

RESÚMENES DE LA II REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE TECNOLOGÍAS EMBRIONARIAS

29 y 30 de mayo de 2014. Buenos Aires, Argentina.

A partir de esta edición se publica el material presentado en la reunión anual de la SATE. En esta primera entrega son publicadas dos conferencias plenarias. Agradecemos a dicha sociedad habernos confiado esta tarea.

Tecnologías de imágenes ultrasonográficas para evaluar la función ovárica **Adams, G.P. y Singh, J.**

Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, CANADÁ. E-mail: gregg.adams@usask.ca

Introducción

Desde el tiempo de De Graaf, los estudios de la función reproductiva se realizaron a partir de datos anatómicos e histológicos de cortes de tejidos. Aun los estudios más detallados excluyeron la dinámica de los procesos vitales y los mecanismos que los controlan. Aunque el conocimiento obtenido a partir de estudios de muestras de tejido *ex vivo* fue considerable, una comprensión más profunda de la relación estructura-función del sistema reproductivo no fue lograda hasta los '80, con la introducción de la ultrasonografía en modo-B en tiempo real. La posibilidad de visualizar los cambios en las estructuras en forma seriada, sin interrupción o distorsión de la función, revitalizó el estudio de la biología reproductiva. Hubo un cambio de paradigma en el enfoque sobre las pruebas de hipótesis y ahora es común en la investigación y la práctica clínica incluir imágenes ultrasonográficas para monitorear los patrones ováricos y uterinos y la respuesta a tratamientos experimentales o terapéuticos. El objetivo de este artículo es hacer una revisión de las imágenes ultrasonográficas en bovinos y sobre cómo las mismas han revolucionado nuestro conocimiento sobre la dinámica folicular y la dinámica luteal. Los avances técnicos, como el análisis computarizado de imágenes, imágenes tridimensionales, imágenes vasculares y biomicroscopía ultrasonográfica, son una promesa de progreso en el futuro.

Imágenes de los ovarios - El modelo bovino

Los efectos contundentes de las imágenes ultrasonográficas en la comprensión de los cambios en la fisiología ovárica no son comparables con los logrados en ninguna otra área del conocimiento. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en el humano y en el bovino, pero el énfasis de los estudios ultrasonográficos puesto en el humano y en los animales es muy diferente. Los estudios en humanos reflejan la preocupación por utilizar esta herramienta para el diagnóstico clínico (ej. detección y caracterización de patologías ováricas), mientras que el énfasis puesto en los estudios sobre animales es sobre la fisiología ovárica. Se han publicado más estudios sobre ovulación, dinámica folicular y dinámica luteal empleando el modelo bovino que los publicados utilizando el resto de las especies juntas.

Uno de los mejores ejemplos del impacto de la ultrasonografía sobre el conocimiento de la función reproductiva es el fenómeno de onda en la foliculogénesis. Hubo controversias sobre la teoría de desarrollo folicular en ondas durante tres décadas, hasta que se publicó el primer estudio sobre ultrasonografía en ovarios bovinos en 1984⁽⁵⁸⁾. Los estudios iniciales se basaron en monitorear diariamente por ultrasonografía los cambios en las poblaciones foliculares en distintas categorías de tamaño^(59, 61, 62, 63). Los resultados de estos estudios sostuvieron la teoría de ondas, pero la técnica no fue diseñada para monitorear individualmente los folículos identificados, por lo que no pudo detectarse el pasaje de un folículo individual de una categoría a otra, ya que las características detalladas de la emergencia de la onda y de la selección del folículo no estuvieron disponibles. Pronto siguieron estudios que permitieron monitorear folículos identificados individualmente^(34, 35, 46, 63, 70, 75). Esta posibilidad generó un nuevo inte-

rés y permitió una serie de avances en el conocimiento de la foliculogénesis y el desarrollo de métodos de control de la función ovárica en el bovino y otras especies ^(2, 3, 4, 11, 26, 37). Una de las ventajas más importantes del uso del método de la identificación individual ⁽³¹⁾ es la capacidad de normalizar o centralizar los datos foliculares y hormonales alrededor de un punto de referencia específico (ej. ovulación, emergencia de la onda, selección del folículo). Esto permitió desarrollar un modelo conceptual de la onda folicular genérica que brindó una explicación a la relación temporal entre los cambios endócrinos y estructurales ⁽⁶⁾.

La incorporación del concepto de onda se ha convertido en una parte esencial del diseño experimental en los estudios de la función ovárica, ya sean aquellos realizados a nivel molecular, del animal en su conjunto o de rodeo. Nosotros evaluamos características predictivas de los patrones de 2 o 3 ondas foliculares por intervalo interovulatorio (ciclo estral) para investigar la repetibilidad del patrón de onda en el individuo y los efectos de la estación del año y la edad ⁽⁴¹⁾. El patrón fue repetible en el individuo, y la duración del intervalo interovulatorio reflejó el patrón de onda; ej. 90% de los ciclos ≤ 21 días tuvieron un patrón de 2 ondas y el 80% de los ciclos ≥ 22 días tuvieron 3 ondas. Los factores que influyen en el período de dominancia folicular de la primera onda en un patrón de 2 y 3 ondas por ciclo parecen ser responsables del patrón de onda y pueden estar asociados con la madurez de la vaquillona o la demanda nutricional relativa durante el período postpuberal.

El modelo bovino de dinámica folicular, derivado de estudios en vacas vacías, se extendió a otros estados reproductivos y a otras especies. El primer estudio sobre dinámica folicular durante la preñez y el postparto fue realizado en bovinos ^(59, 36, 69). El primer estudio sobre dinámica folicular durante los períodos neonatal y prepuberal fue también realizado en bovinos en 1993 ^(7, 24). Pronto llegaron estudios de ondas foliculares en otras especies: camélidos en 1990 ⁽⁹⁾, equinos en 1993 ⁽²⁰⁾, ovinos y caprinos en 1994 ^(32, 67), muskoxen (*bóvido del ártico*), la primera especie salvaje en 1997 ⁽³⁹⁾, alce en 2001 ^(50, 51), y más recientemente en humanos ^(14, 15). A pesar del amplio rango de patrones reproductivos de estas especies (ej. poliéstricas anuales, estacionales, ovuladoras simples o múltiples, espontáneas o inducidas), el patrón folicular básico parece ser un fenómeno biológico similar.

Con mayor resolución y exámenes más rigurosos, encontramos que el patrón de onda folicular en bovinos se extiende más allá del límite documentado de los 4 mm ⁽⁴⁰⁾. Encontramos que folículos tan pequeños como de 1 mm son muy sensibles a los cambios en las concentraciones circulantes de FSH y que el crecimiento sincrónico de los folículos comienza 2 días antes que lo reportado previamente, al comienzo de la onda de FSH. También observamos que la selección del folículo dominante se manifiesta más temprano que lo documentado, caracterizada por una progresión jerárquica en un período, siguiendo la curva de FSH (5 días). Este hallazgo tuvo repercusiones importantes en el desarrollo de protocolos de superestimulación más prolongados, diseñados para brindar más tiempo a los folículos más chicos de la onda para alcanzar el tamaño ovulatorio ^(21, 22, 27).

La tecnología de imágenes por ultrasonido revolucionó el estudio del cuerpo lúteo y permitió un mayor conocimiento de las interacciones entre la luteogénesis y la foliculogénesis. Por ejemplo, actualmente es claro que la producción luteal de P4 tiene un efecto supresor del crecimiento del folículo dominante de la onda ^(8, 76), y la magnitud de la fase luteal (concentración de P4 y duración) tiene un gran impacto en el intervalo entre ondas, sanidad del folículo, competencia del ovocito y subsecuente desarrollo de la glándula luteal. Además, aproximadamente el 70% de los CL en bovinos posee una cavidad con líquido, cuyo tamaño cambia durante su desarrollo ⁽⁴⁵⁾. En estudios ultrasonográficos, la superficie luteal ⁽⁴⁴⁾ y la ecotextura ⁽⁷²⁾ estuvieron directamente relacionadas con las concentraciones circulantes y glandulares de P4, y la presencia de cavidad no influyó en la función luteal ⁽⁴⁵⁾. Los estudios ultrasonográficos posibilitaron la caracterización de fases luteales cortas durante el período peripuberal ⁽²⁵⁾, período postpartal ⁽⁶⁶⁾, y durante el reinicio de la ciclicidad estacional en el ovino ⁽¹⁸⁾ y alce ⁽⁴⁾. La persistencia luteal también fue documentada en relación a mortalidad embrionaria ⁽⁴³⁾, y la ultrasonografía arrojó luz sobre la patogenia de irregularidades ováricas tales como los quistes foliculares y luteales en el bovino ⁽⁵⁾, folículos anovulatorios hemorrágicos (HAF) en yeguas y llamas ⁽¹⁰⁾, folículos luteinizados (LUF) y síndrome ovárico poliquístico (PCOS) en mujeres ^(57, 12). Más recientemente, encontramos que las bajas concentraciones circulantes de P4 (con alta frecuencia pulsátil de LH) durante la fase de crecimiento del folículo ovulatorio resultó en un folículo dominante más grande, y subsecuentemente en un CL mayor, que produce más P4 ⁽⁵⁵⁾.

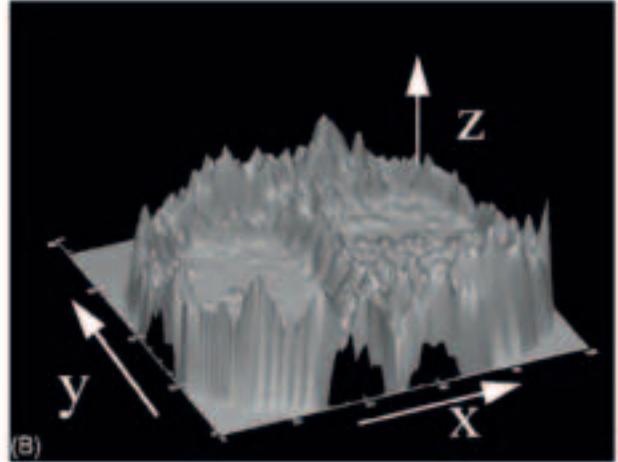
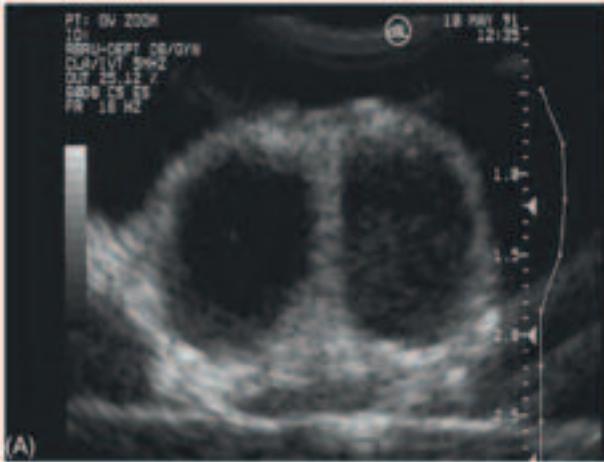
Análisis de imágenes asistido por computadora

La imagen ultrasonográfica está compuesta por miles de píxeles (*picture elements*). Cada pixel representa un reflejo discreto del tejido y se puede asumir 1 de 256 tonos de grises (desde blanco a negro) en una escala de grises de 8 bits. El ojo humano puede percibir "suavidad" de una imagen al aumentar la tonalidad de gris, pero sólo puede distinguir entre 18 a 20 tonalidades ⁽¹⁹⁾. Nuestra opinión es que la medición cuantitativa de la imagen, a través del uso de imágenes digitales de alta resolución y algoritmos informáticos permitirá a los investigadores y a los clínicos evaluar la fisiología a través del crecimiento y desarrollo folicular.

