

L'HORMONA ANTIMÜLLERIANA (AMH): UNA MESURA DEL POTENCIAL REPRODUCTIU EN ESPÈCIES DOMÈSTIQUES

TREBALL FINAL DE GRAU DE VETERINÀRIA

Juliol 2019

Autora: Maria Magdalena Cabrer Adrover

Tutora: Sylvia Bedford Gaus

Cotutora: Irene López Helguera

Doble grau en Veterinària i Ciència i Producció Animal

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària (ETSEA)

Universitat de Lleida

Índex

1. Resum.....	1
2. Resumen.....	2
3. Abstract.....	3
4. Glossari.....	4
5. Introducció	5
6. Objectiu.....	7
7. Metodologia	7
8. Revisió bibliogràfica.....	9
8.1. Què és l'hormona antimülleriana?.....	9
8.2. On es produeix l'AMH?	10
8.3. Funcions de l'AMH específiques a l'ovari.....	14
8.4. Concentracions sèriques d'AMH	21
8.5. Regulació de l'expressió de l'AMH segons les hormones i els factors de creixement a les cèl·lules de la granulosa	23
8.6. L'AMH i la reserva ovàrica	26
8.7. L'AMH en els animals de producció	29
8.8. Aplicacions clíniques de l'AMH en èquids.....	33
8.9. Aplicacions clíniques de l'AMH en petits animals.....	34
9. Conclusions.....	39
10. Bibliografia	41

Índex de figures

Figura 1. Número de publicacions relatives a l'hormona antimülleriana (AMH) de l'any 2000 al 2018 segons les diferents espècies.	8
Figura 2. Concentracions d'hormona antimülleriana (AMH) intrafol·liculars, determinades per ELISA, als fol·licles antrals de diferents mides en cabres, vaques, ovelles i porcs (Monniaux et al. 2013).	13
Figura 3. Efectes del creixement fol·licular i atrèsia en l'expressió de l'ARN missatger de l'hormona antimülleriana (ARNm d'AMH) a les cèl·lules de la granulosa i concentracions d'AMH al líquid fol·licular en fol·licles bovins (Monniaux et al. 2013).	13
Figura 4. Fol·liculogènesis. Diferents fases de desenvolupament dels fol·licles des d'un fol·licle primordial fins a la fase pre-ovulatòria. La transició d'un fol·licle primordial fins al període antral depèn de factors locals. A partir de la fase pre-antral el creixement depèn de concentracions adequades de gonadotropines (Basada en Zylbersztein, 2008).	15
Figura 5. Representació esquemàtica de la dinàmica fol·licular en bovins (Espinoza et al. 2007).	16
Figura 6. Accions de l'hormona antimülleriana (AMH) a l'ovari. L'AMH es produeix als fol·licles pre-antrals i antrals petits a l'ovari. La inhibició del reclutament inicial (1) i la inhibició de l'efecte estimulador de l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) en els fol·licles preantrals grans i antrals petits (2) (Durlinger et al. 2002).	20
Figura 7. Canvis en la concentració d'hormona antimülleriana (AMH) en plasma durant els primers 20 dies de l'estre natural en boví (Monniaux et al. 2013 adaptat de Rico et al. 2011).	22
Figura 8. Concentracions plasmàtiques d'hormona antimülleriana (AMH) durant els períodes de gestació i post-part en vaques (Monniaux et al. 2013).	23
Figura 9. Efectes de l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) i les proteïnes morfogèniques de l'os (BMP) a l'expressió de l'ARN missatger de l'hormona antimülleriana (AMH) en cèl·lules de la granulosa de bovins (a) i ovins (b). (a) Les cèl·lules de la granulosa es van estimular amb tractaments de FSH, BMP4, BMP6, FSH+BMP juntament. (b) Les cèl·lules de la granulosa es van estimular amb tractaments de FSH, BMP4, activina A i el factor de creixement transformant- β 1 (TFG- β 1) (Monniaux et al. 2013).	24
Figura 10. Regulació paracrina i endocrina de la producció de l'hormona antimülleriana (AMH) durant el desenvolupament fol·licular en mamífers. El color blau intens representa concentracions d'AMH a les cèl·lules de la granulosa. L'expressió de l'AMH és major a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles antrals petits. Les proteïnes morfogèniques de l'os (BMPs) indueixen la síntesis d'AMH a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles pre-antrals i antrals petits.	

