

## Presencia de poblaciones leucocitarias en el útero de los rumiantes y sus posibles implicaciones en la reproducción bovina. Revisión de literatura.

Luis E López, Biol.<sup>1,2</sup> Juan G Maldonado, MVZ, MSc.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Teriogenología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia y Programa de Biogénesis, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín – Colombia

(Recibido: 21 enero, 99; aprobado: 22 julio, 99)

### Resumen

*El útero de los placentados está expuesto a diversos antígenos que podrían desencadenar respuestas inmunológicas de la madre hacia el feto y atentar contra la implantación y el mantenimiento de la gestación. Al parecer, cada una de las especies posee mecanismos para asegurar el éxito de la gestación como: el tipo de placentación y de células inmunológicas presentes en la interface materno-fetal, y el patrón de citoquinas allí producido. La placentación de los rumiantes se caracteriza por el poco contacto entre la circulación materna y fetal, y por la presencia de algunos tipos celulares del linaje de los linfocitos T gama-delta ( $\gamma\delta T$ ), los cuales parecen cumplir funciones específicas de protección similares a las que ejercen las células asesinas naturales o NK (Natural Killer) presentes en la gestación de los primates y los roedores. En los rumiantes, las células NK uterinas (uNK) presentan una morfología similar a sus homólogas humana y murina, pero tienen diferencias en cuanto a la expresión de marcadores de superficie. El propósito del presente artículo es hacer una revisión de las diferentes poblaciones leucocitarias presentes en el útero de los rumiantes, durante el ciclo estral, en los procesos de la implantación, en el mantenimiento de la gestación y en el parto. Asimismo, se hace énfasis en sus marcadores de superficie, sus homologías con las poblaciones leucocitarias halladas en humanos y en murinos, y se mencionarán los puntos críticos de interés para el desarrollo de líneas de investigación en inmunología de la reproducción, con aplicación potencial para mejorar la eficiencia reproductiva en los rumiantes.*

**Palabras clave:** Bovinos, Células GMG, células  $\gamma\delta TCR$ , células NK, células PAS<sup>+</sup>, Placentación epiteliocorial.

### Introducción

Desde la publicación de los primeros informes sobre estudios en el campo de la inmunología de la reproducción (2) se ha especulado mucho sobre los fenómenos mediante los cuales, en los mamíferos placentados, el feto semialogénico (posee hasta 50% de antígenos de histocompatibilidad heredados del padre) es protegido de los mecanismos de reconocimiento y rechazo inmunológico de la madre (8). Gran canti-

dad de investigadores han buscado explicar los diferentes enigmas que se han planteado, en la medida en que se ha conocido más sobre las interacciones entre los sistemas inmune y reproductivo durante la gestación (14-18, 29).

En este artículo se hace una revisión sobre la implantación y el tipo de placentación característico de los rumiantes, con énfasis en el grado de compromiso entre las estructuras maternas y fetales, buscando la

relación entre los diferentes tejidos y su formación citológica; y también se hace una revisión sobre las diferentes poblaciones leucocitarias presentes en la interface materno-fetal con énfasis en los distintos tipos de células T, especialmente las que presentan fenotipos gd TCR<sup>+</sup>, las cuales tienen semejanzas con otros tipos celulares presentes en primates -*Large Granular Lymphocytes*, o LGL<sup>+</sup>, y roedores -*Granulated Metrial Gland Cells*, o células GMG (20, 27, 29). Así mismo, se plantean áreas de investigación para aumentar el conocimiento de los procesos del sistema inmune y la reproducción en los rumiantes.

### *Implantación y placentación*

Después de la fecundación y de la formación de los blastocistos en roedores y primates, el conceptus penetra la mucosa uterina (60), se introduce en el endometrio y lo modifica conforme migrando en el estroma. Este proceso invasivo se acompaña de la transformación y proliferación de las células del estroma en la vecindad del blastocisto en desarrollo, proceso que se conoce como decidualización (1). En los animales domésticos, por el contrario, la implantación es superficial y no invasiva (44) y en ella se presentan estadios de aposición y adhesión de células epiteliales trofoblásticas y uterinas (1). En la "fijación" placentaria de los rumiantes intervienen tanto las zonas carunculares como las intercarunculares del endometrio uterino: primero ocurre una fijación transitoria cuando el trofoblasto, en la vaca y en la oveja, desarrolla vellosidades digitiformes - papilas, las cuales se proyectan hacia el lumen de las glándulas uterinas. Estas papilas constituyen un sistema de "anclaje" y una estructura temporal con funciones de absorción para el embrión, mientras se da una adhesión más completa (1). La pérdida de las microvellosidades en la superficie del trofoblasto permite un contacto estrecho, pero de aposición, con las vellosidades del epitelio uterino; este último se comprime contra la superficie del trofoblasto, de modo que se entrelaza con las proyecciones citoplasmáticas allí presentes hasta que vuelven a desarrollarse microvellosidades trofoblásticas que permiten una fijación más completa (1).

La fijación, propiamente dicha, se caracteriza por el desarrollo de células binucleadas a partir de las células uninucleadas del trofoblasto - similar a la formación del sincitio en la placentación de tipo decidual en primates y roedores. Estas células aparecen por primera vez el día 17 después de la fecundación y están presentes durante toda la gestación; luego migran y se

fusionan con células epiteliales del endometrio subyacente para formar un conjunto de células multinucleadas, o sincitio, el cual puede participar en la inmunoprotección del embrión o en la transferencia del lactógeno placentario sintetizado por las células binucleadas (1).

La placentación se refiere a la interacción progresiva entre la membrana exterior de la vesícula embrionaria y el endometrio. Las funciones de la placenta son nutrir y proteger el embrión y el feto hasta el parto (20, 33, 36). Los roedores y muchos primates presentan una placentación de tipo hemocorial, la más invasiva, en donde ocurre un contacto directo entre la circulación sanguínea materna y la trofoblástica (20, 33, 45). Como se mencionó antes, la implantación está asociada con la transformación del endometrio, la invasión del estroma y la 'respuesta decidual', la cual se refiere a las modificaciones en la forma, la organización y el metabolismo de las células del estroma uterino (7, 8, 20).