La apariencia ultrasonográfica o el patrón de imagen de un tejido se denomina *ecotextura* y está determinada por la estructura histológica del tejido ^(30, 65, 71, 72, 73). Los algoritmos informáticos fueron diseñados específicamente para el análisis de imágenes ultrasonográficas en un esfuerzo por superar las inconsistencias de la evaluación visual subjetiva, y brindar una aproximación cuantitativa al análisis del valor de pixel en la escala de grises (Synergyne 2^o, Saskatoon, SK, Canadá). Estos algoritmos se han usado ampliamente en estudios de caracterización de la ecotextura de las distintas estructuras ováricas en las distintas fases de la onda folicular ^(72, 73, 77, 78, 80).

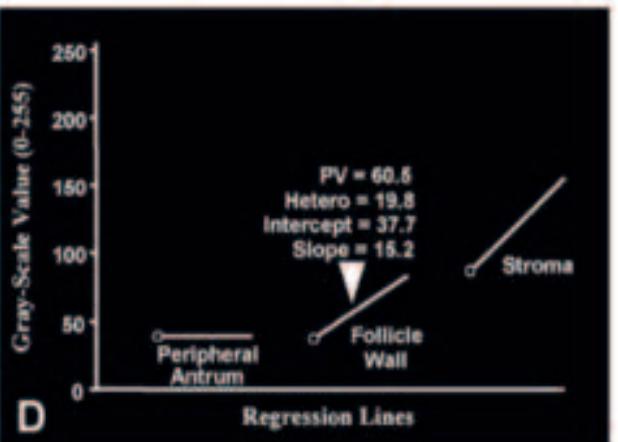
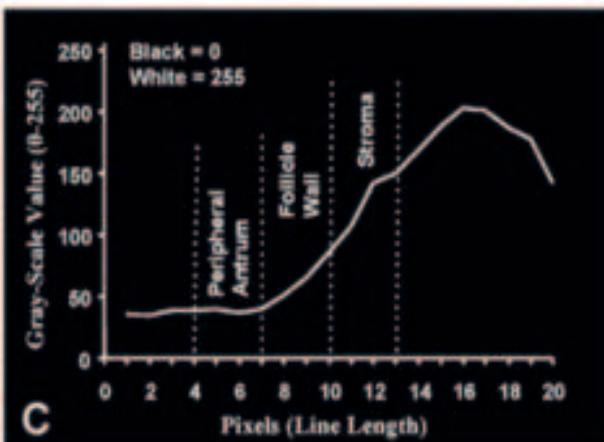
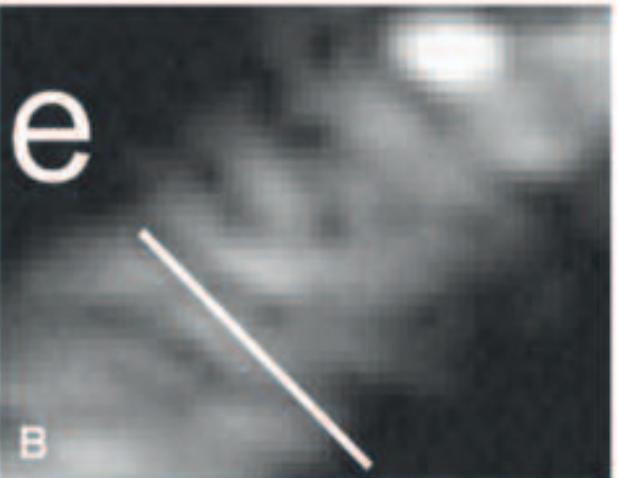
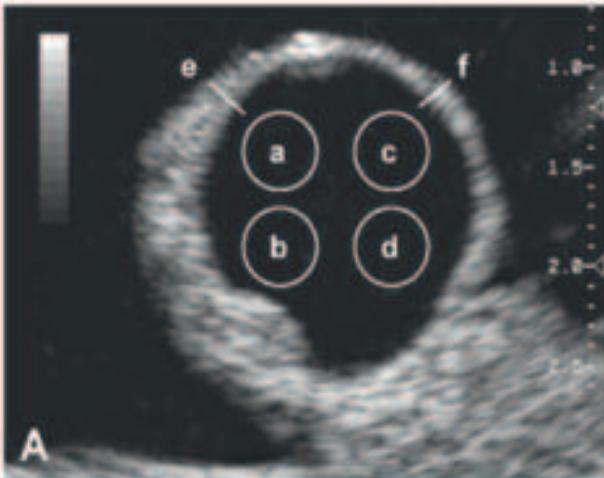
Análisis de puntos

El método cuantitativo más simple para analizar los píxeles de una imagen ultrasonográfica es seleccionar una o múltiples áreas circulares pequeñas de interés. La computadora puede determinar valores precisos de todos los píxeles (negro= 0, blanco= 255) dentro de los puntos seleccionados y sacar un valor promedio (valor de pixel promedio) y un valor de desviación estándar (heterogeneidad de píxeles). Esta simple técnica es conceptualmente similar a la técnica de medición de puntos en fotografía y puede ser utilizada para comparar valores de píxeles en varias porciones de la imagen o entre imágenes en diferentes momentos. Por ejemplo, pueden ser evaluadas porciones del antro folicular y pared en forma secuencial para detectar cambios característicos en la dominancia folicular, crecimiento, atresia, ovulación inminente, o durante el desarrollo o regresión luteal ^(6, 72, 73, 77, 78, 81).



(A) Para ilustrar la sensibilidad del análisis de datos asistido por computadora, un ovario bovino extirpado que contiene un folículo preovulatorio (izquierda) y uno en regresión (derecha) se escaneó en un baño de agua desgasificada usando un equipo de ultrasonido de alta resolución. Los dos folículos grandes fotografiados son visualmente indistinguibles

(B) Pueden detectarse diferencias claras en las paredes y antra del folículo en el análisis asistido por computadora. En una representación tridimensional de la luminosidad de los píxeles que componen la imagen de ultrasonido, la ecotextura del antra parece más heterogénea y los píxeles de la pared folicular son más brillantes y caen con mayor intensidad en el folículo de la derecha. Las características de la imagen son consistentes con la idea de que el folículo de la izquierda era el folículo dominante de una nueva onda, mientras que el folículo de la derecha era el folículo dominante de una onda anterior (modificado con autorización de Adams y Pierson, 1995).



(A, B) Análisis de la imagen ultrasonográfica asistido por computadora de un folículo ovárico. Parte de la pared del folículo de A se amplía en B para mostrar los píxeles que forman la imagen de ultrasonido. El análisis de puntos del antra se realiza midiendo el valor de píxel (negro= 0; blanco= 255) y la heterogeneidad del píxel colocando el círculo de medición en cuatro lugares diferentes (a, b, c, d) sobre el antra folículo para cubrir aproximadamente el 20% de la superficie en cada cuadrante.

(C) El análisis de línea de la periferia del antra, la pared del folículo y el estroma se llevó a cabo mediante la colocación de una línea generada por la computadora sobre la imagen ecográfica en la posición horario 10 y 2 (e, f, en la parte A, e en la parte B) y el trazado de valores de la escala de grises de los píxeles a lo largo de la línea. El gráfico de valores de píxeles se divide en tres segmentos (antra periférico, pared del folículo, estroma). La interfaz antra-pared se utilizó como punto de referencia.

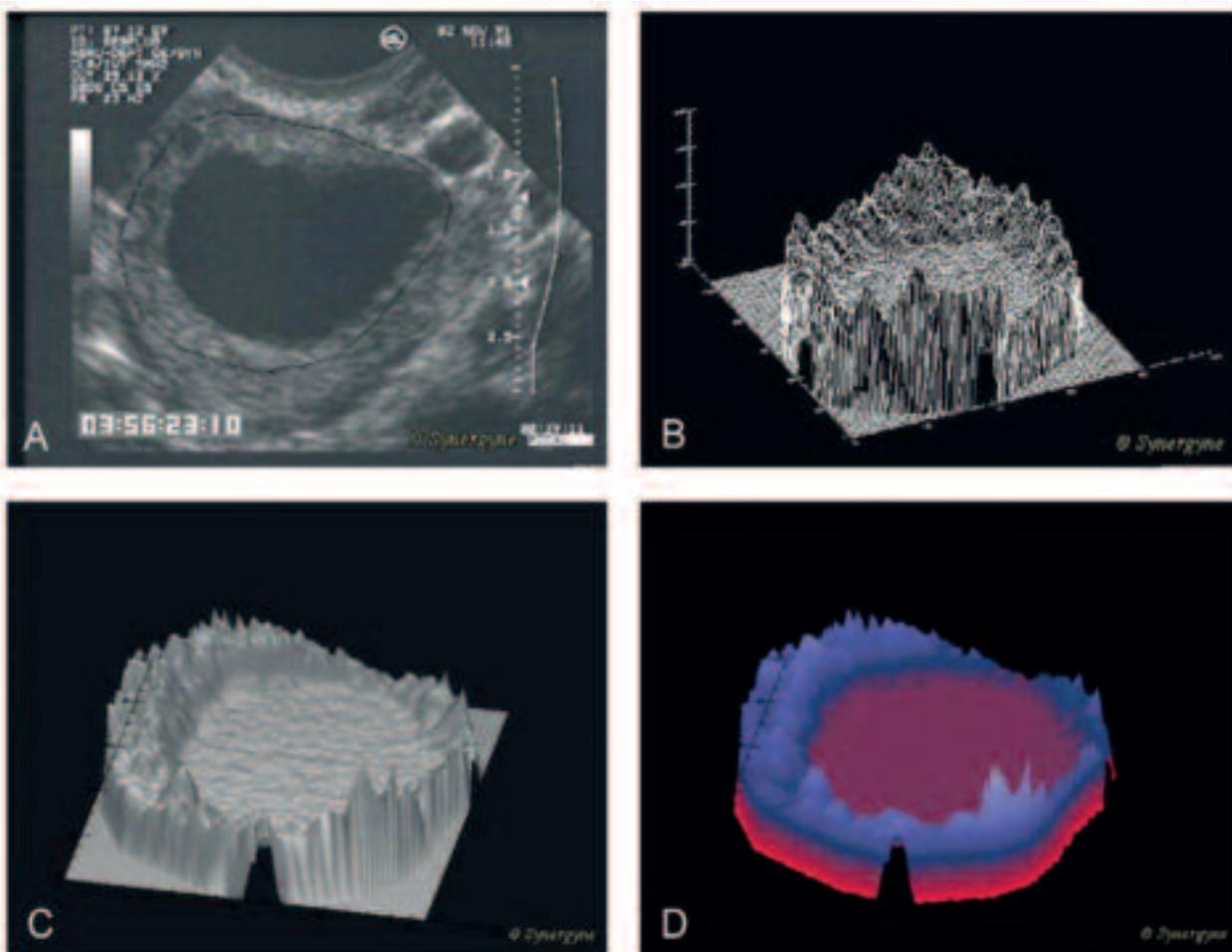
(D) el valor del píxel (PV), la heterogeneidad del píxel (Hetero) y el origen y pendiente de la recta de regresión de cada segmento se registra por separado (modificado de Singh y col. 1998).