Durant el desenvolupament del fol·licle, l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) inhibeix l'expressió d'AMH i té un efecte antagonista sobre les accions estimulants de les BMPs a l'AMH. Es suggereix que aquests efectes inhibitoris de la FSH a l'expressió d'AMH poden estar mediat per altes concentracions intrafol·liculars d'estradiol (E2) que resulten d'un increment en l'expressió del gen citocrom P450 de l'aromatasa (CYP19A1) a les cèl·lules de la granulosa de fol·licles antrals grans (Monniaux et al. 2013).

Figura 11. Comparació del nombre de fol·licles ≥ 3 mm, àrea ovàrica total i concentració d'hormona antimülleriana (AMH) entre vaques de carn i vaques de llet (Mossa et al. 2017)... 32

Figura 12. Concentracions d'hormona antimülleriana (AMH) sèriques en gosses prepuberals (PP), no esterilitzades (OVH-), esterilitzades (OVH+) i amb síndrome d'ovari romanent (ORS) (Turna Yilmaz et al. 2015)..... 35

Índex de taules

Taula 1. Anàlisi comparatiu de la presència d'hormona antimülleriana (AMH) en els diferents tipus de fol·licles i cos luti a l'ovari (Almeida et al. 2018).

Taula 2. Efectes inhibitoris de l'hormona anti-mülleriana (AMH) en el nombre de fol·licles en creixement d'ovaris de ratolins de 2 dies d'edat en cultiu in vitro (Durlinger et al. 2002).

Taula 3. Valors de l'hormona antimülleriana (AMH) en humans en funció de l'edat (Rey et al. 2013).

Taula 4. Classificació del nombre de fol·licles antrals (AFC) segons el nombre de fol·licles > 3 mm a l'ovari per ona fol·licular.....

Taula 5. Valors de paràmetres reproductius segons el nombre de fol·licles antrals (AFC).

Taula 6. Diferents valors de les concentracions d'hormona antimülleriana (AMH) sèriques publicades per diferents autors en gosses i gates.

Taula 7. Interval de referència de l'hormona antimülleriana (AMH) (ng/mL) segons la mida de les gosses.....

1. Resum

L'hormona antimülleriana (AMH) és una glicoproteïna dimèrica membre del factor de creixement transformant β (TFG- β) produïda per les cèl·lules de Sertoli en mascles durant el període fetal, i per les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles pre-antrals i antrals en femelles en edat reproductiva. Aquesta revisió es centra en les funcions de l'AMH en la femella, on participa en la fol·liculogènesis mitjançant: 1) la inhibició del reclutament de fol·licles primordials; i, 2) la inhibició de l'estimulació de l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) als fol·licles en creixement. Aquestes funcions regulen el nombre final de fol·licles, reduint així els fol·licles que arribaran a la fase pre-ovulatòria i assegurant la seva correcta selecció per l'ovulació. D'aquesta manera, l'AMH ajuda a obtenir un desenvolupament fol·licular òptim per evitar un esgotament prematur de la reserva fol·licular ovàrica. Per aquest motiu, els nivells circulants d'AMH juntament amb el comptatge de fol·licles antrals es consideren bons marcadors de la població de fol·licles sans a l'ovari. En els animals de producció, l'avaluació de les concentracions sèriques d'AMH permet predir la reserva ovàrica per poder millorar l'eficiència reproductiva i, per tant, també la productiva. Altres aplicacions clíniques en rumugants inclouen la predicció de la resposta a tractaments de superovulació, i per tant la millora de l'eficiència dels programes de transferència d'embrions en ovulacions múltiples, així com a marcador endocrí per predir paràmetres reproductius com la longevitat productiva, taxes de gestació i l'eficiència de la inseminació artificial (IA). En èquids i animals de companyia, l'AMH és també de gran utilitat clínica. El mesurament de les concentracions sèriques d'AMH és un coadjuvant important en el diagnòstic del tumors de les cèl·lules de la granulosa (GCT). En gosses i gates, en permet diagnosticar si han estat prèviament esterilitzades en cas d'història desconeguda. En gosses, s'ha establert intervals dels nivells d'AMH (ng/mL), relacionats amb la mida de l'individu i amb el nombre potencial de cadells que poden produir per camada. Es necessita més recerca per poder aplicar a la pràctica el mesurament d'aquestes concentracions d'AMH en les diferents espècies. No obstant això, el fet de que l'AMH participi en el desenvolupament fol·licular crea un interès per, en un futur, utilitzar aquesta hormona com a paràmetre reproductiu i per millorar l'eficiència productiva de les espècies domèstiques.