Por otro lado están las especies en las cuales no hay contacto entre la circulación fetal y materna, pero lo hay entre el epitelio materno y el corion fetal, la denominada placentación "epiteliocorial" (20, 33, 45). En esta clasificación se ubican muchos órdenes de mamíferos, entre los que se incluyen los *Artiodactyla* - vacunos, ovejas, cerdos, venados y camellos- los *Perissodactyla* - caballos- y los *Cetacea* - ballenas, delfines y marmosas (20).

En bovinos y ovinos, el blastocisto se libera de la zona pelucida en la segunda semana de la gestación y empieza su crecimiento al rededor del día 10, la vesícula coriónica prolifera hasta invadir el útero durante los días 14 y 15 en las ovejas, ó 21 y 22 en las vacas; luego los embriones se desarrollan en el extremo apical del cuerno uterino ipsilateral al ovario en donde ocurrió la ovulación (20, 27).

El útero de los rumiantes posee regiones carunculares compuestas de estroma denso y estroma glandular cubierto por un epitelio columnar simple; las carúnculas se separan una de la otra mediante regiones glandulares intercarunculares, éstas interactúan con las áreas cotiledonarias de la placenta fetal para formar los placentomas (20, 27). La unión entre el corion y el epitelio uterino se mantiene por la interdigitación de las microvellosidades, las cuales se consolidan en los placentomas mediante la penetra-

ción de las velocidades coriónicas en las criptas de las carúnculas uterinas (20, 45).

Algunas células binucleadas migran através de la interface placentaria y se fusionan con células endometriales para formar células trinucleadas quiméricas (73), las cuales se despliegan o aplanan para formar un extenso sincitio al lado materno; a diferencia de lo que ocurre en primates y roedores, las células binucleadas en los rumiantes no penetran la membrana basal del endometrio. En la oveja, la formación del sincitio se asocia con la degradación del epitelio uterino (74), mientras que en la vaca el epitelio uterino persiste dando como resultado unos pequeños segmentos de tejido sincitial y espacios de células multinucleadas mezclados con espacios de células epiteliales maternas; además, existen uniones coriónicas en toda la superficie de contacto con el útero, pero éstas son más fuertes en los placentomas (45).

La implantación del blastocisto depende de la sincronía del programa de desarrollo del embrión y la serie de eventos moleculares y celulares inducidos en el útero gestante por los estrógenos y la progesterona. El conocimiento de los eventos que regulan la implantación del blastocisto están incompletos pero, al parecer, muchos factores de crecimiento y citoquinas están involucrados (31). Algunos factores de crecimiento y sus receptores desempeñan funciones importantes durante la peri-implantación en los mamíferos: los genes para los Factores de Crecimiento Insulinoides (*Insulin-like Growth Factor*, o IGFs), los Factores Transformadores de Crecimiento (*Transforming Growth Factors*, o TGFs), el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*, o FGF), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*, o PDGF) y sus receptores específicos (rIGF, rPDGF, rTGF $\alpha$ ) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, o EGF) se expresan en los embriones tempranos de especies como el ratón, la rata, la vaca y la oveja (31).

En el ratón, el factor inhibidor de leucemia (*Leukemia Inhibiting Factor*, o LIF) y el EGF, estimulan la secreción del activador de plasminogeno tipo uroquinasa (uPA) y de la B/Metaloproteínasa-9 de matrix extracelular (MMP-9), durante el día 7 del desarrollo del blastocisto. Al mismo tiempo, los inhibidores de MMPs específicas de tejido (TIMPs) se expresan en los tejidos embrionarios, deciduales y uterinos, durante la implantación. Al parecer, el LIF puede actuar

de manera directa o indirecta en la inducción de la expresión de otras citoquinas, para regular temporal y espacialmente la producción y la actividad de proteasas e inhibidores de proteasas y crear un ambiente favorable para la implantación (31).

La morfología placentaria en la especie bovina se ha descrito por completo, pero no se ha podido caracterizar de manera detallada las poblaciones de leucocitos uterinos, debido a la limitada disponibilidad de marcadores para identificar las distintas subpoblaciones (20, 45).

#### *Reconocimiento materno de la gestación*

Según Hansen, 1996, el término "reconocimiento materno de la gestación" se refiere a los cambios en la función materna mediada por una señal del conceptus, que incluyen el mantener la función del cuerpo lúteo y la detección de antígenos del conceptus por células del sistema inmune materno. Una implicación de este proceso, además de propiciar el desarrollo de la gestación, es que regula la respuesta inmune de la madre hacia el feto para evitar el rechazo del conceptus (29). El útero de los mamíferos es capaz de rechazar injertos de tejidos (29) y existen evidencias de pérdida de la gestación mediada por rechazo inmune en ratones (39) y humanos (8, 75). En ganado, la inmunización contra los tejidos del conceptus los días 32 a 38 de la gestación, disminuye la fertilidad de las novillas (56), lo cual sugiere que existen mecanismos para permitir que el conceptus escape al rechazo inmunológico (29).

Es posible que ciertas poblaciones de linfocitos maternos puedan contribuir a promover el crecimiento placentario y la secreción de hormonas mediante la regulación de otras poblaciones de leucocitos o la producción de citoquinas que estimulen el desarrollo embrionario. En ganado, poco se sabe acerca de la naturaleza de las interacciones inmunológicas maternas con el conceptus (29), como tampoco sobre los cambios en las subpoblaciones de linfocitos en el endometrio durante la gestación temprana. El factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*, o GM-CSF), una citoquina asociada con los linfocitos, producida en el endometrio (35) pero los linfocitos intraepiteliales endometriales pueden contribuir también con su secreción (27). Esta citoquina induce en el conceptus la secreción de hormonas antiluteolíticas como el interferon tau (INF $\tau$ ), uno de los factores de mayor importancia para el reconocimiento materno de la gestación en rumiantes.

El INF $\tau$  puede inhibir la proliferación de linfocitos en respuesta a estímulos mitogénicos o alogénicos (57, 63) o bien, puede aumentar la actividad citolítica de las células NK (68). Durante la peri-implantación el conceptus también secreta lactosaminoglicano que contiene una glicoproteína con un peso molecular de 800.000 D, la cual inhibe la proliferación de linfocitos (57); de esta forma, el conceptus puede regular la función de los linfocitos endometriales al momento inicial de la aposición superficial del embrión al endometrio (27). Staples y colaboradores, 1983, hallaron una disminución en el número de linfocitos en el epitelio luminal cercano a los tejidos placentarios entre los días 22-24 de la gestación (64). Así mismo los estudios realizados por Lambert y su grupo (1997) demostraron la producción de TGF $\beta$ 2 en el líquido blastocístico de conejas el día 12 de la gestación; este factor de crecimiento parece ser un regulador negativo de la expresión de los marcadores CD4 de los linfocitos T, lo cual conduce a disminuir la producción de IL-2, citoquina responsable, a su vez, de activar las células NK y LAK (59). Los embriones de conejo también producen PGE $_2$ , eutacoide que regula la actividad citotóxica de las células NK y LAK (3).