Análisis de líneas

En forma similar, puede dibujarse una línea en una computadora (grosor de 1 píxel, o más en algunas aplicaciones) cruzando una sección específica de la imagen de un folículo para generar un gráfico en escala de grises de cada valor de píxel a lo largo de la línea. El gráfico muestra la amplitud de los ecos a lo largo de la línea. Las dos dimensiones en este tipo de gráficos son la distancia (eje de las X) y el valor de píxel (eje de las Y). El uso específico de esta herramienta consiste en detectar diferencias en la pared de un folículo a lo largo del tiempo o entre folículos. La interfaz antro-pared del folículo puede detectarse fácilmente identificando el aumento secuencial de los valores de la escala de grises a lo largo de la línea. Utilizando la interfaz antro-pared como punto de referencia, los valores de píxeles a lo largo de la línea pueden ser divididos en tres segmentos, permitiendo un análisis separado del antro periférico, de la pared y del estroma. La media de los valores de pico de píxeles, heterogeneidad de píxeles y el área bajo la curva pueden registrarse separadamente para los 3 segmentos. Además, los valores de píxeles a lo largo de la línea pueden ser utilizados para obtener los valores de intersección y de pendiente de la regresión lineal para cada segmento. Para aumentar la precisión y exactitud del análisis, los datos numéricos pueden ser promediados a través de múltiples lecturas colocando la línea repetidamente sobre la pared del mismo folículo. Es importante señalar que se debe tener mucho cuidado al colocar la línea en una región de la imagen libre de artefactos (por ejemplo, sombras, ecos especulares, refracción, y artefactos de haz ancho; ^{30,47}).

Análisis de región

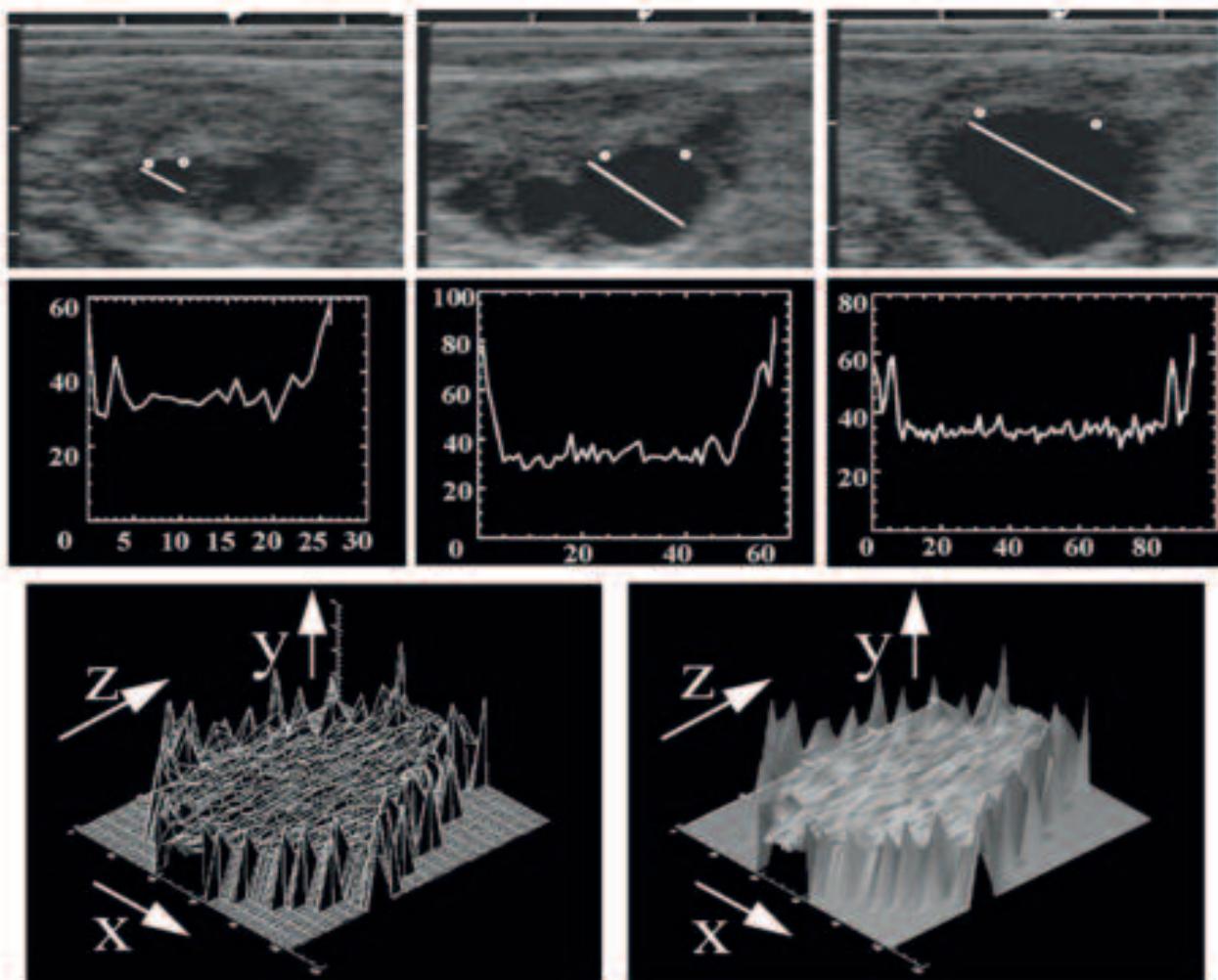
El análisis de región de un folículo consiste en la superposición de una "malla", pixel por pixel, en un área seleccionada para registrar los valores de píxeles en los puntos de intersección y generar un marco de tres dimensiones o modelo de "malla de alambre". La "piel" generada por la computadora puede ser colocada sobre el marco de la malla para producir la superficie topográfica. Pueden emplearse algoritmos de sombras para aumentar la percepción visual de las características de la superficie (sombras de superficie, por ej. escalas de grises o asignación de colores basados en el contorno o dirección) o intensidad del eco (altura de la sombra, es decir escala de grises o asignación de colores basado en la "altura" o brillo de los píxeles) de áreas particulares. La aplicación de color a las superficies hace que las diferencias sutiles en los contornos de las superficies sea más fácil de apreciar. En este tipo de pantalla, las coordenadas X e Y representan la distancia en 2 dimensiones (ej. largo y ancho) y el eje Z representa valores de píxel. Este recurso puede convertirse en una herramienta de diagnóstico útil en la clínica al permitir la medición visual instantánea de atributos ultrasonográficos asociados con la salud del folículo (viabilidad o atresia).



Análisis regional de folículo preovulatorio humano único. (A) Imagen de la pared del folículo identificada (línea de color negro). (B) Modelo de malla de alambre creada a partir de la imagen del folículo. (C) "Piel" generada por la computadora extendida sobre el modelo de alambre. (D) Algoritmo de color con sombra añadido a la imagen para mejorar la apreciación visual y permitir la comparación de diferentes zonas con imágenes de diferentes folículos o imágenes del mismo folículo en días diferentes.

Análisis de series de tiempo

Para obtener información de los cambios de imagen en el tiempo, se traza una línea a través de la imagen del folículo, como fue explicado en la técnica de análisis de línea, para generar un gráfico en 2 dimensiones (distancia y valor de pixel) para el mismo folículos cada día y se procede así durante las fases de crecimiento o regresión. Los gráficos diarios se concatenan o superponen para obtener una imagen compuesta en tres dimensiones (ej. tiempo). Este tipo de análisis ha sido ilustrado como gráfico tridimensional con el diámetro del folículo en el eje de las X, el valor de pixel a lo largo del eje de las Y y el tiempo en el eje de las Z⁽⁷⁴⁾. Se pueden aplicar algoritmos de sombra para aumentar los contornos, como fue descrito en el análisis de región. Este tipo de análisis permite la medición de ecotexturas de la pared folicular y del antro a medida que progresan a través de etapas fisiológicamente importantes (ej. día de la selección del folículo dominante, pérdida de dominancia, atresia o día previo a la ovulación).



Análisis de serie de un folículo dominante anovulatorio. Los folículos individuales son identificados (tres paneles) en forma diaria y se traza una línea que representa los valores numéricos creados (segunda de tres paneles). Los valores numéricos se concatenan y se crea un marco de malla de alambre (panel inferior izquierdo). La dimensión X representa el diámetro del folículo, incluyendo la pared del folículo; la dimensión Y representa el valor numérico de píxeles; y la dimensión Z representa los días del ciclo en la que el folículo se identifica de forma única. Una representación de la superficie (piel) se coloca sobre el marco para producir una conceptualización de la condición fisiológica del folículo (panel inferior derecho) desde el momento en que el folículo se identificó, completó su fase de crecimiento, ingresó y pasó por su fase estática, y regresó hasta no poder ser identificado. La adición de algoritmos de sombreado de color mejora en gran medida la percepción visual.