2. Resumen

La hormona antimülleriana (AMH) es una glicoproteína dimérica miembro del factor de crecimiento transformante β (TFG- β) producida por las células de Sertoli en machos durante el periodo fetal, y por células de la granulosa de los folículos pre-antrales i antrales en hembras de edad reproductiva. Esta revisión se centra en las funciones de la AMH en la hembra, que participa en la foliculogenesis mediante: 1) la inhibición del reclutamiento de folículos primordiales; y, 2) la inhibición de la estimulación de la hormona foliculoestimulante (FSH) a los folículos en crecimiento. Estas funciones regulan el número final de folículos, reduciendo así los folículos que llegarán a la fase pre-ovulatoria y asegurando su correcta selección para la ovulación. De esta manera, la AMH ayuda a obtener un desarrollo folicular óptimo para evitar un agotamiento prematuro de la reserva folicular ovárica. Por este motivo, los niveles circulantes de AMH junto con el conteo de folículos antrales se consideran buenos marcadores de la población de folículos sanos en el ovario. En los animales de producción, la evaluación de las concentraciones séricas de AMH permiten predecir la reserva ovárica para poder mejorar la eficiencia reproductiva y, por lo tanto, también la productiva. Otras aplicaciones clínicas en rumiantes incluyen la predicción de la respuesta a tratamientos de superovulación, y por lo tanto la mejora de la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en ovulaciones múltiples, así como un marcador endocrino para predecir parámetros reproductivos como la longevidad productiva, tasa de gestación y la eficiencia de la inseminación artificial (IA). En equinos y animales de compañía, la AMH es también de gran utilidad clínica. Las mediciones de las concentraciones séricas de AMH son un coadyuvante importante en el diagnóstico del tumor de las células de la granulosa (GCT). En perras y gatas, nos permite diagnosticar si han estado previamente esterilizadas en caso de historia desconocida. En perras, se han establecido intervalos de los niveles de AMH (ng/mL), relacionados con el tamaño del individuo y con el número potencial de cachorros que pueden producir por camada. Se necesita más investigación para poder aplicar a la práctica las mediciones de estas concentraciones de AMH en las diferentes especies. No obstante, el hecho de que la AMH participe en el desarrollo folicular crea un interés para, en un futuro, utilizar esta hormona como parámetro reproductivo y para mejorar la eficiencia productiva de las especies domésticas.