Al culminar el proceso de la placentación, la región placentomal del endometrio contiene solo unos pocos linfocitos (23). Los cotiledones placentarios producen dos factores: uno con una movilidad relativa (MR) de  $4 \times 10^6$  y otro con una MR entre 46000 y 162000, los cuales pueden inhibir la proliferación linfocitaria (29). A medida que la gestación progresa, hay una disminución en el número de los linfocitos en el endometrio interplacentomal (23, 48). En el epitelio glandular, por su parte, la disminución es más pronunciada para los linfocitos no granulados, mientras que en el estroma disminuyen las células presentadoras de antígeno (*Antigen Presenting Cells*, o APC) - con marcadores CMH-II $^+$  y T19 $^+$  (27). Es probable que la progesterona sea responsable, en forma directa o indirecta, de algunos de los cambios observados en las áreas estromales y glandulares del endometrio interplacentomal, puesto que el tratamiento de ovejas ovarientomizadas con progesterona durante 60 días disminuye el número de células MHC-II $^+$  y CD45R $^+$  en el endometrio (24).

En las diferentes especies domésticas se ha descrito una serie de factores específicos para cada una de ellas, responsables del reconocimiento materno de la gestación: en rumiantes se conocen los INF $\tau$  (proteína trofoblástica bovina o bTP, proteína trofobástica

ovina, u oTP), en equinos, primates y roedores la gonadotropina coriónica, en ratas la prolactina y en porcinos los estrógenos del embrión. Todas estas sustancias ejercen el mismo papel, relacionado con el mantenimiento de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo para permitir su transición de cuerpo lúteo cíclico a gestacional, y regulan la respuesta inmune de la madre para favorecer la implantación del embrión. Todos los mecanismos de acción comprometidos no se han precisado aún, si bien se han hecho importantes adelantos en la identificación de procesos específicos en algunas especies. Esta es una de las áreas de mayor investigación en el momento.

#### *Presencia de células inmunocompetentes en la interface materno fetal.*

En el útero de los mamíferos se encuentran células inmunocompetentes de todos los linajes linfohematopoyéticos y por ser éste el único órgano materno expuesto a antígenos de tejidos foráneos (semen y embriones), allí se pueden encontrar poblaciones de linfocitos con funciones especializadas, diferentes a las que podrían desarrollar en otros contextos de la respuesta inmune. De otro lado, las células NK aisladas del útero murino cuando sufren diferenciación *in situ* cambian su expresión de proteínas de superficie y se localizan en los sitios de implantación donde secretan citoquinas (18). Sin embargo, si se cultivan células NK en presencia de IL-2, provocan la lisis del trofoblasto placentario, por lo que se considera que estas células podrían estar comprometidas en fallas de la gestación. En cerdos se encuentra actividad de células NK entre los días 9 y 28 de la gestación (17) y las células NK porcinas cultivadas *in vitro* no requieren tratamiento con IL-2 para presentar actividad lítica contra el trofoblasto (19, 42), lo cual sugiere que las células NK uterinas pueden desempeñar funciones líticas importantes durante la gestación y que las células del trofoblasto tienen que ser protegidas (18): situación que da una idea de los complejos procesos de regulación existentes en el microambiente placentario. De otro lado, los linfocitos T CD4 $^+$ , una de las subpoblaciones más importantes del sistema inmune, que como consecuencia de la activación de la respuesta inmune secretan citoquinas capaces de activar otras células inmunes como macrófagos, linfocitos B y linfocitos T CTx, podrían estar involucradas en la falla gestacional; bajo condiciones normales estas células tienen la capacidad de generar una respuesta inmune capaz de eliminar cuerpos extraños (67). Según Lambert (1997) la regulación negativa de los recepto-

res de CD4 en células T, mediada por la producción de TGF $\beta$ 2 líquido blastocístico del conejo el día 12 de la gestación, es una de las posibles explicaciones para la sobrevivencia del feto al ataque inmune materno (34, 67), lo cual indicaría que la colonización leucocitaria del endométrio uterino es una característica de algunas especies de animales durante la gestación, al parecer con funciones diferentes a la de los linfocitos que participan en la respuesta inmune sistémica (67).

**Distribución de los leucocitos en el útero gestante de los rumiantes.** La invasión de las células fetales binucleadas y la posterior formación de sincitio en los placentomas tiene profundos efectos en la distribución de leucocitos durante la gestación en ganado ovino y bovino. Antes de la formación del sincitio, los linfocitos intraepiteliales (IELs) están igualmente distribuidos en las regiones interplacentomal e intraplacentomal; sin embargo, en las regiones de sincitio continuo de los placentomas los IELs no están presentes (23, 52, 64, 69).

La proximidad al tejido sincitial afecta la distribución de los leucocitos en el estroma endometrial. En la región interplacentomal de la vaca, muchas células ubicadas en el estroma uterino expresan el marcador CD45<sup>+</sup> y existe una banda de células MHC-II<sup>+</sup> (presentadoras de antígeno) bajo el epitelio uterino, si bien los antígenos MHC-I<sup>+</sup> tienen expresión diferencial en las regiones interplacentomal y placentomal (20). En los placentomas, por su parte, sólo hay unas pocas células MHC-II<sup>+</sup> ubicadas de manera aislada alrededor de los vasos sanguíneos y algunas células CD45<sup>+</sup> distribuidas al azar en la septa caruncular (52). Esto sugiere una expresión diferencial de antígenos de histocompatibilidad dependiendo de la zona de mayor o menor contacto entre los antígenos embrionarios-fetales y maternos, lo cual podría contribuir al mantenimiento de la gestación; esto es, poca expresión en las áreas de mayor contacto y viceversa.

