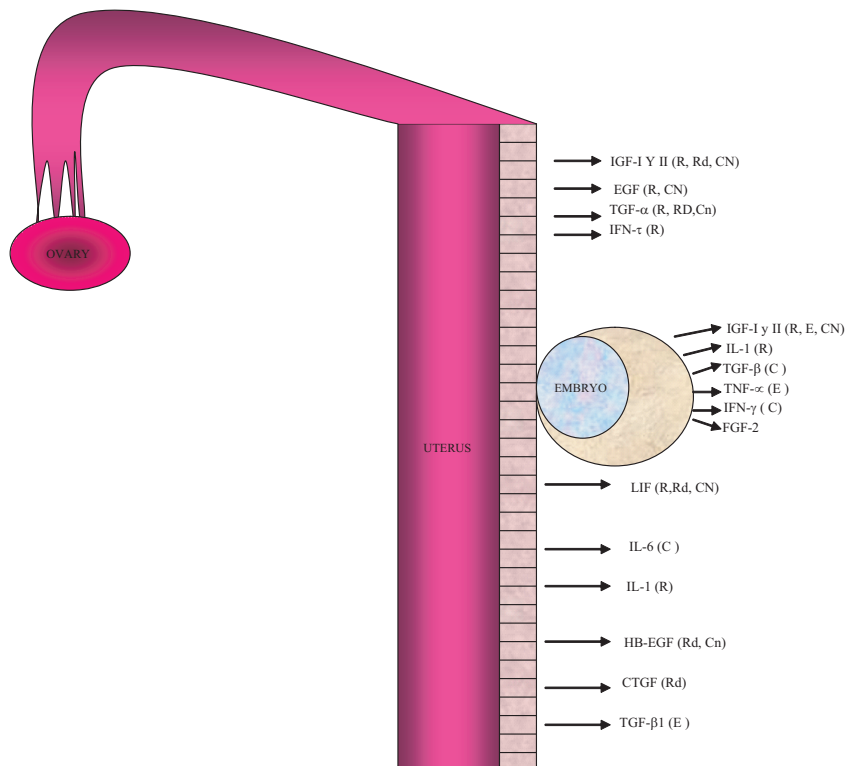
Signals of EGF, TGF- $\alpha$  and HB-EGF have been detected in luminal and glandular epithelium of the rabbit at days six of gestation, and at days seven to eight erbB1, erbB2 and erbB3 are expressed, which are also found in non-gestating, pseudo-gestating and gestating animals, suggesting that they have a relevant role in the epithelial physiology of these receptors. In this species, once cellular proliferation of the uterine stroma has occurred, the formation of the decidua has different characteristics in relation to cellular and morphological differentiation, as well as gene activity.

temporal y específica; en el día dos se localiza primeramente en el epitelio glandular y luminal; en los días tres y cuatro se encuentra acumulado en células del estroma, además de su presencia en el epitelio. Del sexto al octavo días de la gestación, la acumulación de ER-alpha RNAm se localiza en la segunda zona decidual y de manera más abundante en las células subepiteliales del polo mesometrial; la distribución de EGF aquí es similar a la del ER RNAm, lo que indica que el EGF quizá esté involucrado en el camino de la señalización de los estrógenos que regulan la proliferación y diferenciación celular.<sup>66</sup>

En los ratones, el TGF- $\alpha$  y el factor de crecimiento epidérmico unido a la heparina (HB-EGF) son expresados en el útero al momento que se lleva a cabo la implantación. El TGF- $\alpha$  se manifiesta en gran cantidad en el útero de esta especie en el periodo de la periimplantación; sin embargo, su papel en esta etapa es cuestionable ya que ratones carentes del TGF- $\alpha$  de manera experimental son aparentemente fértiles; aunque es posible que la ausencia del TGF- $\alpha$  es compensada por otros miembros de la familia del EGF.

El Er es inducido en el epitelio uterino el día cuatro, y éste parece ser un importante activador del erbB1 en el útero y en el blastocisto al tener un papel de comunicación intrauterina.<sup>67</sup>

El HB-EGF es, en apariencia, altamente relevante en el proceso de implantación, ya que es expresado en



**Figura 1:** Sitios de expresión de algunas citoquinas durante el periodo de implantación en animales domésticos. (R) rumiantes, (C) cerdos, (E) equinos, (Rd) roedores y (Cn) Conejos.