Correlatos fisiológicos de atributos de imagen

En un estudio inicial de caracterización, las imágenes ultrasonográficas de folículos bovinos fueron obtenidas de ovarios extraídos en estadios específicos de desarrollo folicular (i.e., fases de crecimiento, estática temprana, estática tardía y de regresión;⁷³).

El objetivo fue determinar si los cambios cuantitativos en la ecotextura del folículo dominante y de los folículos subordinados en las distintas etapas de desarrollo son reflejo de las características funcionales. Las imágenes de los folículos fueron obtenidas bajo condiciones ideales, colocando los ovarios en una bañera con agua desgasificada a una profundidad estandarizada y sin interferencias de los tejidos intermedios (es decir, pared rectal y tejido adiposo). Además, se obtuvo líquido folicular después de realizar las imágenes para realizar una correlación directa. Las concentraciones de estradiol en el líquido folicular disminuyeron desde la fase de crecimiento hasta la fase estática tardía, mientras que el contenido de P4 no aumentó hasta que los folículos llegaron a la fase final de regresión. Los valores de píxeles y la heterogeneidad del antro y pared fueron bajas en las fases de crecimiento, estática temprana y preovulatoria del folículo dominante. Contrariamente, la heterogeneidad de píxeles fue característicamente elevada en las fases estática tardía y de regresión. La pendiente de la línea de valores de píxeles que abar-

ca la pared del folículo aumentó progresivamente desde la fase de crecimiento hasta la de regresión (adelgazamiento progresivo de la pared del folículo); el folículo dominante preovulatorio tuvo la pared más gruesa y la menor pendiente. La heterogeneidad de píxeles del antro y pared, y la pendiente de la línea de regresión de la pared del folículo estuvieron negativamente correlacionadas ($p < 0,001$) con el estradiol y con la relación estradiol/progesterona en el líquido folicular. Se concluye que los cambios cuantitativos en la ecotextura de las imágenes ultrasonográficas son concurrentes con cambios en las características funcionales y endócrinas de los folículos bovinos.

Con la premisa que los cambios en los atributos de la imagen son reflejo directo de cambios en la estructura del folículo^(73, 77, 78, 81), se realizó un estudio histomorfométrico de los folículos bovinos de estadios de desarrollo conocidos⁽⁷¹⁾.

El espesor de la pared del folículo y la capa de las células granulosas, y la vascularización de la teca interna del folículo dominante y de los folículos subordinados de la primera onda disminuyó progresivamente desde las fases de crecimiento y estática temprana hacia la fase de regresión. En general, las células glandulares, como las células de la granulosa, teca y células luteales, parecen ser menos ecogénicas que el tejido conectivo del estroma ovárico. Por ejemplo, la imagen ultrasonográfica del CL en la mitad del ciclo (volumen de células luteales máximo al 56%) fue más oscura que en el inicio (angiogénica) o durante la regresión luteal (volumen de células luteales $\leq 41\%$; ⁷²). Por lo tanto, el adelgazamiento de la pared del folículo durante la regresión⁽⁷¹⁾ resultó en una transición más rápida desde el antro (valor de píxeles bajo) al tejido conectivo del estroma (valor de píxeles alto) que lleva a valores de pendiente más pronunciada para la pared del folículo. El folículo preovulatorio tiene una pared más gruesa, densidad celular menor en las capas granulosa y teca interna, y mayor vascularización y edema en la teca interna⁽⁷¹⁾, lo que está asociado con menor valor de heterogeneidad de los píxeles y menores valores de pendiente de la línea de regresión^(73, 78). El folículo en regresión se caracterizó por el desprendimiento y liberación de células de la granulosa de la pared del folículo al antro⁽⁷¹⁾. El antro de folículos bovinos saludables tuvo los menores valores de píxeles promedio, mientras que la heterogeneidad fue alta en folículos dominantes condenados a la atresia^(73, 77, 78, 80, 81) y en los folículos que fallaron en ovular en respuesta a la GnRH⁽⁴⁹⁾. Los folículos subordinados tienen un antro más brillante con mayor heterogeneidad que los dominantes^(73, 81).

Características de la imagen y competencia del ovocito

Una relación entre los atributos de la imagen y la función folicular, y entre el estatus folicular y la competencia del ovocito fue documentada^(68, 80, 81). Por lo tanto, la investigación de la relación entre los atributos de la imagen de folículos ováricos y la competencia de los ovocitos contenidos en ellos parece lógica. Los folículos antrales pequeños y medianos obtenidos de frígido han sido la fuente primaria de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones. Sin embargo, estos folículos están en diferentes fases fisiológicas (ej. crecimiento, estática o regresión) y presumiblemente contienen ovocitos con diferente potencial de desarrollo. En un estudio reciente⁽⁸¹⁾, los folículos subordinados cuyos ovocitos produjeron embriones de 8 a 16 células tuvieron características de ecotextura diferente de aquellos folículos cuyos ovocitos no produjeron embriones. Se encontró una estrecha relación entre el estadio de desarrollo de los folículos subordinados y la ecotextura ultrasonográfica. Junto con la observación que la competencia del ovocito está asociada al estatus folicular, estos resultados brindan fundamento para el uso del análisis de las imágenes ultrasonográficas para identificar folículos que producirán ovocitos competentes. Aunque la sensibilidad de esta técnica no es aún suficiente para usarla en el diagnóstico, la identificación de puntos de corte estadísticamente significativos constituyó la base para mejorar la técnica de imágenes.

Clasificación de la fase del ciclo estral según las características ultrasonográficas

Para desarrollar un sistema de clasificación basado en la imagen que permitiera identificar automáticamente el estadio del ciclo estral basado en una única evaluación ultrasonográfica de los ovarios, se evaluaron algoritmos informáticos en base a las imágenes de ovarios bovinos que estaban en una fase inicial (metaestro), media (diestro) o final (proestro) del ciclo estral⁽⁴⁸⁾. Los clasificadores de árbol de decisión y Naïve Bayes fueron "ajustados" utilizando una parte de los datos, y se aplicaron al resto de los datos obtenidos a partir de vacas con patrones de 2 y 3 ondas por ciclo. El clasificador *árbol de decisión* funcionó perfectamente, clasificando todas las instancias correctamente utilizando únicamente las características del CL y del folículo dominante para la clasificación. El clasificador de Naïve Bayes clasificó el 86% de las instancias correctamente ($n = 19$). Aunque los datos fueron tomados sólo en 3 periodos específicos del ciclo estral, los resultados apoyan la hipótesis de que la fase del ciclo estral puede ser determinada precisa y automáticamente según las características ultrasonográficas a partir de un examen en un único día. Se requiere probar estos clasificadores con mayores datos para demostrar completamente la insensibilidad en los patrones de crecimiento folicular de 2 y 3 ondas foliculares por ciclo. Este trabajo constituye la tercera etapa de lo que podría llamarse sistema completamente automatizado para determinar la fase reproductiva en base a un único examen ultrasonográfico. La primera etapa de este sistema sería la segmentación de las estructuras ováricas relevantes. Si el tamaño del folículo dominante y el tamaño del CL son características suficientemente válidas, el problema de la segmentación del folículo podría resolverse con bastante facilidad. Potocnik señaló que su algoritmo segmenta correctamente casi el 100% de los folículos ≥ 10 mm⁽⁴⁸⁾. La segmentación del CL es objeto de la investigación actual. Para la segunda etapa, es necesario sólo reconocer el folículo más grande, y medir su diámetro. Por lo tanto, si el trabajo futuro puede lograr un algoritmo de segmentación consistente para el CL, todo el proceso podría ser totalmente automatizado.

Histología virtual

La hipótesis que la "tinción" de algoritmos informáticos podría generar imágenes que parecen histología virtual fue evaluada en un estudio reciente⁽²³⁾. Se evaluaron seis métodos para producir "histología virtual" de los ovarios bovinos. El método de filtrado de sticks produjo límites más definidos en los folículos y la textura del CL producida por algoritmos brindó características histológicas. El método de la "diferencia uniforme" produjo la mejor delineación y aislamiento de la interfaz folículo-fluido. Los algoritmos 3 y 4 brindaron la mayor distinción cuantitativa entre el estroma y el CL. Este trabajo representa el primer paso natural para desarrollar un método no invasivo, de histología *in vivo*. Una mayor comprensión de la variación de las propiedades de la ecotextura durante el ciclo estral facilitará la definición de características discriminadoras para una clasificación automática de la imagen.

Ultrasonografía tridimensional

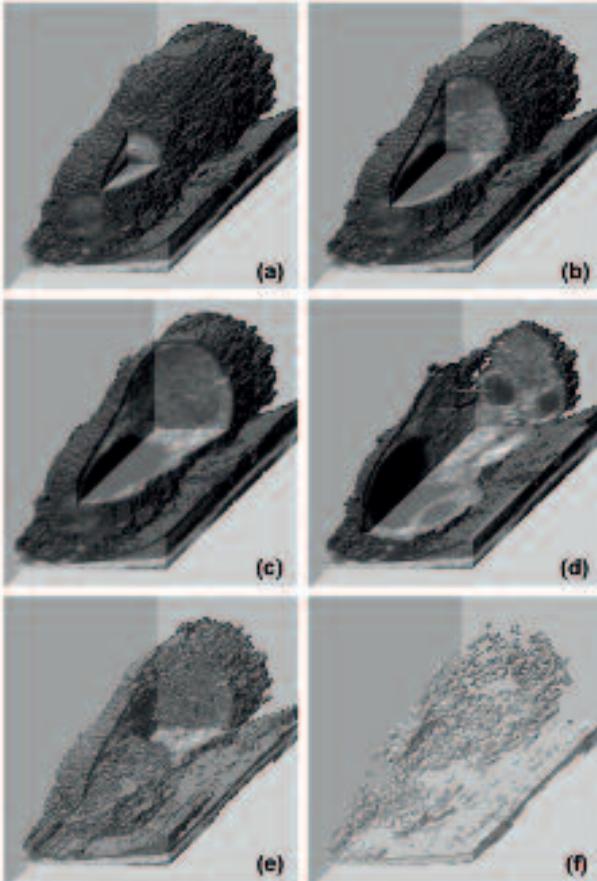


Imagen ecográfica en reconstruida en 3D de un ovario bovino con recortes (a-d) para exponer las posiciones topográficas de los folículos ováricos y cuerpo lúteo. Los diferentes niveles de transparencia (d-f) permiten la 'disolución' de varias estructuras.

La ultrasonografía en modo-B convencional implica la visualización continua de "rebanadas" de tejido en dos dimensiones (ej. ovario, útero, feto) y la reconstrucción mental de esas estructuras en tercera dimensión. Es un procedimiento técnicamente exigente que ha impedido el aprovechamiento de todo el potencial de este tipo de imágenes médicas. Los avances en informática y en el diseño de los transductores han hecho posible las imágenes tridimensionales (3D).