3. Abstract

The anti-müllerian hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein that belongs to the transforming growth factor beta (TFG- β) family. The AMH is produced by Sertoli cells in the fetal male gonad, and by granulosa cells in pre-antral and antral ovarian follicles in reproductively mature females. This review covers the roles of AMH in the female where it mainly participates in the regulation of folliculogenesis by: 1) inhibiting the recruitment of primordial follicles; and, 2) counteracting the stimulatory action of follicle stimulating hormone (FSH) upon growing follicles. Ultimately, these actions regulate the number of follicles that will reach the dominant phase, thereby limiting the number of preovulatory follicles and ensuring their correct selection towards ovulation. Therefore, AMH is an important player in the prevention of premature ovarian failure that would result from premature ovarian reserve exhaustion. For this reason, the circulating levels of AMH together with the antral follicle count are considered excellent markers of the ovarian follicle population of a given female in a given moment in time. In production animal species, serum AMH levels are a good predictor of the ovarian reserve and may be used for improvement of reproductive parameters and production efficiency within a herd. Other clinical applications in ruminants include predicting the response to superovulation treatments. Therefore, AMH levels can be used towards the improvement of multiple ovulation embryo transfer programs, as well as an endocrine marker for production longevity, pregnancy rates and the efficiency of artificial insemination (AI) programs. AMH also offers important clinical applications in equids and small animals. For instance, in these species, the determination of serum AMH concentrations is a great adjuvant for the diagnosis of granulosa cell tumors (GCT). In bitches and queens, it can be also used for the diagnosis of spay status in animals of unknown history. In bitches, AMH reference levels have been established in relation to body size and expected litter size. More research is needed to routinely apply the measurement of serum AMH levels in the clinical and production settings. Nevertheless, the fact that AMH is a crucial player in follicular development, makes its determination an important parameter for the prediction of the reproductive potential of a given female and, therefore, to improve the production efficiency in livestock and domestic species of economic interest.

4. Glossari

- AMH** Hormona antimülleriana
- TGF- β** Factor de creixement transformant β
- FSH** Hormona fol·liculoestimulant
- AFC** Nombre de fol·licles antrals (*antral follicle count*)
- GCT** Tumor de les cèl·lules de la granulosa
- ORS** Síndrome d'ovari romanent
- BMP** Proteïna morfogènica de l'os
- AMHRI** Receptor de l'AMH tipus I
- AMHRII** Receptor de l'AMH tipus II
- ARNm** ARN missatger
- PGC** Cèl·lules germinals primordials
- LH** Hormona luteïnitzant
- AMPc** Fosfat d'adenosina cíclic
- GnRH** Hormona alliberadora de gonadotropina
- bFGF** Factor fibroblasts bàsic
- KITL** Factor de creixement *kit lligand*
- KGF** Factor de creixement de queratinòcits
- LHCGR** Hormona luteïnitzant/receptor de coriogonadotropina
- CYP19A1** Gen citocrom P450 de l'aromatasa
- PKA** Proteïna kinasa A
- IA** Inseminació artificial
- PCOS** Síndrome d'ovari poliquístic
- FIV** Fertilització in vitro

5. Introducció

L'hormona antimülleriana (AMH) és una glicoproteïna dimèrica d'un pes molecular de 140 kDa i membre del factor de creixement transformant β (TFG β)¹. Es va identificar originalment com una hormona específica dels testicles². L'AMH és sintetitzada per les cèl·lules de Sertoli dels testicles fetals i durant la diferenciació sexual fetal masculina induïx la degeneració dels conductes paramesonèfrics o de Müller, els quals formen els oviductes, l'úter i el terç superior de la vagina en la femella³. Més endavant, es va demostrar que l'AMH té efectes funcionals als òrgans reproductius dels dos sexes⁴.

Durant el desenvolupament fetal femení no hi ha producció d'AMH³. L'expressió de l'hormona en femelles apareix per primer cop a les cèl·lules de la granulosa de l'ovari neonatal dels fol·licles primordials i es segueix expressant als fol·licles en creixement fins arribar a l'etapa del reclutament fol·licular¹. Estudis anteriors en rosegadors demostren que l'AMH no es comença a expressar fins dies després del naixement, en canvi, en humans aquesta hormona s'expressa a partir de la setmana 36 de gestació⁵. La màxima expressió de l'AMH es troba en els fol·licles pre-antrals grans i antrals petits, i va disminuint gradualment durant el desenvolupament fol·licular, sent absents en els fol·licles atrètics⁶. L'expressió de l'AMH s'ha investigat en un nombre considerat d'espècies, com rosegadors, remugants, èquids, animals de companyia, humans, i en totes elles l'AMH es produeix sols a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles pre-antrals grans i antrals petits⁵. Recentment, s'ha observat que l'espècie porcina és l'única en que l'AMH també s'expressa a les cèl·lules de la teca dels fol·licles pre-ovulatoris i al cos luti¹.