**Figure 1:** Sites of expression of some cytokines during the implantation period in domestic animals. (R) ruminants, (C) swine, (E) horses, (Rd) rodents and (Cn) rabbits.

This results in an increase in the expression of erbB1, erbB2 and erbB3. Up to this point little is known on these growth factors in the rabbit which makes this species an attractive model, different to rodents, for the study of EGF and its ligands in the interactions between the embryo and the mother during implantation.<sup>70</sup>

In rabbits, interleukin 6 (IL-6) is synthesized by the ovary, and its basal production has also been demonstrated in cultured of ovarian cancer cells. Furthermore, it has been reported that cells of the granular layer are an active site for biosynthesis of IL-6.<sup>71</sup> According to this, IL-6 in the rabbit might act in a paracrine or autocrine manner as a regulator of steroid production in the ovary; also IL-1 is inhibited by gonadotropins.<sup>71</sup>

On the other hand, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) that is secreted by natural killer cells (NK) in the uterus,<sup>72,73,74</sup> intervenes in remodeling the arteries of the decidua and maintaining their integrity. In mice there is an important migration of NK cells that are in contact with the arteries of the decidua in conjunction with angiopoietin-1 (Ang-1), which is a factor that joins to its receptor on endothelial cells and promotes the stability of vessels via TGF- $\beta$ . Angiopoietin-2 is the natural antagonist of Ang-1 and can destabilize arteries. It has been reported that NK cells produce VEGF, which is regulated by IFN- $\gamma$ .<sup>75,76</sup>

One of the recently studied growth factors is the connective tissue growth factor (CTGF) that appears to be induced by TGF $\beta$  and EGF. In mice, at days 1.5 to 3.5 of gestation, CTGF is located in the luminal and glandular epithelium, similar to non-gestating mice. There the factor helps in the distribution of several structures of the embryo. Later it will localize in the apical portion of the epithelium, at days 2.5 to 3.5, although this factor decreases in concentration at day 4.5.<sup>77</sup>

Another growth factor that intervenes in the formation of the mesoderm is the fibroblast growth factor-2 (FGF-2). It promotes the gastrulation process at days six and seven of gestation in the rabbit. Recent studies have demonstrated that FGF-2 has a high affinity for heparin; therefore, cellular surfaces with molecules similar to heparin act as low-affinity receptors. This growth factor promotes cellular differentiation and migration in the blastocyst of the rabbit.<sup>78</sup>

In relation to the insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its RNAm its presence has been reported in the uterus of the rat expressed in the glandular and luminal epithelium when implantation occurs. This factor corresponds to the action of ovarian hormones, which originates potential changes in the control of the endocrine and paracrine mechanisms responsible of local changes.<sup>79</sup>

el epitelio luminal rodeando al blastocisto entre seis a siete horas después del contacto con la pared uterina; esto último sugiere que las señales del blastocisto provocan que el epitelio luminal exprese el HB-EGF.<sup>68</sup>

El ErbB1 y erbB4 se expresan en el blastocisto de ratón mediante la interacción con HB-EGF. En general, la expresión de múltiples ligandos y receptores de la familia del EGF pudiera ser un mecanismo de protección para asegurar la alta probabilidad de que el embrión se desarrolle y pueda implantarse en el epitelio uterino.<sup>69</sup>

En los conejos se han detectado señales de EGF, TGF- $\alpha$  y HB-EGF en el epitelio luminal y glandular al sexto día de gestación; y los días siete a ocho se expresan el erbB1, erbB2 y erbB3, los cuales se encuentran también en animales no gestantes, pseudogestantes y gestantes, lo que implica que tienen un papel relevante en la fisiología epitelial de estos receptores. En esta especie, una vez iniciada la proliferación celular del estroma uterino, la decidualización tiene características diferentes en cuanto a la diferenciación celular, morfológica y actividad en los genes, dando como resultado un incremento en la expresión de erbB1, erbB2 y erbB3. Hasta el momento se sabe muy poco de estos factores de crecimiento en los conejos, por lo que esta especie representa un atractivo modelo diferente a los roedores para el estudio del EGF y sus ligandos en las interacciones del embrión con la madre, durante la implantación.<sup>70</sup>