En su forma más simple, un cabezal con transductor lineal o convexo estándar es movido mecánicamente sobre el tejido de interés y captura imágenes secuenciales (ej. 30 cuadros por segundo) que son digitalizadas por la computadora. El transductor puede ser movido por 1) rotación manual o mecánicamente por 2) un motor paso a paso externo o por 3) motor paso a paso dentro del transductor. Las imágenes 2D se superponen para reconstruir el volumen del tejido. Pueden aplicarse algoritmos específicos para aumentar la detección de los bordes o aislar rasgos específicos de la imagen (ej. hacer transparente al líquido alrededor del feto para que sea más visible el contorno) casi en tiempo real (ej. segundos después de tomar la imagen).

La gran ventaja de las imágenes 3D es que una vez que la imagen es tomada y reconstruida, puede ser rotada en diferentes planos y evaluada sin una exploración continua. Además, el conjunto de datos 3D puede ser usado para mediciones volumétricas y secciones acústicas o separación de capas de la imagen, revelando rasgos internos y externos. Además de características vinculadas con la computación, deben resolverse desafíos relacionados con la anatomía (ej. tamaño de los transductores y configuración para uso transrectal o transvaginal) y con el animal (ej. movimiento durante la toma de las imágenes) antes de que la ultrasonografía 3D se use rutinariamente.

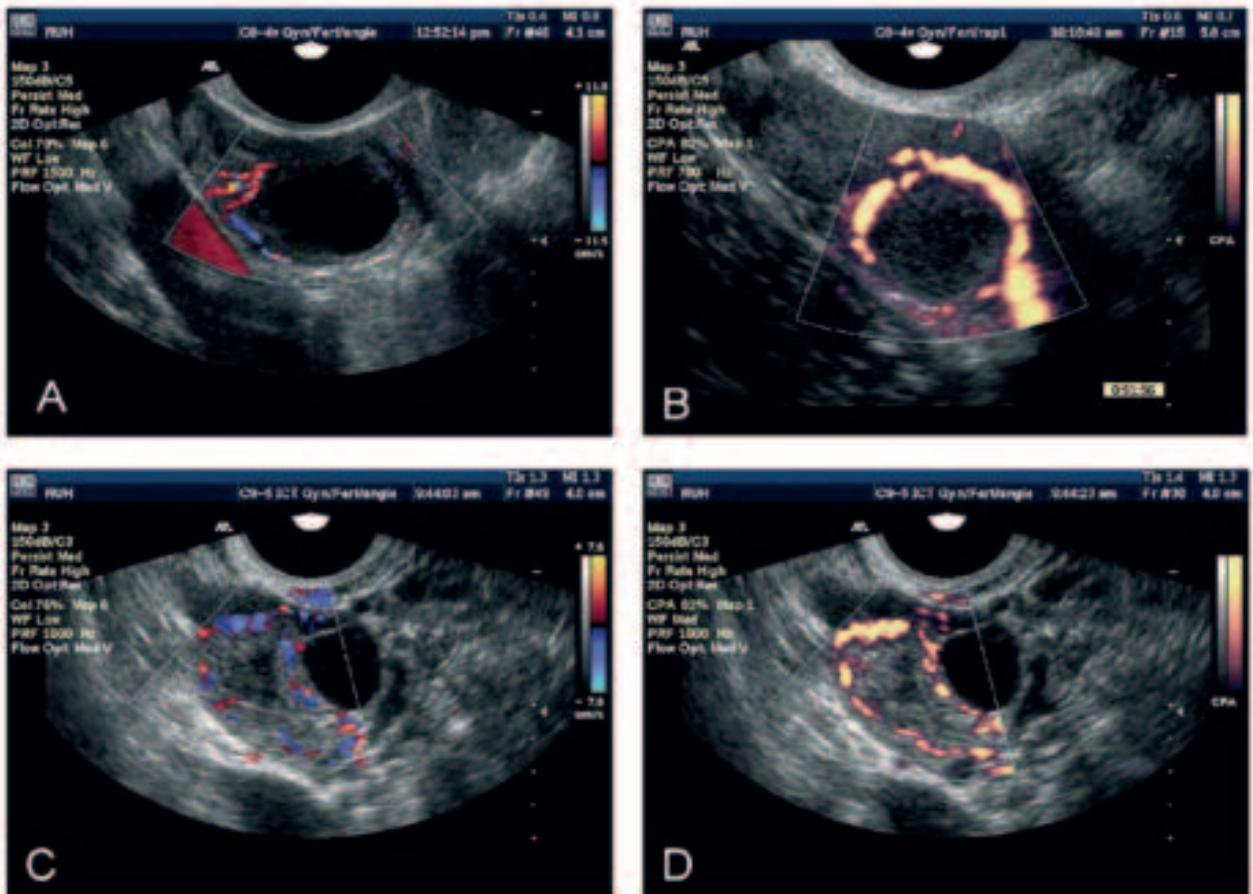
Imagen vascular

El efecto Doppler es el resultado de la compresión relativa o rarefacción de ondas de sonido generadas por el acercamiento o alejamiento de una fuente, respectivamente, que genera un cambio en el tono acústico (frecuencia) de una fuente de sonido en movimiento. El mismo principio se emplea en un escáner de ultrasonido para detectar cambios en la frecuencia de las ondas de ultrasonido reflejadas a partir de grupos de células de la sangre que se acercan o alejan del transductor. Ocurren cambios importantes en la microvasculatura del ovario durante el crecimiento y regresión de folículos grandes y del CL^(1, 71, 72). Por lo tanto, además de estudiar la anatomía vascular de los folículos ováricos y del CL por imágenes Doppler color, pueden también estudiarse importantes procesos fisiológicos mediante la caracterización de los cambios en la dinámica vascular a través del tiempo (por ejemplo, velocidad, resistencia, volumen). Tres variaciones de la técnica de Doppler se han utilizado para estudiar el flujo vascular: 1) el Doppler espectral se utiliza para mostrar el flujo vascular a través del tiempo en forma de onda, 2) el Doppler color permite superponer la información sobre el flujo vascular con la formación de imágenes en escala de grises en modo-B, y 3) el Doppler de flujo de potencia se utiliza para superponer información del flujo vascular de baja velocidad (sin información direccional) con la imagen en escala de grises en modo-B.

Mediante el uso del Doppler color se ha detectado un "anillo" pronunciado de vascularización alrededor de la pared del folículo preovulatorio en la yegua⁽²⁸⁾ y el desarrollo del CL en el humano⁽¹³⁾.

Los estudios Doppler han proporcionado evidencia visual de los cambios relacionados con el tiempo en el flujo sanguíneo dentro de la pared del folículo preovulatorio de las vacas⁽¹⁾. La imagen de los folículos preovulatorios reveló que el área y velocidad del flujo de la sangre (tiempo promedio-velocidad máxima; TAMXV) aumentó en asociación temporal con una elevación en la concentración plasmática de estradiol y con el pico de LH. Fueron informados distintos cambios en los patrones de flujo vascular durante la luteogénesis y luteólisis en bovinos, en relación con las concentraciones de P4 y la especulación preliminar sobre los efectos de PGF, PGE, PGI y NOS en la vascularización y función del CL^(1, 29).

La evaluación del flujo sanguíneo durante el tratamiento de estimulación folicular en mujeres^(17, 53, 54, 79) puede interpretarse en el sentido que el pico de velocidad e índices de resistividad disminuyen a medida que aumenta el diámetro de los folículos. Fue observada una fuerte correlación entre las tasas de recuperación de ovocitos y el nivel de vascularización folicular, y se ha propuesto que el flujo sanguíneo perifolicular puede usarse para elegir el momento óptimo para la administración de hCG (54). Uno de los problemas del Doppler color es que los artefactos resultantes de ruidos aleatorios durante la ecografía puede parecerse a un flujo aberrante en cualquier dirección, que oculta las características verdaderas del flujo.



Imágenes de ultrasonido Doppler-color (A, C) y del Doppler de potencia obtenidas de folículos preovulatorios inminentes (A, B) permiten demostrar el flujo peri-folicular direccional y sitios recientes de la ovulación (C, D) que demuestran los patrones vasculares alrededor de las paredes de un folículo recientemente colapsado/cuerpo lúteo en desarrollo. En las imágenes de flujo color, se muestra el flujo sanguíneo hacia el transductor en rojo, mientras que el flujo que se aleja del transductor se muestra en azul. En las imágenes del flujo de potencia, todo el flujo se muestra en una variante graduada de color amarillo a naranja.

Ultrasonografía biomicroscópica

La generación actual de ecógrafos comerciales está equipada con transductores de 3 a 10 MHz, que brindan una resolución lateral de hasta 0,7-1 mm. Este nivel de resolución es suficiente para muchos usos clínicos, pero el potencial completo del análisis de la imagen puede ser aprovechado con un instrumento que provea una resolución microscópica (ej. <0,2 mm).

Un "biomicroscopio de ultrasonidos" utiliza un cristal único para emitir una onda de sonido con una frecuencia de 25 a 70 MHz y produce una imagen con una resolución de 30-50 μm ⁽⁴²⁾. Además, el instrumento tiene la capacidad de un Doppler espectral para medir el flujo sanguíneo a través de vasos tan pequeños como de 50 μm de diámetro. Las principales limitaciones del biomicroscopio son la profundidad de penetración (aproximadamente 10 mm a 30 MHz, 5 mm a 50 MHz), el campo de visión (ancho de imagen, 1 cm), y la tasa de imagen (≤ 8 fotogramas por segundo).



(A) Imagen de alta resolución de un folículo ovárico de un ratón anestesiado obtenido en escaneo transabdominal con el biomicroscopio de ultrasonidos. El complejo cúmulo-ovocito (punta de flecha) es visible en el centro del folículo. (B) Se realizó un análisis de región de la imagen ecográfica en A y nunca antes se evidenció tan claramente detalles de la pared del folículo (flechas) y del complejo cúmulo-ovocito (punta de flecha).

Una mayor proximidad de los ovarios hasta el recto y la vagina en grandes animales domésticos y en humanos permitirá la formación de imágenes con este instrumento siempre que el instrumento se utilice en conjunto con un equipo de ultrasonido convencional para la orientación de las estructuras de interés. En este sentido, los resultados de un estudio inicial en bovinos⁽⁵⁶⁾ indicaron la utilidad de la biomicroscopía ultrasonográfica *in vivo* utilizando la vía transvaginal.