L'AMH té un paper important en la regulació del nombre de fol·licles en creixement i en la seva selecció per l'ovulació. Aquesta hormona actua en dos dels estadis de la fol·liculogènesis inhibint el reclutament dels fol·licles primordials en creixement⁷ i bloquejant l'efecte estimulador de l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) sobre el creixement dels fol·licles pre-antrals i antrals petits^{8,9}. Sense la presència d'AMH, una quantitat major de fol·licles primordials seran reclutats pel creixement fol·licular i s'obtindrà un nombre major de fol·licles pre-ovulatoris amb possible reducció prematura de la reserva ovàrica. D'aquesta manera, l'AMH inhibeix aquest reclutament inicial de fol·licles primordials a primaris creant una limitació en el nombre final de fol·licles antrals i evitant un esgotament prematur de la reserva fol·licular ovàrica. Per altra banda, l'AMH al modular la sensibilitat dels fol·licles a la FSH participa en el reclutament cíclic, en el qual els fol·licles en creixement són seleccionats per créixer fins la fase pre-ovulatòria. Així actua en aquest desenvolupament fol·licular inhibint l'estimulació de la FSH als

fol·licles pre-antrals grans i antrals petits ⁵, fet que provoca que els fol·licles siguin més sensibles a la FSH amb absència d'AMH. Tot això ens indica que l'AMH participa en el procés de selecció de fol·licles per l'ovulació, ja que cada fol·licle necessita una concentració de FSH determinada per continuar el seu creixement i per ser seleccionat a la fase pre-ovulatòria ¹⁰.

L'aplicació de mesurar la reserva ovàrica, definida com el nombre total de fol·licles sans a l'ovari ¹¹, és de gran importància per poder detectar la capacitat reproductiva en les diferents espècies animals. S'ha observat que l'AMH està correlacionada amb el nombre de fol·licles antrals (AFC = *antral follicle count*) i les dues són paràmetres importants que ens ajuden a estimar el nombre de fol·licles en creixement i el nombre total de fol·licles i oòcits a l'ovari, així com la reserva fol·licular ovàrica ¹². Per aquest motiu, diferents autors han estudiat el possible mesurament de les concentracions sèriques d'AMH observant que proporcionen un interès clínic per millorar la fertilitat i eficiència reproductiva i productiva en el cas dels animals de producció.

En remugants, l'AMH s'ha proposat com indicador de la fertilitat animal i també estimador de la potencia de producció d'oòcits i embrions ¹³, comparant les diferències de la concentració d'AMH en cicle natural i cicle sincronitzat ¹⁴. Aquesta hormona es pot utilitzar per predir la resposta a tractaments estimulants d'ovaris, com per exemple en tractaments de superovulació per aconseguir un major nombre d'embrions. Per altra banda, en aquestes espècies de producció, l'AMH també és de gran ús per estimar la taxa de gestació i l'eficiència de la inseminació artificial ⁷. En eugues, s'ha estudiat també com l'AMH pot ajudar a predir el potencial reproductiu, afirmant una alta correlació entre el AFC i la concentració sèrica d'AMH per estimar la reserva ovàrica, com en el cas dels remugants ¹⁵. A més a més, s'ha observat que l'AMH té un interès clínic en eugues per diagnosticar patologies, com els tumors de les cèl·lules de la granulosa (GCT) ¹⁶.

Recentment, s'ha estudiat les aplicacions clíniques de mesurar les concentracions sèriques d'AMH en animals de companyia. S'ha observat com l'AMH pot ajudar a diagnosticar malalties involucrades amb les gònades. Més concretament, en mascles s'han observat implicacions clíniques per diagnosticar tumors de les cèl·lules de Sertoli i problemes de infertilitat. En femelles, l'AMH ens pot ajudar a diferenciar gosses i gates esterilitzades de les que no ho estan i, d'aquesta manera, detectar el síndrome d'ovari romanent (ORS) ¹⁷. Com en les eugues, es pot detectar presència de GCT a partir de l'anàlisi de les concentracions sèriques d'AMH i problemes de infertilitat ¹⁸.