En los conejos, la interleucina 6 (IL-6) es sintetizada por el ovario y también se ha demostrado su producción basal en cultivos de líneas celulares cancerosas de ovario; además, se ha informado que las células de la granulosa son un sitio activo de biosíntesis de la IL-6.<sup>71</sup>

Por lo anterior, en la coneja la IL-6 quizá actúa de manera paracrina o autocrina como regulador de la esteroidogénesis ovárica; asimismo, la IL-1 es inhibida por las gonadotropinas.<sup>71</sup>

Por otra parte, el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que es secretado por las células asesinas naturales (NK) en el útero,<sup>72,73</sup> interviene en la remodelación de las arterias de la decidua y en el mantenimiento de su integridad. En el ratón hay importante migración celular de las células NK que se encuentran en contacto con las arterias de la decidua, aunado a la angiopoietina-1 (Ang-1), que es un factor que se liga a su receptor sobre las células endoteliales y promueve la estabilidad de los vasos vía TGF- $\beta$ . La angiopoietina-2 es el antagonista natural de Ang-1 y puede desestabilizar las arterias. En ratones se ha informado que las células NK producen VEGF, que es regulado por el IFN- $\gamma$ .<sup>75,76</sup>

Uno de los factores de crecimiento recientemente estudiado es el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que parece ser inducido por el TGF $\beta$  y

High concentrations of IGF-I and insulin have an impact on the implantation of the embryo, and these high concentrations of insulin produce the loss of their receptors in numerous cells. This cytokine and insulin operate through the IGF-1R receptor, which is fundamental in regulating programmed cell death (apoptosis). Apoptosis is a normal process in humans, rodent and lagomorphs during embryo implantation, since its regulation is essential for the development of the future embryo;<sup>80,81</sup> nevertheless, a high concentration of IGF-I and insulin causes a loss of control in the apoptosis process, which causes embryo reabsorption.<sup>80</sup>

Currently we know that there is an autocrine and paracrine molecular "dialogue" between the cytokines of embryo origin and those of the endometrium during the period known as "window" of implantation. In this sense, the challenge for reproduction biologists is to understand in detail the manner in which this communication is achieved.

The advances achieved until today, on the knowledge of cellular and physiological mechanisms of implantation in domestic animals, has been surprising and constitute the basis for the current molecular comprehension on the subject. In light of the tools offered by molecular biology, a great number of cytokines has been identified and characterized in the different tissues of the reproductive tract. Before, it was simplistically thought that these tissues had a similar behavior in relation to their capacity of locally synthesizing molecules that mediate cellular events that characterize the initial development of an individual. Nevertheless the existence of a regionalized specialization has been demonstrated in their synthesis and secretion capacity of cytokines from cells of the epithelium that covers the oviduct and endometrium, as well as cells that constitute the lamina propria of the mucosa connective tissue in accordance to the hormonal environment that they are exposed to.

In the same manner, the active role of the embryo has been demonstrated in the induction of tissue remodeling events that occur in the endometrium as part of the necessary preparations for a successful implantation. On this, it is known that the embryo synthesizes early gestation factors that are secreted a few hours after gestation is initiated, such as the leukemia inhibiting factor (LIF).<sup>40,64</sup> Some of these molecules have been attributed with a preponderant role in the generation of the local uterine immunosuppressant environment needed for the survival of the embryo, as well as participate in the regulation of local cell growth and proliferation.

Currently, the potential of cytokines is being tested in the field of assisted reproduction in techniques such as *in vitro* fertilization and embryo transfer, in order

el EGF. Los días 1.5 a 3.5 de gestación del ratón, el CTGF se localiza en el epitelio luminal y glandular de manera similar a un ratón no gestante; aquí este factor ayuda a la distribución de varias estructuras del embrión; posteriormente se va a localizar en la parte apical de este epitelio, los días 2.5 a 3.5; aunque este factor disminuye su concentración el día 4.5.<sup>77</sup>

Otro factor del crecimiento que interviene en la formación del mesodermo es el del crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), que promueve el proceso de gastrulación los días seis y siete de gestación en la coneja. Estudios recientes han demostrado que el FGF-2 tiene una afinidad muy alta por la heparina, por lo que las superficies celulares con moléculas semejantes a la heparina actúan como receptores de baja afinidad; este factor del crecimiento promueve la diferenciación y migración celular en el blastocisto del conejo.<sup>78</sup>