La capa de la granulosa de folículos <1 mm de diámetro podría ser distinguida y el complejo cumulus-ovocito (COC) se representa claramente. El análisis de la ecotextura de las imágenes obtenidas con el biomicroscopio de ultrasonido ha brindado por primera vez imágenes dinámicas del ovario en resolución histológica. Las imágenes en serie de las estructuras microscópicas en el tiempo harán posible el estudio de los mecanismos que subyacen a los eventos biológicos, que no han podido ser explicados por biólogos de la reproducción desde el tiempo de De Graaf (por ejemplo, la competencia de los ovocitos, desarrollo embrionario temprano y la muerte, fijación del concepto en las trompas en los seres humanos, insuficiencia luteal temprana, defectos del endometrio).

Conclusión

Los avances en las tecnologías de imágenes en las últimas dos décadas dieron paso a una revolución silenciosa en los enfoques de investigación para el estudio de la estructura y la función reproductiva. El avance más significativo debido al uso de la ultrasonografía es nuestra comprensión del ovario; una comprensión que ahora abarca muchas especies, y todas ellas provenientes de los estudios originales en el bovino.

Los resultados de los estudios de imágenes tienen implicancias más allá de la esfera de la biología reproductiva. Hemos obtenido evidencias convincentes para apoyar la hipótesis de que las características de ecotextura de las imágenes del ovario reflejan el estado endocrino y fisiológico de los folículos, CL, y de los ovocitos.

Los datos colectados por las diversas modalidades permiten sostener que los folículos tienen características individuales. Es decir, las características estructurales y funcionales de un folículo individual en una fase determinada, pueden ser completamente diferentes a las de los demás folículos dentro de su cohorte. Además, los primeros resultados de los estudios diseñados para correlacionar el análisis de la ecotextura de la pared del folículo con el potencial de desarrollo de los ovocitos contenidos se han interpretado en el sentido de que tales diferencias pueden ser útiles para la evaluación o elección de los ovocitos en los procedimientos *in vitro*. El análisis de la ecotextura de las imágenes obtenidas por ultrasonografía biomicroscópica es la técnica emergente más prometedora para el examen *in vivo* de los folículos antrales tempranos y ovocitos, y tal vez, junto con las imágenes en 3-D, permitirá la diferenciación y clasificación, que un día será capaz de igualar al *Northern blot* o hibridación *in situ* de las células foliculares y gametas *in vivo*.

Bibliografía

1. Acosta T.J., Miyamoto A., 2004 Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 82–83 (2004) 127–140
2. Adams, G.P., 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implication for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 41, 25-30.
3. Adams, G.P., 1998. Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization & superstimulation. In: *Proceedings of the Twentieth Congress of the World Association for Buiatrics*, Sydney, Australia, vol. 2, pp. 595-605.
4. Adams, G.P., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, Reproduction in Domestic Ruminants IV, 17-32.
5. Adams, G.P., 2000. Developments in the use of ultrasonography in buiatrics. In: *Proceedings of the Congresso Nazionale della Società Italiana di Buiatria*, Stresa, Italy, 5-7 May, vol. XXXII, pp. 435-450.
6. Adams, G.P., Pierson, R.A., 1995. Bovine model for the study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 43, 113-121.
7. Adams, G.P., Evans, A.C.O., Rawlings, N.C., 1993. Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-month old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* 100, 27-33.
8. Adams, G.P., Matteri R.L., Ginther, O.J., 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 95, 627-640.
9. Adams, G.P., Sumar, J., Ginther, O.J., 1990. Effects of lactational status and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fertil.* 90, 535-545.
10. Adams, G.P., Sumar, J., Ginther O.J., 1991b. Hemorrhagic ovarian follicles in llamas. *Theriogenology* 35, 557-568.
11. Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72-80.
12. Atiomo, W.U., Pearson, S., Shaw, S., Prentice, A., Dubbins, P., 2000. Ultrasound criteria in the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Ultrasound Med Biol* 26, 977-80.
13. Bächström, T., Nakata, M., Pierson, R.A., 1994. Ultrasonography of normal and abnormal luteogenesis. In: Jaffe, R., Pierson, R.A., Abramowicz, J.S. (Eds.), *Imaging in Infertility and Reproductive Endocrinology*, Lippincott, Philadelphia, pp. 143-154.
14. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA (2003). A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 80: 116-122.
15. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA (2003) Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction* 69: 1035-1043.
16. Baerwald A, Adams GP, Pierson RA (2005) Form and function of the corpus luteum during the human menstrual cycle. *Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 25: 498-507.
17. Balakier, H., Stronell, R.D., 1994. Color Doppler assessment of folliculogenesis *in vitro* fertilization patients. *Fertil. Steril.* 62, 1211-1216.
18. Bartlewski, P.M., Beard A.P., Cook, S.J., Rawlings, N.C., 1998. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 113, 275-85.
19. Baxes, G.A., 1994. Fundamentals of digital image processing. In: *Digital Image Processing: Principles and Applications*. J. Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 13-36.
20. Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1993. Relationship between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 39, 781-796.
21. Dias, F.C., Costa, E., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., Kastelic, J., Dochi, O., Singh, J., 2013a. Effect of duration of the growing phase of ovulatory follicles on oocyte competence in superstimulated cattle. *Reproduction, fertility, and development* 25, 523-530.
22. Dias, F.C., Dadarwal, D., Adams, G.P., Mrigank, H., Mapletoft, R.J., Singh, J., 2013b. Length of the follicular growing phase and oocyte competence in beef heifers. *Theriogenology* 79, 1177-1183 e1171.
23. Eramian MG, Adams GP, Pierson RA (2007) Enhancing ultrasound texture differences for developing an *in vivo* "virtual histology" approach to bovine ovarian imaging. *Reproduction, Fertility and Development* 19:910-924.
24. Evans, A.C.O., Adams, G.P., Rawlings, N.C., 1994a. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* 102, 463-470.
25. Evans, A.C.O., Adams, G.P., Rawlings, N.C., 1994b. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* 100, 187-194.
26. Fortune, J.E., 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Anim. Reprod. Sci.* 33, 111-125.
27. Garcia Guerra, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J., Mapletoft, R.J., 2012. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* 78, 353-360.

28. Gastal E.L., Gastal M.O., Ginther O.J., 2006. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction* 131, 699-709.
29. Ginther O.J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology* 81 (2014) 112-125.
30. Ginther, O.J., 1995a. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals Book 1. Equiservices Publishing, Cross Plains, WI, pp. 7-82, 35-40, 147-155.
31. Ginther, O.J., Bergfelt, D.R. 1992. Ultrasonic characterization of follicular waves in mares without maintaining identity of individual follicles. *J Equine Vet Sci* 12:349-354.
32. Ginther, O.J., Kot, K., 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats *Theriogenology* 42, 987-1001.
33. Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Kot, K., 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65, 638-647.
34. Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 187-200.
35. Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P., 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with 2 and 3 follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87, 223-230.
36. Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P., 1989c. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41, 247-254.
37. Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J., Kot, K., 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194.
38. Griffin PG, Ginther OJ, 1992. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Sci.*, 70:953-972.
39. Hoare, E.K., Parker, S.E., Flood, P.F., Adams, G.P., 1997. Ultrasonic imaging of reproductive events in muskoxen. *Rangifer* 17, 119-123.
40. Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. 2004. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biology of Reproduction* 71:1244-51.
41. Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP, 2009. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 72, 81-90.
42. Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. 2009. High-resolution ultrasound biomicroscopy for monitoring ovarian structures in mice. *Reprod Biol Endocr*, 7:69 doi:10.1186/1477-7827-7-69.
43. Kastelic, J.P., Ginther, O.J., 1989. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 194, 922-928.
44. Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1990a. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33, 1269-1278.
45. Kastelic, J.P., Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1990b. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 34, 487-498.
46. Knopf, L., Kastelic, J.P., Schallenberger, E., Ginther, O.J., 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endocr.* 6, 111-119.
47. Kremkau, F.W., 1989. Diagnostic ultrasound: Principles, instruments, and exercises. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 1-50, 147-176, 219-231.
48. Maldonado-Castillo I, Eramian MG, Pierson RA, Singh J, Adams GP (2007) Classification of reproductive cycle phase using ultrasound-detected features. In Proceedings of the 4th Canadian Conference on Computer and Robot Vision, IEEE Computer Society, pp 258-265.
49. Martinuk, S.D., Chizen, D.R., Pierson, R.A., 1992. Ultrasonographic morphology of the human preovulatory follicle wall prior to ovulation. *Clin. Anat.* 5, 1-14.
50. McCorkell, R.B., MacDougall, L., Adams, G.P., 2001. Transrectal ultrasonography in female Wapiti (Cervus elaphus): A feasibility study. In: Renecker L.A., Renecker, T.A. (Eds). *Game Conservation and Sustainability: Biodiversity, Management, Ecotourism, Traditional Medicine & Health*. Stratford, ON, Canada, pp. 282-290.
51. McCorkell RB, Woodbury MR, Adams GP (2007) Ovarian follicular and luteal dynamics in wapiti during seasonal transitions. *Theriogenology* 67 1224-1232.
52. Mee JF, Ryan DP, Condon T, 1994. Ultrasound diagnosis of pregnancy in cattle. *Veterinary Record*, 134:532.
53. Nargund, G., Bourne, T., Doyle, P., Parsons, J., Cheng, W., Campbell, S., Collins, W., 1996. Associations between ultrasound indices of follicular blood flow, oocyte recovery and preimplantation embryo quality. *Hum. Reprod.* 11, 109-113.
54. Oyesanya, O.A., Parsons, J.H., Collins, W.P., Campbell, S., 1996. Prediction of oocyte recovery rate by transvaginal ultrasonography and color Doppler imaging before human chorionic gonadotropin administration in in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 65, 806-809.
55. Pfeifer, L.F., Mapletoft, R.J., Kastelic, J.P., Small, J.A., Adams, G.P., Dionello, N.J., Singh, J., 2009. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology* 72, 1237-1250.
56. Pfeifer, L.F.M., Adams, G.P., Pierson, R.A., Siqueira, L.G.B., Singh, J. 2010. Ultrasound biomicroscopy: A non-invasive approach for studying the development of small follicles in the bovine ovary. *Theriogenology* (abstr., in press).
57. Pierson, R.A., Chizen, D.R., 1994. Transvaginal ultrasonographic assessment of normal and aberrant ovulation. In: Jaffe, R., Pierson, R.A., Abramowicz, J.S., (Eds.) *Imaging in Infertility and Reproductive Endocrinology*. Lippincott, Philadelphia, pp. 129-142.
58. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21, 495-504.
59. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1986. Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 26, 649-659.
60. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190:995-1001.
61. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1987a. Follicular populations during the estrous cycle in heifers: I. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 165-176.
62. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1987b. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 14, 177-186.
63. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1988a. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. III. Time of selection of ovulatory follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 16, 81-95.
64. Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1988b. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29, 21-37.
65. Powis, R., Powis, W., 1984. A thinker's guide to ultrasonic imaging. Urban and Schwarzenberg, Inc., Baltimore, MD.
66. Rajamahendran, R., Taylor, C., 1990. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim. Reprod. Sci.* 22, 171-180.
67. Ravindra, J.P., Rawlings, N.C., Evans, A.C.O., Adams, G.P., 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 101, 501-509.
68. Salamone, D.F., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* 52, 549-561.
69. Savio, J.D., Boland, M.P., Hynes, N., Roche, J.F., 1990. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88, 569-579.
70. Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F., 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83, 663-671.
71. Singh, J., Adams, G.P., 2000. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *Anat. Rec.* 258, 58-70.
72. Singh, J., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1997. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J. Reprod. Fertil.* 109, 35-44.
73. Singh, J., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1998. Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles: endocrine and functional correlates. *J. Reprod. Fertil.* 112, 19-29.
74. Singh, J., Adams, G.P., Pierson, R.A., 2003. Promise of new technologies for visualizing ovarian structure and function in domestic animals. *Animal Reproduction Science* 78, 371-399.
75. Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308-317.
76. Stock, A.E., Fortune, J.E., 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132, 1108-1114.
77. Tom, J.W., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1998a. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology* 49, 1345-1352.
78. Tom, J.W., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1998b. Quantitative echotexture analysis of bovine ovarian follicles. *Theriogenology* 50, 339-346.
79. Van Blerkom, J., Antczak, M., Schrader, R., 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.* 12, 1047-55.
80. Vassena R, Adams GP, Mapletoft RJ, Pierson RA, Singh J. (2003) Ultrasound image characteristics of the ovarian follicle in relation to developmental competence of the oocyte in cattle. *Animal Reproduction Science* 76: 25-41.
81. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP (2003) Effect of follicular stage on the morphology and developmental competence of the cumulus-oocyte-complex in cattle. *Theriogenology* 60: 923-932.