Per tot l'esmentat, s'observa que l'AMH pot tenir un interès clínic per incrementar l'eficiència reproductiva de les espècies domèstiques. Per aquest motiu, es realitzarà una explicació detallada de l'AMH, entrant en profunditat d'on s'expressa i com actua en cada una de les diferents espècies. Les seves funcions seran també explicades, així com la importància de l'AMH per detectar la reserva ovàrica en els animals de producció i les aplicacions pràctiques que ens podria proporcionar el mesurament de les concentracions sèriques de l'AMH en les diferents espècies.

6. Objectiu

L'objectiu general és el de determinar com l'AMH actua i s'expressa en les diferents espècies animals i observar quin ús clínic podem aplicar mesurant les concentracions d'aquesta hormona per millorar l'eficiència reproductiva, per tant productiva, dels animals domèstics. Per aquest motiu, s'ha realitzat una recerca bibliogràfica per estudiar en profunditat les diferents revisions publicades sobre l'AMH en els animals de producció, èquids i animals de companyia.

7. Metodologia

La revisió bibliogràfica s'ha basat en una recerca en llibres, articles i revisions sobre aspectes generals de l'AMH i, més en profunditat, estudiant com actua l'AMH dins cada espècie domèstica. Per aquest motiu, en la recerca d'aquest projecte inclouen articles i revisions procedents de la base de dades de Google Scholar ("Google Académico"), Web of Science, Pubmed (NCBI), Wiley Online Library i Scopus. Els llibres utilitzats han sigut trets de la biblioteca de la UDL, concretament sobre reproducció en les diferents espècies domèstiques. Tots els articles i revisions emprats s'han seleccionat a partir de l'any 2000 cap endavant, com més recents millor. Les paraules claus utilitzades han estat: *anti-mullerian hormone (AMH) + bovine, ovine, caprine, cattle, mare/equine, dogs, cats, domestic animals, ovarian reserve*.

Realitzant una comparació de la recerca en aquests últims 19 anys entre les diferents espècies mitjançant la base de dades Scopus, es troba que els animals de producció (*amh AND cattle*) són en els quals hi ha més informació publicada sobre l'AMH, amb un total de 91 resultats. Més específicament, dins d'aquest grup el boví (*amh AND bovine*) és l'espècie amb

major nombre de resultats (84). En èquids i animals de companyia s'observen menys resultats, amb un nombre total de 34 resultats en èquids (*amh AND mare*), 31 en gossos (*amh AND dog*) i finalment, 16 en gats (*amh AND cat*). Per tant, amb aquest primer anàlisi abans d'estudiar detalladament la revisió de l'AMH en les diferents espècies, podem afirmar que la recerca publicada sobre l'AMH entre els anys 2000 i 2018 és més freqüent en animals de producció, concretament en l'espècie bovina (Figura 1).