Respecto del factor de crecimiento insulínico-I (IGF-I) y su RNAm, se ha informado de su presencia en el útero de la rata, el cual es expresado en el epitelio glandular y luminal cuando se efectúa la implantación. Este factor responde a la acción de las hormonas ováricas, lo que origina cambios potenciales en el control del mecanismo endocrino y paracrino responsable de los cambios locales.<sup>79</sup>

Las concentraciones elevadas de IGF-I y de insulina afectan la implantación del embrión, estas altas concentraciones de insulina inducen la pérdida de sus receptores en numerosas células; esta citocina y la insulina operan mediante el receptor IGF-1R, que es fundamental en la regulación de la muerte celular programada (apoptosis). La apoptosis es un proceso normal en humanos, en roedores y en lagomorfos durante la implantación embrionaria, ya que su regulación es esencial para el desarrollo futuro del embrión;<sup>80,81</sup> sin embargo, una elevada concentración de IGF-I y de insulina provoca descontrol en el proceso de apoptosis, que conduce a la reabsorción embrionaria.<sup>80</sup>

Actualmente se sabe que existe un "diálogo" molecular de tipo autocrino y paracrino entre las citocinas de origen embrionario y endometrial durante el denominado periodo "ventana" de la implantación; en este sentido, el reto para los biólogos de la reproducción es entender al detalle la manera en que se da esta comunicación.

El avance logrado hasta hoy sobre el conocimiento de los mecanismos celulares y fisiológicos de la implantación en los animales domésticos ha sido sorprendente y constituye la base de la comprensión molecular actual sobre el tema. Debido a las herramientas que ofrece la biología molecular, se han identificado y caracterizado gran número de citocinas en los diferentes tejidos del aparato reproductor. Antes

to offer solution alternatives to recurring problems associated with early loss of the embryo in domestic animals. Nevertheless, it is necessary to integrate the knowledge of developmental biology and reproductive biotechnology to functional genomic research, in order to have a systematic analysis of the interactions between the embryo before implantation and the mucosa of the uterine tubes and the endometrium.<sup>82,83</sup> In near future, it is possible that proteomic technologies allow the identification of reciprocal signals between the embryo and the maternal tissue environment.

Another challenge for reproduction physiologists is to continue identifying the genes that regulate and codify endometrial and oviduct cytokines and growth factors in response to hormonal stimulation, mainly during the first days of gestation, to provide the embryo with a receptive endometrium.<sup>6,82</sup> In the exploration of this field, genetically manipulated laboratory animals (*knock-out* and transgenic animals) are a valuable resource for the study of cytokines and thus gain an insight into the chronological dynamics of their participation in the implantation “window” period.

On the other hand, the studies based on techniques of co-culture of epithelial cells of the uterine horns or endometrium together with embryo cells could provide new knowledge on the molecular dialogue that exists in the early stages of development of mammal embryos.<sup>84,85</sup>

Due to well justified ethical considerations, experiments cannot be done on human embryos in order to study the sterility problems that affect this species. Therefore, the use of animal models for experimentation is necessary in order to look for solutions to ancient problems related to sub-fertility and infertility in humans and other species.

Recently, it has been discovered that some infectious or inflammatory processes, such as mastitis, can produce an immunological response that cause embryo loss in the stage previous to implantation. It has been postulated that cytokines could participate crucially in this alteration inducing changes in the hypothalamus-hypophysis axis, in the ovary, in the mucosa of the reproductive tract and in the embryo. In this sense, there is experimental evidence that synthesis of IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  under these circumstances can have negative effects on embryo implantation in these early stages.<sup>85,86</sup>

Also, it has been suggested that one of the effects of LIF on the luminal epithelium of the uterus of mouse can increase the expression of a subpopulation of genes regulated by progesterone, reinforcing the existence of a neuroimmunoendocrine interaction in the uterine function.

se consideraba de manera simplista que estos tejidos tenían un comportamiento similar respecto de su capacidad de síntesis local de moléculas mediadoras de los eventos celulares que caracterizan a la etapa inicial del desarrollo de un individuo; sin embargo, se ha demostrado la existencia de una especialización regionalizada en su capacidad de síntesis y secreción de citocinas a partir de células del epitelio de revestimiento del oviducto, endometrio y de células que constituyen la lámina propia de tejido conjuntivo de la mucosa de acuerdo con el ambiente hormonal al que están expuestas.