En los ovinos, el patrón general de reducción del número de linfocitos durante la gestación no se mantiene en el epitelio luminal; más bien, el número de linfocitos granulados en el endométrio interplacentomal aumenta durante la gestación, hasta el grado en que se estima que comprometen un 10 % de las células en el epitelio para el día 127-134 de la gestación (48), con predominio de linfocitos granulados con fenotipo CD8<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup> (55); su tamaño y número de gránulos -elementos indicadores de su activación- au-

mentan al final de la gestación (23, 48, 55). Asimismo, hay una gran expresión de los marcadores de la activación CD25, CD29, L-selectina y CD44 en las células  $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup> aisladas del epitelio luminal del cuerno uterino gestante de ovejas, lo cual no sucede en las células aisladas del cuerno no gestante o del endométrio o de ovejas vacías cíclicas (27). Lo anterior sugiere que estas células no sólo sufren cambios morfológicos y funcionales durante el transcurso de la gestación, sino que éstos reponen a papel que juegan en un momento determinado durante la gestación, al igual que se ha sugerido para las células GMG en murinos.

Durante la gestación tardía en la vaca, tiempo en el cual se han formado los vellos coriónicos y se ha establecido un íntimo contacto con el tejido materno, los antígenos MHC-I<sup>+</sup> se expresan sólo en áreas limitadas del epitelio coriónico de la región interplacentomal, pero no en la región cotiledonaria vellosa de los placentomas (52). De otro lado, la expresión de moléculas MHC-II<sup>+</sup> no ha sido detectada en trofoblasto de ganado ovino o bovino (20), lo cual sugiere que están selectivamente distribuidas en el componente materno.

Por su parte, las células CD8<sup>+</sup>, las cuales ejercen funciones citotóxicas o supresoras, están localizadas casi exclusivamente en el epitelio luminal y glandular del estroma adyacente al epitelio (9), mientras que las células CD4<sup>+</sup>, están limitadas al tejido estromal. Los macrófagos también están presentes en las regiones estromales del endométrio (29). En animales afectados por endometritis se observa una alta migración de linfocitos dentro de los cuales se hallan células B (30), lo cual sugiere que la infección puede generar anticuerpos uterinos específicos (50). Bajo condiciones normales, en el útero hay más IgG que IgA (12, 13, 46). Esto podría representar una excepción de la inmunidad de mucosas en donde suele predominar la IgA, con posibles implicaciones para el proceso gestacional.

Los linfocitos  $\gamma$  $\delta$ T incrementan su número en la gestación media y tardía en la oveja, también aumenta su granularidad y expresan altas cantidades de antígenos de activación como el CD25 (29, 48). En concordancia con el éxito de la gestación, las células  $\gamma$  $\delta$ T usualmente no están involucradas con el rechazo de injertos (26) y no responden bien al estímulo alógeno (21). En ratones estas células funcionan como productoras de citoquinas (74) o ejercen efectos

supresores (67). En bovinos por su parte, se han identificado linfocitos granulares en las regiones epiteliales y subepiteliales del endometrio que podrían ser análogos a las células granuladas  $\gamma\delta$ T de las ovejas (48) o a los GMG y LGL de murinos y primates (15, 43).

Van der Wielen y King, 1984, observaron cambios significativos en el número de IELs en el endometrio bovino durante el ciclo estrual, cuando el número tiende a ser bajo a los días 10 y 15 del ciclo, comparado con los días 5 y 20 (69). Utilizando marcadores específicos de diferenciación en muestras de matadero, Cobb y Watson (1995) informaron altos números de células T,  $CD5^+$  y  $CD8^+$ , en la fase folicular del ciclo estrual; alto número de células  $CD4^+$  en la fase luteal-media y terminal; y cambios cíclicos en el número de macrófagos. Para la gestación temprana, el número de IELs disminuye, mientras que a los 27 días de gestación el número se redujo a menos de la mitad del número hallado durante el ciclo estral la gestación inicial (9). En consecuencia se ha encontrado una concordancia entre la disminución de los IELs y el tiempo de formación del sincitio - cuando ocurre la invasión de las células coriónicas binucleadas dentro del epitelio materno. Además, la disminución parece estar relacionada con la producción de moléculas derivadas del trofoblasto tales como INF $\tau$ . Sin embargo, desde la mitad hasta el final de la gestación hay muchas diferencias en la distribución linfocitaria cuando se comparan todas las zonas del endometrio (29). Las células teñidas por antígenos comunes de leucocitos y por MHC-II $^+$  - macrófagos y células B- son más abundantes en el epitelio luminal del endometrio intercaruncular que en la septa caruncular del placentoma (52).

**Linfocitos T( $\gamma\delta$ ) asociados con la gestación en el útero de los rumiantes.** Meeusen et al., 1993, clasificaron los IELs del epitelio luminal en rumiantes en tres grandes subclases: cerca del 50 % de los IELs en ovejas son células con el fenotipo  $CD8^+CD45R^+TCR\gamma\delta^-$  los cuales parecen ser linfocitos T ( $TCR\alpha\beta^+$ ) y puede funcionar como otros linfocitos  $CD8^+$  clásicos en el contexto de la respuesta citolítica contra células infectadas por protozoos o virus, mediada por antígenos MHC-I $^+$  (29). Los demás IELs expresan el antígeno  $CD45R^+$ , el cual les permite reaccionar en sangre periférica con las células B y una pequeña fracción de células T vírgenes (53). Una segunda clase de IELs tiene el fenotipo  $CD8^+CD45R^+TCR\gamma\delta^-$  (aproximadamente el 25 %) mientras que la última tiene un fenotipo

$CD8^+CD45^+TCR\gamma\delta^+$  y contiene gránulos prominentes (el 25 % restante). A pesar que los IELs no reaccionen fuertemente con los marcadores  $CD5$  de las células T (23, 47, 55) y la expresión de marcadores  $CD8$  es débil para los linfocitos  $CD45R^+$ , estos últimos no son células B, puesto que hay poca expresión de marcadores para estas células en los IELs del endometrio (55).