Nuevas tecnologías de micromanipulación en especies domésticas

Salamone, D., Bevacqua, R., Gambini, A., Canel, N., Hiriart, M.I., Moro, L., Buemo, C. y Gibbons, A.

LabBA, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. E-mail: labba@agro.uba.ar

Introducción

El objetivo fundamental de este trabajo es presentar métodos prometedores recientemente desarrollados o evaluados en nuestro laboratorio.

Clonación por transferencia nuclear

La clonación de células somáticas por transferencia nuclear (TN) ha permitido la propagación de animales domésticos de alto valor genético y la generación de animales transgénicos para fines biomédicos y agrícolas. Brevemente, la TN implica la enucleación de un ovocito, seguido por la fusión o inyección con una célula que brindará la información genética del futuro animal. Para lograr esto, el desarrollo debe ser inducido artificialmente por la activación química o física. Hemos analizado varios factores que influyen en los resultados de la TN, incluyendo los métodos de enucleación⁽⁸⁾, la activación^(3, 18) y el tipo de célula donante⁽¹⁷⁾. El núcleo también puede ser inyectado⁽³⁾.

Cuando evaluamos la activación química, la combinación de Ionomicina con un compuesto aislado recientemente en la Argentina, la Dehidroleucodina (DhL), tanto en la ICSI como en la TN⁽¹⁸⁾, se obtuvieron resultados prometedores. En un trabajo realizado por Canel y col.⁽³⁾ demostramos que, al contrario del 6-dimethylaminopurine (DMAP), la Ionomicina-DhL en combinación con Citocalasina B induce un mayor desarrollo a blastocisto de los embriones de clonación. Además, todos los tratamientos con DhL produjeron menos embriones con blastómeras poliploides que los tratamientos con Ionomicina-DMAP, pero tasas similares de blastocistos⁽³⁾.

Para mejorar la eficiencia del procedimiento de clonación, evaluamos una nueva alternativa para producir clones equinos que fue anteriormente descrita para el bovino⁽¹⁹⁾. La misma consiste en la agregación de embriones libres de zona pelúcida originados por TN de células somáticas de un animal^(5, 6). Para esto se colocan tempranamente dos o tres embriones en estrecho contacto en un sistema de cultivo especial de micropozos, de modo tal que al momento de la compactación, los embriones se integran. La agregación del embrión mejoró el desarrollo *in vitro*, la calidad embrionaria, el porcentaje de preñez y los animales que nacieron derivaron de embriones agregados (5). Una de las ventajas en equinos, es que es una buena estrategia para mejorar las tasas de preñez sin la necesidad de transferir embriones adicionales, evitando producir mellizos, factor que no es deseado en esta especie. El primer potro clonado viable obtenido con este método nació el 4 de agosto de 2010⁽⁵⁾ y se ha logrado el nacimiento de otros tres animales tanto de caballos criollos, de salto y de polo. Recientemente determinamos que al incrementar por sobre 4 estructuras para la agregación no se observan mayores beneficios, incluso pudiendo ser perjudicial para el desarrollo.

Trabajando en conjunto con la empresa Biosidus en septiembre de 2002 produjimos una vaca capaz de expresar la hormona de crecimiento humana (hGH), que fue la primera producida en América del Sur. La producción de hGH humana en leche y el potencial de utilizar vacas transgénicas como biorreactores fueron analizados y publicados por Salamone y col.⁽¹⁷⁾. Se demostró que es posible producir en leche hGH humana y que las vacas transgénicas constituyen una forma eficiente de producir esta proteína. Estimamos que serían necesarios sólo unos 15 animales para cubrir las necesidades mundiales actuales de esta proteína⁽¹⁷⁾.

La re-clonación de la primera generación de terneros transgénicos ofrece la oportunidad de aumentar el número de animales que integra y expresa la construcción genética deseada en los animales transgénicos. Tres terneros de re-clonación se obtuvieron en un experimento. Un nacimiento fue obtenido de la re-clonación del cordón umbilical y dos terneros se generaron de la re-clonación a partir de los fibroblastos de oreja. Se observaron diferencias en las tasas de preñez entre blastocistos generados por las diferentes fuentes de células donantes siendo superior para las de cordón umbilical.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La ICSI ha sido utilizado en los seres humanos y ha superado en frecuencia a la fecundación *in vitro* (FIV) tradicional. Hemos determinado que para obtener tasas de desarrollo comparables a la FIV es preciso asistir a la ICSI con la activación artificial. Con frecuencia, los protocolos de activación química para ICSI utilizan Ionomicina, un ionóforo de calcio, seguido de 3 h después por la incubación adicional de otras 3 h en DMAP. Muchos grupos realizan ICSI con un dispositivo piezoeléctrico y obtienen aceptables porcentajes de blastocistos. Nosotros reemplazamos este costoso equipo utilizando protocolos de activación química y produjimos un cordero vivo⁽¹³⁾. En equinos esta técnica tiene un gran potencial, debido a que los ovocitos pueden ser colectados por aspiración transvaginal guiados por ecografía en animales vivos. Desgraciadamente hasta el día de hoy no se los puede fertilizar eficientemente con las técnicas regulares de FIV. La ICSI parece solucionar este problema y actualmente estamos generando buenos porcentajes de blastocistos en equinos. Recientemente, hemos explorado el uso de esta técnica en gatos con una alta tasa de blastocistos sin la necesidad de activación química, simplificando el procedimiento y permitiendo su aplicación en felinos en extinción⁽⁹⁾. Recientemente utilizamos la ICSI heteroespecífica con espermatozoides de chita o leopardo para fecundar ovocitos maduros de gato, lo que nos permitió evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides criopreservados en estas especies en peligro de extinción.

Por otro lado, la ICSI demostró ser una técnica eficaz para producir descendencia en ratones⁽¹⁴⁾. En un experimento, utilizamos "ICSI transgénica" (TG-ICSI) asistida por activación química. Demostramos en cinco especies incluyendo al ovino, porcino, felino, bovino y equino, que es posible obtener embriones que expresan la proteína verde fluorescente (EGFP) en todas estas especies. Los espermatozoides fueron co-incubados con el plásmido pCX-EGFP e inyectados en el ovocito MII. El Protocolo de

activación química fue Ionomicina seguido luego de 3 horas por el tratamiento con DMAP de 3 horas. Hemos detectado altas proporciones de los embriones EGFP fluorescentes en las cinco especies (23 a 60%) en el cuarto día y se produjeron blastocistos verdes en bovinos, ovinos y felinos ⁽¹²⁾.

En el ganado, la TG-ICSI no fue evaluada hasta nuestro reporte ⁽¹²⁾. La razón principal de la falta de intentos previos son los pobres resultados obtenidos después de la ICSI convencional en esta especie. En otro estudio determinamos las mejores condiciones para la TG-ICSI en bovinos. Se evaluaron los diversos aspectos de la fecundación y desarrollo embrionario tras cinco tratamientos de activación ⁽¹⁾. En otro trabajo evaluamos la inseminación laparoscópica, la FIV y la ICSI como métodos para producir embriones transgénicos ovinos utilizando el plásmido pCX-EGFP. En todos los tratamientos los espermatozoides habían sido expuestos al plásmido pCX-EGFP. Se obtuvieron altas tasas de mórulas/blastocistos, pero sólo en la ICSI se produjeron embriones transgénicos, representando el 91,6% de mórulas y blastocistos expresando EGFP cuando se usaba la TG-ICSI ⁽¹¹⁾.

Transferencia de genes por microinyección citoplasmática

Basado en nuestros resultados en ICSI, determinamos que no solamente el espermatozoide sino que también otras células e incluso fragmentos celulares podían transferir el ADN exógeno (ADNe) al embrión. Cuando inyectamos células del cúmulus, fragmentos celulares (los cuales llamamos vesículas ovoplásmicas u ovoplastos) incubados con el ADNe, o ADNe desnudo en el citoplasma de ovocitos en MII, observamos que cuando se inducía el desarrollo embrionario también había expresión de ADNe ^(2, 11). Nuestros estudios demuestran por primera vez que un corto período de co-incubación con el transgén de células somáticas utilizadas luego para TN en mamíferos se logra embriones que expresan el transgén. También se pueden obtener embriones que expresan ADNe por inyección de vesículas ovoplásmica o por la inyección del ADNe solo en cigotos producidos por FIV, lo que simplificaría enormemente las técnicas de transgénesis. En otros experimentos se estudiaron diferentes alternativas para mejorar la eficiencia de la transgénesis y evitar patrones de expresión mosaico del transgén ⁽²⁾. Intentamos obtener una mayor simplificación de la técnica utilizando ovocitos bovinos y cigotos, que fueron inyectados intracitoplasmáticamente con complejos formados por ADNe y liposomas ⁽²⁰⁾. El porcentaje de integración de todos estos métodos parece ser baja por lo que comenzamos a utilizar estos métodos para producir embriones marcados con GFP.