De igual manera se ha demostrado el papel activo del embrión en la inducción de eventos de remodelación tisular que ocurren en el endometrio como parte de los preparativos necesarios para una implantación exitosa. En esta tesitura, se sabe que el embrión sintetiza factores tempranos de la gestación que se secretan a las pocas horas de iniciada la gestación, como el factor inhibitorio de la leucemia (LIF).<sup>40,64</sup> Por cierto, se ha atribuido a algunas de estas moléculas un papel preponderante en la generación del ambiente inmunosupresor local uterino necesario para la sobrevivencia del embrión, además de participar en la regulación del crecimiento y proliferación celular local.

Actualmente se está probando el potencial de las citocinas en el campo de la reproducción asistida en técnicas como la fertilización *in vitro* y la transferencia de embriones, con el fin de ofrecer alternativas de solución a problemas recurrentes asociados con la pérdida temprana del embrión en animales domésticos. Sin embargo, es necesario integrar el conocimiento de la biología del desarrollo y de la biotecnología reproductiva a la investigación genómica funcional para disponer de un análisis sistemático de las interacciones entre el embrión en etapa previa a la implantación y las mucosas de las tubas uterinas y del endometrio.<sup>82,83</sup> En el futuro inmediato es probable que las tecnologías proteómicas permitan identificar señales recíprocas entre el embrión y el entorno tisular materno.

Otro reto para los fisiólogos de la reproducción será continuar identificando los genes que regulan y codifican para las citocinas y factores de crecimiento endometriales y oviductales en respuesta a estímulos hormonales, principalmente en los primeros días de la gestación, para proveer al embrión de un endometrio receptivo.<sup>6,82</sup> En la exploración de este campo constituyen un recurso valioso los animales de laboratorio manipulados genéticamente (animales *knock-out* y transgénicos) para las citocinas, de esta manera se conocerá la dinámica cronológica de su participación durante el “período ventana” de la implantación.

Por otra parte, los estudios basados en técnicas de cocultivo de células epiteliales de las tubas uterinas

## Acknowledgements

This work is part of the PAPIIT project IN212101 DGAPA-UNAM and we are thankful for the financing.

## Referencias

1. Sharkey A. Cytokines and implantation. *Rev Reprod* 1998;3:52-61.
2. Tizard IR. *Veterinary Immunology: an introduction*. 6a ed. Philadelphia: McGraw-Hill Interamericana, 2000.
3. Abbas AK. *Inmunología celular y molecular*. 4ª ed. New York: W. B. Saunders Company, 2000
4. Kuby J. *Immunology*. 4ª ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2000
5. Viganó P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I. Maternal-conceptus Cross Talk-A Review. *Placenta* 2003;24:S56-S61.
6. Salamsen LA, Guiying N, Findlay K. Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *J Reprod Immunol* 2002;53:215-225.
7. Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Cell Develop Biol* 2000;11:67-76.
8. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubbleine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990;248:220-223.
9. Ellis S. HLA-G: at the interface. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:84-86.
10. Schmidt CM, Garret E, Orr HT. Cytotoxic T lymphocyte recognition of HLA-G in mice. *Hum Immunol* 1997;55:127-139.
11. Soderstrom K, Corliss B, Lanier LL, Phillips JH. CD94/ NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* 1997;159:1072-1075.
12. Linnemeyer PA, Pollack SB. Prostaglandin E2-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2 activated natural killer cells. *J Immunol* 1993;150:3747-3754.
13. Ouellette MJ, Dubois CM, Bergeron D, Roy R, Lambert RD. TGFβ2 in rabbit blastocoelic fluid regulates CD4 membrane expression: possible role in the success of gestation. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:125-136.
14. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562-4573.
15. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-356.
16. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1037-1048.
17. Hansen PJ. Interactions between the immune system and the ruminant conceptus. *J Reprod Fertil* 1995;49(Suppl 1):69-82.

o del endometrio con células embrionarias podrán aportar nuevos conocimientos sobre el diálogo molecular que existe en la etapa temprana del desarrollo en embriones de especies mamíferas.<sup>84,85</sup>

Por razones de carácter bioético, plenamente justificadas, no se puede experimentar con embriones humanos para estudiar problemas de esterilidad que aquejan a esta especie, por lo que hoy el uso de modelos animales de experimentación es imprescindible para buscar soluciones a problemas añejos relacionados con la subfertilidad e infertilidad en el hombre y en otras especies.