Otros linfocitos parecidos a los  $TCR\gamma\delta^+$ , una población con el fenotipo  $CD8^+CD45^+TCR\gamma\delta^+$  puede participar en el reconocimiento de antígenos microbianos y células tumorales (26). Los linfocitos  $TCR\gamma\delta^+$  murinos secretan TGF $\beta$  para suprimir la activación de otros IELs del endometrio mediada por aloantígenos (66). Cabe recordar que los linfocitos T- $TCR\gamma\delta^+$  no reconocen antígenos del MHC ni participan en el rechazo de tejidos (26). Los LGL y los GMG tienen muchas características pero también difieren en ciertos aspectos de las células NK periféricas (43.) y dado que los distintos IELs endometriales de oveja, LGL humanos y GMG no expresan  $CD8$  (16, 43), se deduce que no se trata de los linfocitos T de sangre periférica.

Aún no se han desarrollado anticuerpos marcadores y bioensayos para identificar con precisión las células NK de la oveja y hasta el momento sólo se puede especular que fueran células parecidas a las LGL o GMG (27). Por morfología, los linfocitos del útero de la oveja más parecidos a los LGL humanos y a las GMG de ratón, son los linfocitos del fenotipo  $CD8^+CD45R^+\gamma\delta TCR^+$ , porque su tamaño y granularidad también aumentan al final de la gestación (48, 55). Sin embargo, no se sabe si los IELs  $\gamma\delta TCR^+$  endometriales de la oveja tienen actividad NK, porque los conceptus están potencialmente en riesgo de sufrir lisis mediada por células citolíticas. Segerson y Gunsett (1994) demostraron que las células LAK pueden lisar conceptus de oveja en el periodo de la peri-implantación (62).

**Cambios en el número de linfocitos durante la gestación.** Investigaciones detalladas de los fenotipos de las subpoblaciones de linfocitos en el útero de los rumiantes, se han centrado, particularmente en la oveja, en los linfocitos del epitelio luminal, un compartimento que ausente en el útero de los humanos y los roedores (20). Durante el ciclo estral y la gestación (días 18-46) en la oveja, los linfocitos predominantes en los epitelios carunculares, intercaruncular y glandular son linfocitos  $CD8^+$  no granulados  $\gamma\delta TCR^-$  (57, 55). Puesto que no se dispone de marcadores para identificar los linfocitos  $CD3^+TCR\alpha\beta^+$  ovinos, por analogía

con otras especies se ha asumido que estas células, que como vimos son aproximadamente el 50 % de los IELs, son  $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup> (20).

Durante la gestación temprana en la oveja hay una moderada reducción en el número de células IELs en la región interplacentomal, particularmente de la subpoblación no granulada. Sin embargo al final de la gestación, hay un incremento dramático en el número de linfocitos granulados en el epitelio luminal, que poseen el fenotipo inusual CD8<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>. Para los días 127-134, estas células  $\gamma\delta$ T forman aproximadamente el 10 % de las células del epitelio (48) y han incrementado en granularidad (tamaño y número de gránulos), lo que sugiere que han sufrido activación (23, 55). Estas células también se han hallado en el epitelio uterino de ocho especies diferentes de rumiantes (38), sin embargo no está claro si esta aparente activación durante la parte final de la gestación es común en todos los rumiantes.

Durante el ciclo estral y la gestación de la vaca, ocasionalmente se observan IELs (69). En el venado, no ocurre un cambio apreciable de la frecuencia de IELs totales con la progresión de la gestación (54). Sin embargo, en los animales no gestantes el número de IELs grandes y granulados fue mayor y los IELs disminuyeron en los estados temprano y final de la gestación (49). En contraste con la oveja, la frecuencia de los linfocitos fue similar en el endométrio caruncular e intercaruncular. Este hallazgo puede estar relacionado con el hecho de que la placenta de los venados tiene una menor área extensiva de sincitio que en el ganado y la oveja (72).

El subgrupo de células  $\gamma\delta$ T es de interés particular en el ganado y en las ovejas puesto que éste constituye cerca del 75% de las células mononucleares circulantes (55); éstas son CD2<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> -triple negativas (32). Los IELs  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> del útero ovino parecen ser un subgrupo inusual de las células  $\gamma\delta$ T. Mientras tanto, otras células  $\gamma\delta$ T circulantes de rumiantes (97-99%) expresan un antígeno conocido como T19, una glicoproteína de superficie que no se expresa en las células  $\gamma\delta$ T en el epitelio uterino ovino (55). Esto demuestra que a pesar de compartir el marcador  $\gamma\delta$ , estas células sufren modificaciones funcionales asociadas con el tejido en el cual se encuentran.

El hecho de que los fenotipos CD45R<sup>+</sup>T19<sup>+</sup> típicos de los IELs  $\gamma\delta$ T<sup>+</sup> granulados en el útero ovino sólo repre-

sentan una menor parte de las células  $\gamma\delta$ T circulantes, podría implicar que las células  $\gamma\delta$ T uterinas pueden ser reclutadas selectivamente de una pequeña subpoblación de células  $\gamma\delta$ T circulantes (20). Además, las células  $\gamma\delta$ T circulantes son CD8<sup>-</sup>, mientras que los IELs granulados uterinos  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> expresan CD8, aunque en concentraciones más bajas que los IELs  $\gamma\delta$ TCR<sup>-</sup> (55). Las diferencias en el fenotipo de CD8 entre los linfocitos de sangre periférica (PBLs) y los IELs se ha reportado en otras especies. En el ratón, los PBLs predominantes son CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$ TCR<sup>+</sup>, mientras que los IELs intestinales las forma homodimérica CD8<sup>+</sup> $\alpha\alpha$ TCR<sup>+</sup> (25).

La función de las células  $\gamma\delta$ T en la gestación de los rumiantes es desconocida. Su ubicación dentro del epitelio uterino en estrecha proximidad con el trofoblasto es una posición ideal para influenciar el crecimiento trofoblástico o la secreción de hormonas mediante la producción de citoquinas. Por otro lado, ellas podrían ser una primera línea de defensa contra patógenos infecciosos, como se ha sugerido para las células  $\gamma\delta$ T dentro de las capas epiteliales de otras mucosas (20). Considerando el linaje respectivo, las células  $\gamma\delta$ T uterinas granuladas pueden proveer funciones equivalentes a las de las células uNK encontradas en el útero humano y murino. Estudios recientes han demostrado actividad citolítica contra blancos sensibles a NK, no restringida al MHC, por células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> de ganado (4).