Diferentes enfoques para la multiplicación de embriones (clonación embrionaria)

Nuestro primer intento consistió en la producción de embriones transgénicos FIV por microinyección de vesícula para luego utilizar estas blastómeras transgénicas como células donantes para la clonación. Se produjo una alta eficiencia en la reversión de mosaicismos y multiplicación de embriones transgénicos ⁽²⁾.

Otra experiencia que realizamos satisfactoriamente consistió en la separación de blastómeras transgénicas verdes (expresando eGFP), seguido de la agregación de una blastómera transgénica con dos estructuras provenientes de la fusión de embriones en estadio de 2 células. A esto se lo acompañó o no de agregaciones asincrónicas (es decir, con embriones más jóvenes que la blastómera de interés). En este sistema de agregación, el resultado esperado fue que el blastómero verde originara el macizo celular interno; mientras que los embriones fusionados y más tempranos sean expulsados hacia el trofoblasto de la quimera. Teóricamente, con esta técnica podría reducirse la tasa de mosaicismos de la futura descendencia de embriones transgénicos como también se permitiría la multiplicación de estos embriones ⁽⁷⁾. Esta metodología también podría utilizarse para multiplicar los embriones de animales de alto valor genético, al permitir dividir los embriones tempranos de interés en sus blastómeros constitutivos, para posteriormente complementar cada uno de los blastómeros con futuras células trofoblásticas (embriones más jóvenes y fusionados) generadas de embriones de poco valor. Así, de un embrión originar varios.

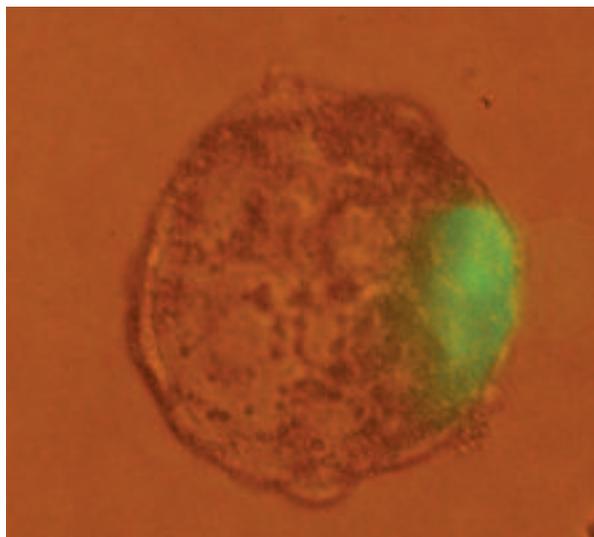


Figura 1. Blastocisto producido en el grupo 2ASF, con expresión de EGFP localizada. El mayor número de blastocistos expresando la proteína EGFP en el MCI (verde fluorescente) fue obtenido cuando 2 embriones fusionados y asincrónicos (2ASF) fueron agregados con la blastómera expresando EGFP. Los embriones fueron visualizados bajo luz azul, empleando un filtro de excitación a 488 nm y un filtro de emisión a 530 nm. (Hiriart y col., 2013).

Clonación de gametas

Otra opción que exploramos es la clonación de gametas. Hemos demostrado que los espermatozoides y los ovocitos pueden ser eficientemente clonados ^(19, 21, 22). Produjimos blastómeras verdes androgénicas haploides por la inyección de un solo espermatozoide por egfp TG-ICSI a ovocitos a los que se les retira el núcleo femenino. Luego utilizamos a las blastómeras androgénicas para fertilizar ovocitos, resultando en varios embriones que expresan homogéneamente el transgén. Este enfoque ofrece un enorme potencial, ya que permite determinar el sexo del núcleo del espermatozoide antes a la fertilización. También es posible clonar ovocitos a los que se les incorporó previamente ADNe ⁽²²⁾ seguido de la reconstrucción de embriones bovinos biparental para después de generar embriones que expresen en transgén en forma homogéneas. Esto abre la posibilidad de que el genoma de espermatozoides o de ovocitos puede ser clonado y multiplicado, y en un

futuro pueda lograrse la generación de líneas celulares haploides. Esto tendría el potencial para producir un número ilimitado de embriones biparentales combinando estas células haploides con hemicigotas haploides del sexo opuesto.

¿Es posible reproducir la mayor parte de la genética animal pero cambiándole el sexo?

Clonación de cromosomas

Una de las experiencias que estamos realizando intenta producir una cría con la misma información genética que un animal de interés en todos los cromosomas a excepción del correspondiente a uno de los cromosomas sexuales. Esto implica que se intentará cambiar el sexo de la cría por el opuesto al original. De manera tal que se obtenga con esta tecnología un bovino macho (XY) a partir de una hembra (XX) o viceversa. Para lograr este objetivo se tendrán que intercambiar cromosomas sexuales. Esto implica inducir la pérdida de un cromosoma específico (el X o Y) y la adición del opuesto. En este sentido hemos desarrollado una técnica que permite multiplicar un número reducido de cromosomas por trasplante de micronúcleos⁽⁴⁾. En un futuro se prevé aplicar esta tecnología a la producción animal.

Consideraciones finales

Las aplicaciones de estas tecnologías a la producción animal están sujetas a nuestra capacidad de imaginación e innovación. Las pruebas *in vitro* realizadas permiten imaginar que es posible producir crías con ellas (clonación de embriones, clonación de gametas). Por otro lado los animales que ya se han generado con algunos métodos (clonación, ICSI, FIV) son postales del futuro que demuestran su factibilidad comercial.

Bibliografía

1. Bevacqua R., Pereyra-Bonnet F., Fernandez-Martin F., Salamone D.F. 2010. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology* 74(6):922-31.
2. Bevacqua R. J., F. Pereyra-Bonnet, R. Olivera, M. I. Hiriart, R. Fernandez-Martin, D. F. Salamone. 2010b. New IVF transgenesis strategy in bovine using cell cycle inhibitors and mosaicism reversion by cloning. *Reproduction, Fertility and Development* 23:107 – 107.
3. Canel N, Bevacqua R, Fernández-Martín R, Salamone DF. 2010. Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cell Reprogram.* 12(4):491-9.
4. Canel N, Bevacqua R, Hiriart MI, Salamone D. Replication of somatic micronuclei in bovine enucleated oocytes. *Cell Div.* 2012; 7(1):23.
5. Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF. 2012. Equine cloning: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. *Biol Reprod.* 87(1):15, 1-9.
6. Gambini A, Jarazo J, Karlanian F, De Stéfano A, Salamone DF. Effect of collection-maturation interval time and pregnancy status of donor mares on oocyte developmental competence in horse cloning. *J Anim Sci.* 2014 Feb;92(2):561-7. Epub 2014 Jan 14. *J Anim Sci* 92(4):1808.
7. Hiriart MI, Bevacqua RJ, Canel NG, Fernández-Martín R, Salamone DF (2013). Production of chimeric embryos by aggregation of bovine egfp eight-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronic embryos. *Theriogenology*;80(4):357-364.
8. Moro, L.N.1; Vichera, G.1; Olivera, R.1; Salamone, D. 2011. Evaluación de la enucleación asistida por demecolcina como método para evitar la exposición a luz UV en la producción de embriones bovinos por técnica de clonación. *In vet* 12(2): 195-204.
9. Moro L. N., D. F. Salamone. 2010. Development of domestic cat embryos generated by intracytoplasmic sperm injection exposed to ionomycin activation and different culture conditions. *Reprod Fert and Develop* 23: 241–242.
10. Moro L.N. Sestelo A.J and Salamone D.F. Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific icsi with domestic cat oocytes. *J Reprod Domest Anim* (aceptado)
11. Pereyra-Bonnet F, R Bevacqua, I La Rosa, P Sipowicz, M Radrizzani., R Fernandez-Martin, D Salamone, 2011. Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, parthenogenic and IVF bovine embryos *Trangenic Reseach* 20(6):1389.
12. Pereyra-Bonnet F, R. Fernández-Martín, R. Olivera, J. Jarazo, G. Vichera, A. Gibbons, D. Salamone. 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, Fertility and Development* 20(7): 741–749.
13. Pereyra-Bonnet F, A Gibbons, M Cueto, P Sipowicz, R Fernández-Martina, D Salamone.2010. Efficiency of sperm mediated gene transfer in ovine by Laparoscopic Insemination, In Vitro Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection with Different sperm/DNA incubation treatments. *J Reprod and Develop* 20(7):741-749.
14. Perry, A. C.,Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda,Y., and Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284: 1180–1183.
15. Ribeiro Ede S, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari I Jr, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrósio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M. 2009. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning Stem Cells.* 11(3):377-86.
16. Salamone D. F., P. Damiani, R. A. Fissore, J. M. Robl and R. T. Duby. 2001. Ooplasmic and Nuclear Maturation of Calf Oocytes: Assessment By Biochemical And Nuclear Transfer Approach. *Biology of Reproduction*, Junio, 64:1761-1768
17. Salamone Daniel et al. 2006. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol.* 2006 Jul 13;124(2):469-72.
18. Vichera G, Alfonso J, Duque C, Silvestre M, Pereyra-Bonnet F, Fernández-Martín R, Salamone D. 2009. Chemical Activation with a Combination of Ionomycin and Dehydroleucodine for Production of Parthenogenetic, ICSI and Cloned Bovine Embryos. *Reprod Domest Anim.* 45(6):e306-12.
19. Vichera Gabriel, Daniel Salamone. 2007. Clonación de ovocitos y producción de hemiclones bovinos. *Revista Reproducción:* 22(3): 1008-117.
20. Vichera G, Moro L, Salamone D. 2010. Efficient method to produce IVF and parthenogenetic transgenic bovine embryos by intracytoplasmic injection of DNA-liposome complexes. *J Reprod Domest Anim* 46(2):214-20.
21. Vichera, F. R. Olivera, P. Sipowicz, M. Radrizzani, and D. Salamone. 2011a. Sperm Genome Cloning Used in Biparental Bovine Embryo Reconstruction. *Reprod Fertil Dev* 23(6):769-79.
22. Vichera G, R Olivera, D Salamone. Zygote. 2011b. Oocyte genome cloning used in biparental bovine embryo reconstruction 21(1):21-9.