Recientemente se sabe que algunos procesos infecciosos o inflamatorios, como la mastitis, pueden propiciar una respuesta inmunológica causando la pérdida embrionaria en la etapa previa a la implantación. Se ha planteado que en esta alteración podrían participar de manera crucial las citocinas induciendo cambios en el eje hipotálamo-hipófisis, en los ovarios, en la mucosa del aparato reproductor y a nivel embrionario. En este sentido, existe evidencia experimental de que la síntesis del IFN-α, IFN-γ, TNF-α y la PGF<sub>2</sub>α bajo estas condiciones puede tener efectos negativos sobre la implantación embrionaria en etapas tempranas.<sup>85,86</sup>

Asimismo, se ha sugerido que uno de los efectos del LIF sobre el epitelio luminal uterino del ratón puede incrementar la expresión de una subpoblación de genes regulados por progesterona, lo que refuerza la existencia de una interacción neuroinmunoendocrina en la función uterina.

## Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto PAPIIT (IN212101) DGAPA-UNAM, se agradece su financiamiento.

18. Stewart HJ, McCann SH, Barker PJ, Lee KE, Lamming GE, Flint AP. Interferon sequence homology and receptor binding activity of ovine trophoblast antiluteolytic protein. *J Endocrinol* 1987;115:R13-15.
19. Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature* 1987;330:377-379.
20. Charpigny G, Reinaud P, Huet JC, Guillomot M, Charlier M, Pernollet JC *et al*. High homology between a trophoblastic protein (Trophoblastin) isolated from ovine embryo and α-interferons. *FEBS Lett* 1988;228:12-16.
21. Imakawa K, Hansen TR, Malathy PV, Anthony RV, Poites HG, Marotti KR *et al*. Molecular cloning and characterization of complementary deoxyribonucleic acids corresponding to bovine trophoblast protein-1: a comparison with ovine trophoblast protein -1 and bovine interferon-α II. *Mol Endocrinol* 1989;3:127-139.