El conceptus ovino es susceptible de lisis por células LAK (NK activadas por linfoquinas) generados a partir de leucocitos de sangre periférica (*Peripheral Blood Leukocytes*, o PBLs) *in vitro* (62). La preincubación de PBLs ovinos no adherentes con INF- $\tau$  aumenta la lisis de células blanco K562 (68). Las células blanco tumorales utilizadas para evaluar la actividad lítica de las NK en otras especies (K562, YAC-1, HL60S, HL60R), no son eficientemente lisadas por los PBLs bovinos, a menos que éstos sean activados por IL2 (5, 6, 37, 61), como se observa en el modelo murino (18). En conclusión, tanto las células NK obtenidas de sangre periférica como las del útero tienen la capacidad de lisar el trofoblasto cuando son estimuladas con IL-2.

La identificación de gránulos en las células NK bovinas similares a las células NK de los humanos y los roedores ha sido dificultosa y los resultados no han sido concluyentes (11). Se ha clonado dos pobla-

ciones de linfocitos capaces de lisar antígenos no restringidos al MCH (41), que no expresaron antígenos de superficie CD5, CD6 o WC1 (Marcadores  $\gamma\delta T$ ); un clon expresó CD2 y el otro expresó CD8 homodimérico (20).

Finalmente en ratones (16) se ha descrito la presencia de poblaciones celulares con granulaciones citoplasmáticas parecidas a las descritas en rumiantes, como células grandes y granuladas que se tiñen PAS<sup>+</sup> al igual que en el modelo antes (64, 65), de las cuales se han sugerido que producen algunas citoquinas (26). Estas células en ratones (16) se han clasificado como uNK, las cuales se han identificado mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti-asialo GMI (14, 22, 34), anti-LGL-1 (18, 34) y anti-CD56 (40, 41); y por la lisis de algunos blancos susceptibles a células NK como K562 (41, 50), YAC-1 (14, 18, 20, 22, 50), HL60S, HL60R (20), por lo que planteamos la posibilidad de identificar y caracterizar este tipo de células GMG con gránulos citoplasmáticos, descritas por Lee (1997) en el útero de la vaca (52).

### *Perspectivas de investigación*

El campo de investigación en inmunología de la reproducción es un área del conocimiento que apenas esta iniciando su desarrollo, se espera que con la disponibilidad de nuevas técnicas de análisis incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales y la utilización de los procedimientos de la biología molecular, muchos de estos cuestionamientos puedan ser solucionados; sin embargo es necesario empezar a abordar el tema desde el punto de vista teórico y diseñar procedimientos experimentales apropiados. Una posibilidad consiste en estandarizar la técnica de cortes histopatológicos teñidos con la coloración PAS y hematoxilina y eosina, con el fin de caracterizar durante la gestación de la vaca las poblaciones leucocitarias desde la implantación, hasta el final de la gestación; asimismo, se podrían separar poblaciones de IELs mediante la utilización de gradientes y hacer ensayos de lisis de blancos celulares de células NK, con la utilización de activadores y reguladores de la respuesta lítica.

La inmunología de la reproducción en bovinos se podría explorar en áreas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones (TE), en las cuales se podría definir si las variaciones en los antígenos

de histocompatibilidad entre el embrión y el útero de la hembra receptora, tienen algo que ver en la modulación de las poblaciones celulares durante la gestación y, en consecuencia, en las bajas tasas de éxito gestacional. Recordemos que en la TE el embrión puede llegar a tener hasta un 100% de antígenos de histocompatibilidad diferentes a la receptora. Asimismo, no se conoce si estas diferencias pueden tener o no relación con el mayor o menor desarrollo de la placenta, porque en algunos estudios se ha encontrado mayor peso de los terneros producto de transferencia de embriones.

Otros problemas que se podrían enfocar desde este campo en bovinos, serían los relacionados con los terneros de bajo peso al nacer y con el síndrome del terno débil, situaciones en las cuales se podría presentar algún grado de anomalía de la respuesta inmune materna para favorecer la gestación (respuesta inmunotrópica (70, 71), como se ha sugerido para otras especies (58).

Las células inmunes ejercen importantes funciones en el proceso del parto, tanto en lo que respecta a el desprendimiento entre cotiledones y carúnculas, para la expulsión normal de la placenta, como en la migración de células inmunocompetentes para contribuir a la involución uterina y la eventual eliminación de infecciones postparto. Conocer la dinámica de las poblaciones de leucocitos implicaría, por tanto, la posibilidad de mejorar las aproximaciones terapéuticas y las medidas preventivas para casos de infecciones uterinas y retención placentaria. Este problema es de particular interés en las vacas lecheras de alta producción, en las cuales se ha encontrado alteraciones de la respuesta inmune consecuentes al desbalance metabólico.

Las células NK parecen tener importantes implicaciones en la ontogenia y filogenia del sistema inmune. El conocimiento del papel de las poblaciones leucocitarias en el útero bovino y en particular de las células NK o sus análogas, permitiría también profundizar el conocimiento de la función de estas células "enigmáticas", y contribuir a al avance de la controversia sobre su papel dual (inmunotrópicas e inmunodistróficas) en la gestación, como se ha evidenciado en otras especies. Por último, a mejorar la eficiencia de la reproducción en esta especie doméstica.

### Summary

Under physiological conditions the mammal uterus is exposed to fetal and paternal antigens that could generate immune responses harmless toward the semiallogenic conceptus at any time during pregnancy. Several strategies evolved have evolved depending on the specie in order to maintain the fetus alive which include: type of placentation, the presence of specific cell populations at the materno-fetal interface, and specific cytokines produced at the local microenvironment during pregnancy. The placentation in ruminants is characterized by the presence of some lineage of  $\gamma\delta$ TCR lymphocytes which display specific protective functions similar to that excerpted by NK cells (LGL and GMG) in primates and rodents, respectively. These cells also have similar morphology to NK lineages, but exhibits different expression of specific cell surface markers. The proposal of the present article is to review leukocyte populations present at the ruminant uterus during the estrus cycle and during the processes of implantation, placentation, pregnancy maintenance, and parturition. Thereafter, we focused on the cell surface markers until now characterized and the homologies between ruminants and human or murine uterine leukocyte populations. Finally we shall mention specific topics for development of research in bovine reproductive immunology with potential use for improving reproductive efficiency.