22. Stewart HJ, McCann SH, Flint AP. Structure of an interferon- $\alpha$  2 gene expressed in the bovine conceptus early in gestation. *J Mol Endocrinol* 1990;4:275-282.
23. Cross JC, Roberts RM. Porcine conceptuses secrete an interferon during preattachment period of early pregnancy. *Biol Reprod* 1989;40:1109-1118.
24. Aboagye-Mathiesen G, Toth FD, Zdravkovic M, Ebbesen P. Human trophoblast interferons: production and possible roles in early pregnancy. *Early Pregnancy* 1995;1:41-53.
25. Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. Ovine interferon- $\tau$  inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 1995;136:4932-4944.
26. Spencer TE, Bazer FW. Ovine interferon- $\tau$  suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 1996;137:1144-1147.
27. Newton GR, Vallet JL, Hansen PJ, Bazer FW. Inhibition of lymphocyte proliferation by ovine trophoblast protein-1 and a high molecular weight glycoprotein produced by the peri-implantation sheep conceptus. *Am J Reprod Immunol* 1989;19:99-107.
28. Pontzer CH, Bazer FW, Johnson HM. Antiproliferative activity of a pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein-1. *Cancer Res* 1991;51:5304-5307.
29. Subramaniam PS, Khan Sa, Pontzer CH, Johnson HM. Differential recognition of the type I interferon receptor by interferons  $\tau$  and  $\alpha$  is responsible for their disparate cytotoxicities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12270-12274.
30. Ott TL, Mirando Ma, Davis MA, Bazer FW. Effects of ovine conceptus secretory proteins and progesterone on oxytocin-stimulated endometrial production of prostaglandin and turnover of inositol phosphate in ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* 1992;95:19-29.
31. Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Joyce MM, Bazer FW. Interferon-Tau and progesterone regulate ubiquitin cross-reactive protein expression in the ovine uterus. *Biol Reprod* 2000;62:622-627.
32. Asselin E, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Monocyte Chemotactic protein-1 and -2 messenger ribonucleic acids in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon- $\tau$ . *Biol Reprod* 2001;64:992-1000.
33. Fortin M, Oullete MJ, Lambert RD. TGF $\beta$ 2 and PGE2 in rabbit blastocoelic fluid can modulate GM-CSF production by human lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:129-139.
34. Emond V, Fortier Ma, Murphy BD, Lambert RD. Prostaglandin E2 regulates both interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor gene expression in bovine lymphocytes. *Biol Reprod* 1998;58:143-151.
35. Winkelman GL, Roberts MR, Peterson AJ, Alexenko AP, Ealy AD. Identification of the expressed forms of ovine interferon-tau in the periimplantation conceptus: sequence relationships and comparative biological activities. *Biol Reprod* 1999;61:1592-1600.
36. Ealy AD, Larson SE, Liu L, Alexenko AP, Winkelman GL, Kubisch HM, *et al.* Polymorphic forms of expressed bovine interferon- $\tau$  genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. *Endocrinology* 2001;7:2906-2915.
37. Cann CH, Fairclough RJ, Sutton R, Gow CB. Endometrial expression of mRNA encoding insuline-like growth factors I and II and IGF-binding proteins 1 and 2 in early pregnant ewes. *J Reprod Fertil* 1997;111:7-13.
38. Reynolds TS, Stevenson KR, Wathes DC. Pregnancy-specific alterations in the expression of the insuline-like growth factor system during early placental development in the ewe. *Endocrinology* 1997;138:886-897.
39. Wathes DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR. Role of the insuline-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* 1998;81:1778-1789.
40. Voggiadis D, Fry RC, Sanderman RM, Salomonsen LA. Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. *J Reprod Fertil* 1997;109:279-288.
41. Flores JM, Sanchez MA, Garcia P, Sanchez B, Nieto A. Immunohistochemical localization of epidermal growth, transforming growth factor- $\alpha$  and growth factor- $\beta$  in the caprine peri-implantation period. *Theoriogenology* 1998;50:931-944.
42. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8:1314-1325.
43. Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991;88:1445-1451.
44. Paula-Lopes FF, de Moraes AA, Edwards JL, Justice JE, Hansen PJ. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1 $\beta$ . *Biol Reprod* 1998;59:1406-1412.
45. Asselin E, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Monocyte chemotactic protein-1 and -2 messenger ribonucleic acids in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon- $\tau$ . *Biol Reprod* 2001;64:992-1000.
46. Gupta A, Ing NH, Bazer FW, Bustamante LS, Jaeger LA. Beta transforming growth factors (TGF $\beta$ ) at the porcine conceptus-maternal interface. Part I: expression of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 messenger ribonucleic acids. *Biol Reprod* 1998;59:905-910.
47. Gupta A, Bazer FW, Jaeger LA. Differential expression of beta transforming growth factors (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3) and their receptors (Type I and Type II) in peri-implantation porcine conceptuses. *Biol Reprod* 1996;56:796-802.
48. Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders NS, Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 1988;263:7741-7746.
49. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
50. Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM. Beta transforming growth factors (TGF $\beta$ ) at the porcine conceptus-maternal interface. Part II: Uterine TGF $\beta$

- bioactivity and expression of immunoreactive TGF $\beta$ s (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3) and their receptors (Type I and Type II). *Biol Reprod* 1998;59:911-917.
51. Fazleaba AT, Strakova Z. Endometrial functions: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:143-147.
  52. Jaeger LA, Johnson GA, Ka H, Garlow JG, Burghardt RC, Spencer TE *et al.* Functional analysis of autocrine and paracrine signalling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reproduction* 2001;58(Suppl 1):191-207.
  53. Modric T, Kowalski AA, Green ML, Simmen RC, Simmen FA. Pregnancy-dependant expression of leukaemia inhibitory factor (LIF), LIF receptor-beta and interleukin-6 (IL-6) messenger ribonucleic acids in the porcine female reproductive tract. *Placenta* 2000;21:345-353.
  54. Chabot V, Lambert RD, Laforest JP, St-Jacques S, Matte JJ, Guay F *et al.* Effect of oestrous cycle and early pregnancy on uterine production and expression of immune regulatory factors in gilts. *Anim Reprod Sci* 2004;81:137-149.
  55. Lennard SN, Stewart F, Allen WR. Insulin-like growth factor II gene expression in the fetus and placenta of the horse during the first half of gestation. *J Reprod Fertil* 1995;103:169-179.
  56. Herrler A, Pell JM, Allen WR, Beier HM, Stewart F. Horse conceptuses secrete insuline-like growth factor-binding protein 3. *Biol Reprod* 2000;62:1804-1811.
  57. Lennard SN, Stewart F, Allen WR. Transforming growth factor  $\beta$  1 expression in the endometrium of the mare during placentation. *Mol Reprod Dev* 1995;42:131-140.
  58. Gruning G, Antczak DF. Horse trophoblast produce tumor necrosis factor  $\alpha$  but not interleukin 2, interleukin 4, or interferon  $\gamma$ . *Biol Reprod* 1995;52:531-539.
  59. Evans JM, Anderton DJ. Pregnancy diagnosis in the bitch: the development of a test based on the measurement of acute phase proteins in the blood. *Ann Zootech* 1992;41:397-405.
  60. Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Hagio T, Izumisawa Y, Kotani T. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci* 1994;56:487-492.
  61. Surveyor GA, Wilson AK, Brigstock DR. CTGF in the mouse uterus and early embryo. *Biol Reprod* 1998;59:1207-1213.
  62. Vogiagis D, Salomonsen LA. Review: the role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol* 1999;160:181-190.
  63. Chen JR, Gang-Cheng J, Shatzer T. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatiry estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000;12:4365-4372.
  64. Liu CQ, Yuan Y, Wang ZX. Effects of leukaemia inhibitory factor on endometrial receptivity and its hormonal regulation in rabbits. *Cell Biol Int* 2001;25:1029-1032.
  65. Reese J, Binart N, Brown N. Implantation and Decidualization defects in prolactin receptor (PRLR)- deficient mice are mediated by ovarian but not uterine PRLR. *Endocrinology* 2000;5:1872-1881.
  66. Tan J, Paria BC, Dey SK, Das SK. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology* 1999;140:5310-5321.
  67. Das SK, Chakraborty I, Paria BC, Wang XN, Plowman G, Dey SK. Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol* 1995;9:691-705.
  68. Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzel RM. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 1996;122:637-645.
  69. Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently on ErbB1: a possible role for heparin sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst. *Implantation. Development* 1999;126:1997-2005.
  70. Klonisch T, Wolf P, Hombach-Klonisch S. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. *Biol Reprod* 2001;64:1835-1844.
  71. Breard E, Benhaim A, Feral C, Leymarie P. Role of IL-6 in rabbit ovary. *J Endocrinol* 1998;159:479-487.
  72. Kurago ZB, Lutz CT, Smith KD, Colonna M. NK cell natural cytotoxicity and IFN-gamma production are not always coordinately regulated: engagement of DX9 KIR + NK cells by HLA-B/ variants and target cells. *J Immunol* 1998;160:1573-1580.
  73. Boehm U, Klamp M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-795.
  74. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon contributes initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murin pregnancy. *J Exp Med* 2000;192:259-269.
  75. Wang C, Umesaki N, Nakamura H, Tanaka T, Nakatani K, Sakaguchi I *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tissue Res* 2000;300:285-293.
  76. Ashkar AA, Anne B. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin Immunol* 2001;13:235-241.
  77. Surveyor GA, Wilson AK, Brigstock DR. CTGF in the mouse uterus and early embryo. *Biol Reprod* 1998;59:1207-1213.
  78. Dvorak P, Flechon JE, Thompson EM, Horak V, Adenot P, Renard JP. Embryoglycans regulate FGF-2 mediated mesoderm induction in the rabbit embryo. *J Cell Science* 1997;110:1101-1110.
  79. Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction*. 2<sup>nd</sup> ed. New York:Raven Press Ltd 1994.
  80. Chi MM, Schelein AI, Moley KH. High insuline like growth factor-I (IGF-I) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via

- down-regulation of the igf-1 receptor. *Endocrinology* 2000;141:4784-4792.
81. Nason KS, Binder ND, Labarta JI, Gargasky SE. IGF-II and IGF-binding proteins increase dramatically during rabbit pregnancy. *J Endocrinol* 1996;148:121-130.
82. Sherwin J, Freeman T, Stephens R, Kimber S, Smith A, Chambers I *et al.* Identification of genes regulated by leukaemia inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol Endocrinol* 2004;18:2185-2195.
83. Krussel JS, Bielfeld P, Poland MP, Simon C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:2-9.
84. Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R *et al.* Embryo-maternal communication in bovine-strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod Domest Anim* 2003;38:276-289.
85. Diaz-Cueto L, Gerton GL. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res* 2001; 32:619-626.
86. Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle-possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:294-301.