**Key words:** Bovine, Epitheliochorial placentation,  $\gamma\delta$ TCR cells, GMG cells, LGL cells, NK cells, PAS<sup>+</sup> cells.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Antioquia (Acta 216 del CODI) y a Metrosalud (OS 448 de 1997) por la financiación de la línea de investigación en Células NK del Grupo de Teriogenología; y al Municipio de Medellín por la financiación de Ernesto López R. Agradecimiento especial a la Estampilla pro-desarrollo de la Universidad de Antioquia, por la financiación de la investigación en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (CRICAN, fases I y II).

### Referencias

1. Bazer FW, Geisert RD, Zavy MT. Fecundación, escisión e implantación: En reproducción e Inseminación artificial en animales. ESE Hafes (ed). Interamericana, McGraw-Hill, Sexta edición, 1996. pp 195-196.
2. Beer AE, Billingham. The Embryo as a Transplant. *Sci Am* 1974;230:26-46.
3. Bergeron D, Ouellette MJ, Lambert RD. PGE<sub>2</sub>, but not TGF $\beta$ <sub>2</sub>, in rabbit blastocoelic fluid regulates the cytotoxic activities of NK and LAK cells. *J Reprod Immunol* 1997; 33: 203-219.
4. Brown WC, Davis WC, Choi SH et al. Functional and phenotypic characterization of WC1  $+\gamma\delta$  T cells isolated from *Babesia bovis* -stimulated T cell lines. *Cell Immunol* 1994; 153:9-27.
5. Campos M, Bielefeldt Ohmann H, Rapin N, Babiuk LA. Demonstration of the in vitro antiviral properties of bovine lymphokine-activated Killer (LAK) cells. *Viral Immunol* 1991;4:259-268.
6. Campos M, Rossi CR, Bielefeldt-Ohmann H, et al. Characterization and activation requirements of bovine lymphocytes acquiring cytotoxic activity after interleukin-2 treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;32:205-223.
7. Campos M, Rossi CR. Natural cell mediated cytotoxicity to cells infected with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;14:45-56.
8. Clark DA. Controversies in reproductive immunology. *Crit Rev Immunol* 1991; 11: 215-247.
9. Cobb SP, Watson DE. Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the estrus cycle. *Res Vet Sci* 1995; 59: 229-237.
10. Cook CG, Splitter GA. Characterization of bovine mononuclear cell population with natural cytolytic activity against bovine herpesvirus I-infected cells. *Cell Immunol* 1989;120:240-249.
11. Cook CG, Splitter GA. Comparison of bovine mononuclear cells with other species for cytolytic activity against virally-infected cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1989;20:239-261.
12. Corbeil LB, Duncan JR, Schurig GGD, Hall CE, Winter AJ. Bovine venereal vibriosis: Variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect Immun* 1974; 10:1084-1090.
13. Corbeil LB, Hall CE, Lein D, Corbeil RR, Duncan JR. Immunoglobulin classes in genital secretions of mycoplasma-infected and normal heifers. *Infect Immunol* 1976; 13: 1595-1600.
14. Croy BA, Gambel P, Rossant J, Wegmann TG. Characterization of murine decidual natural Killer (NK) cells and their relevance to success of pregnancy. *Cell Immunol* 1985; 93:315-326.

15. Croy BA, Gilbert LJ, Browne MA, et al. Characterization of cytokine production by metrial gland and granulated metrial gland cells. *J Reprod Immunol* 1991; 19:149-166.
16. Croy BA, Kiso Y. Granulated metrial gland cells: A natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microsc Res Tech* 1993 25:189.
17. Croy BA, Waterfield A, Wood W, King GJ. Normal murine and porcine embryos recruit NK cells to the uterus. *Cell Immunol* 1989;115:471.
18. Croy BA, Yu ZM, King GJ. A review of the natural Killer cell lineage in the uterus of the mouse and of the pig. *J Anim Sci* 1994; 72 (Suppl. 3): 9-15.
19. Drake BL, Head JR. Murine trophoblast can be killed by lymphokine activated Killer cells. *J Immunol* 1989;143:9
20. Engelhardt H, King GJ. Uterine natural killer cells in species with epitheliochorial placentation. *Nat Immun*, 1996-97;15:53-69.
21. Evans CW, Lund BT, McConnel, Bujdoso R. Antigen recognition and activation of ovine  $\gamma\delta$  T cell. *Immunology* 1994; 82:229-237.
22. Gambel P, Croy BA, Moore WD, et al. Characterization of immune effector cells present in early murine decidua. *Cell Immunol* 1985; 93:303-314.
23. Gogolin-Evens KJ, Mercer WR, Brabdon MR. Site-directed differences in the immune response to the fetus. *Immunology* 1989; 66: 312-317.
24. Gottshall SL, Hansen PJ. Regulation of leukocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. *Immunology* 1992; 76: 636-641.
25. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocytes populations with different T cell receptors: A role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991; 173:471-481.
26. Haas W, Pereira P, Toneqawa S. Gamma/delta cells. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 637-685.
27. Hansen PJ, Liu W. Immunological aspects of pregnancy: concepts and speculations using the sheep as a model. *Anim Reprod Sci* 1996; 34: 483-493
28. Hansen PJ, Bazer FW, Segerson EC. Skin survival in the uterine lumen of ewes treated with progesterone. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986; 12: 48-54.
29. Hansen PJ. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology* 1997; 47:121-130
30. Hartigan PJ, Murphy JA, Nunn WR, Griffin JFT. An investigation into causes of reproductive failure in dairy cows. II-Uterine infection and endometrial histopathology in clinically normal repeat-breeder cows. *Irish Vet J* 1972; 26: 245-247.
31. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY et al. Roles of growth factors during peri-implantation development. *Mol Hum Reprod* 1995; 10: 712-718.
32. Hein WR, Mackay CR. Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* 1991;12:30-34.
33. Houillon CH. Embriología. Ed Omega SA. Barcelona, 3 ed, 1975. pp 110-113.
34. Hunt JS. Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol Reprod* 1994; 50: 461-466.
35. Imakawa K, Helmer SD, Nephew KP, Meka CS, Christenson RK. A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon, ovine trophoblast protein-1. *Endocrinology* 1993;132:1869-1871.
36. Jainudeen MR, Hafes, ESE. Gestación, fisiología prenatal y parto. En reproducción e Inseminación artificial en animales. ESE Hafes (Ed). Interamericana, McGraw-Hill, Sexta ed, 1996. pp 206-212
37. Jensen J, Schultz RD. Bovine natural cell mediated cytotoxicity (NCCM): Activation by cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 1990;24:113-124.
38. Kellas LM. An intra-epithelial granular cell in the uterine epithelium of some ruminant species during the pregnancy cycle. *Acta Anat (Basel)* 1961;44:109-130.
39. Kiger N, Chaouat G, Kolb JP, Wegmann TG, Guenet JL. Immunogenetic studies of spontaneous abortion in mice. Preimmunization of females with allogenic cells. *J Immunol* 1985; 134: 2966
40. King A, Burrows T, Loke YW. Human natural Killer cells. *Nat Immun* 1996-97 ;15:41-52
41. King A, Karlra P y Loke YW. Human trophoblast cell resistance to decidual NK lysis is due to lack of NK target structure. *Cell Immunol* 1990 127:230-237.
42. King A, Loke YW. Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL2-stimulated decidual NK cells. *Immunol* 1990;129:435.
43. King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991; 12: 432-435.
44. King GJ, Atkinson BA, Robertson JA. Implantation and early placentation in domestic ungulates. *J Reprod Fertil Suppl* 1982; 31: 17-30
45. King GJ. Comparative placentation in ungulates. *J Exp Zool* 1993; 266: 588-602.
46. Lander Chacim MF, Hansen PJ, Drost M. Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in Cattle. *Theriogenology* 1990; 34: 1169-1184.
47. Lee CS, Gogolin-Ewens K, Brandon MR. Identification of a unique lymphocyte subpopulation in the sheep uterus. *Immunology* 1988; 63: 157-164.
48. Lee CS, Meeusen E, Gogolin-Ewens K, Brabdon MR. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of non pregnant and pregnant sheep. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:90-96.
49. Lee CS, Wooding FBP, Morgan G. Quantitative analysis of intraepithelial large granular lymphocyte distribution and maternofetal cellular interactions in the

- synepitheliochorial placenta of the deer. *J Anat* 1995; 187:445-460.
50. Lee CS, Wooding FBP, Morgan G. Quantitative analysis throughout pregnancy of intraepithelial large granular and non-granular lymphocyte distribution in the synepitheliochorial placenta of the cow. *Placenta* 1997; 18:675-681.
  51. Liu WJ, Hansen PJ: Effect of the progesterone-introduced serpin-like proteins of the sheep endometrium on natural-Killer cell activity in sheep and mice. *Biol Reprod* 1993, 49:1008-1014.
  52. Low BG, Hansen PJ, Drost M, Gogolin. Ewens KJ: Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. *J Reprod Fertil* 1990;90:234-243.
  53. Mackay CR, Maddox JF, Brandon MR. A monoclonal antibody to the p220 component of sheep LCA identifies B cells and a unique lymphocyte subset. *Cell Immunol* 1987;110:46-55.
  54. Mackay CR, Maddox JF, Brandon MR: Three distinct subpopulations of sheep T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1986; 16:19-25.
  55. Meeusen E, Fox A, Brandon M, Lee CS. Activation of uterine intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells receptor-positive lymphocytes during pregnancy. *Eur J Immunol* 1993; 23:1112-1117.
  56. Menge AC. Early embryo mortality in heifers isoimmunized with semen and conceptus. *J Reprod Fertil* 1969; 18:67-74.
  57. 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 Microbiol* 1989; 19: 99-107.
  58. Ossa JE, Cadavid AP, Maldonado JG. Is the immune system necessary for placental reproduction? A hypothesis on the mechanisms of alloimmunotherapy in recurrent spontaneous abortion. *Med Hypothesis* 1994; 42:193-197.
  59. Ouellette MJ, Dubois CM, Bergeron D, Roy R, Lambert RD. TGF $\beta$ 2 in rabbit blastocoelic fluid regulates CD4 membrane expression: Possible role in the success of gestation. *Am J Repod Immunol* 1997; 37; 125-136.
  60. Perry JS. The mammalian fetal membranes. *J Reprod Fertil* 1981; 62: 321-335
  61. Roberts RM, Cros JC, Leaman DW. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* 1992;13:432-452.
  62. Segerson EC, Gunsett FC. In vitro and in vivo effects of lymphokine activated Killer cells upon pre-attachment ovine conceptus. *J Immunol* 1994; 152:2938-2951.
  63. Skopets B, Li J, Thatcher WW, Roberts RM, Hansen PJ. Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (type I trophoblast interferon) and bovine interferon- $\alpha$ . *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 34: 81-96.
  64. Staples LD, Heap RB, Wooding FBP, King GJ. Migration of leukocytes into the uterus after acute removal of ovarian progesterone during early pregnancy. *Placenta* 1983; 4: 339-350.
  65. Stewart IJ. Granulated metrial gland cells in 'minor' species. *J Reprod Immunol* 1998; 40: 129-146.
  66. Suzuki T, Hiromatsu K, Ando Y, et al. Regulatory role of  $\gamma/\delta$ T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal anti-fetal immune response. *J Immunol* 1995; 154:4476-4448.
  67. Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Am J Reprod Immunol* 1996; 31: 81-95.
  68. Tuo W, Ott TL, Bazer FW. Natural Killer cell activity of lymphocytes exposed to ovine, type I, trophoblast interferon. *Am J Reprod Immunol* 1993; 29: 26-34.
  69. Van der Wielen AL, King GJ. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrus cycle and early gestation. *J Reprod Fertil* 1984;70:457-462.
  70. Wegmann TG. Maternal T cells promote placental trophoblast growth and prevents spontaneous abortion. *Immunol Lett* 1989; 17:297-302.
  71. Wegmann TG. The cytokine basis for cross-talking between the maternal immune and reproductive systems. *Cur Op Immunol* 1991; 10:765-769.
  72. Wooding FBP, Flint APF. Placentation. En: Lamming CE (Ed): *Marhall's Physiology of Reproduction*. Vol 3. Chapman & Hall, London, 1994. pp 230-460.
  73. Wooding FBP. Electron microscope localization of binucleate cells in the sheep placenta using phosphotungstic acid. *Biol Reprod* 1980;22:357-365.
  74. Wooding FBP. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta* 1983;4:527-540.
  75. Yamada H, Polgar K, Hill JA. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1339-1344.
  76. Yamamoto S, Onumma M, Kodama H, et al. Existence of cytotoxic activity against BLV-transformed cells in lymphocytes from normal cattle and sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1985; 8:63-78.