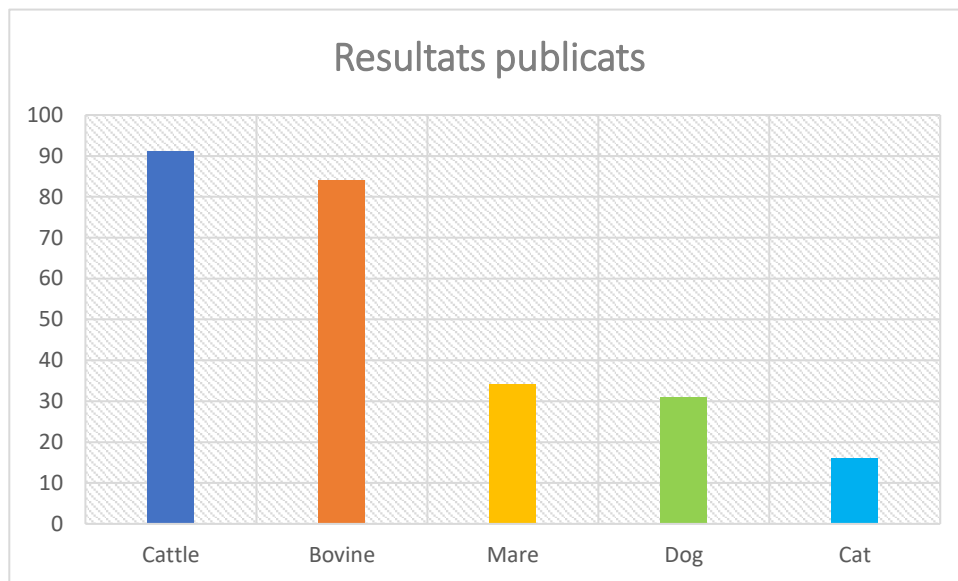


Figura 1. Número de publicacions relatives a l'hormona antimülleriana (AMH) de l'any 2000 al 2018 segons les diferents espècies.

8. Revisió bibliogràfica

8.1. Què és l'hormona antimülleriana?

L'AMH, també anomenada substància inhibidora de Müller, és una glicoproteïna dimèrica d'un pes molecular de 140 kDa, composta per dues subunitats idèntiques de 74 kDa unides per un pont disulfur ¹¹. Aquesta hormona és membre del TFG- β , el qual pertany a la superfamília dels factors de creixement i diferenciació cel·lular. Aquesta família de polipèptids comparteixen entre ells unes característiques estructurals i funcionals. Els membres de la família TFG- β són reguladors generals de les activitats de diferents tipus cel·lulars amb múltiples efectes biològics, com la proliferació, apoptosi, diferenciació i migració; tant en l'estat adult com en el desenvolupament embrionari ^{19,20}.

Aquesta superfamília de proteïnes a la qual pertany l'AMH inclou també el mateix TFG- β , les activines, les inhibines, i la proteïna morfogènica de l'os (BMP). Tots aquests factors comparteixen un grup de residus de cisteïna altament conservats formant una estructura comú que es troba sostinguda per enllaços disulfur intramoleculars ²⁰. Aquests membres actuen a les cèl·lules blanques sobre dos receptors transmembranosos d'activitat kinasa-serina-treonina, els receptors tipus I (AMHRI) i tipus II (AMHRII). El AMHRII és específic per l'AMH, mentre que els receptors d'AMH tipus I són compartits amb les BMPs ²². Després de la unió del lligand al seu receptor tipus II, el receptor tipus I és reclutat per formar un complex de receptors heterotetramèrics. L'activació del receptor tipus I és a través de la reacció química de transfosforilització pel receptor tipus II ²³.

L'AMH, conjuntament amb el seu receptor, és l'únic membre de la família del TFG- β que en femelles només s'expressa a les cèl·lules de la granulosa i en mascles a les cèl·lules de Sertoli ²⁴. En femelles, s'ha identificat com un factor que influeix en la fol·liculogènesis mitjançant la inhibició del reclutament fol·licular i disminució de l'eficàcia de la FSH en els fol·licles en desenvolupament ¹⁴.

8.2. On es produeix l'AMH?

L'AMH es secreta a les gònades masculines i femenines ²⁵. Es va descobrir inicialment per la seva funció primordial en la diferenciació sexual durant el desenvolupament fetal, provocant la regressió dels conductes paramesonèrics o de Müller en el fetus mascle. Més recentment s'ha reconegut la seva secreció en femelles al teixit ovari, on té funcions durant el desenvolupament fol·licular ².

Les cèl·lules somàtiques involucrades en el desenvolupament testicular fetal són les cèl·lules de Leydig y les cèl·lules de Sertoli, les quals produeixen hormones essencials pel correcte desenvolupament del sexe masculí ²⁶. Les cèl·lules de Leydig produeixen testosterona, que afavoreix el manteniment dels conductes mesonèrics o de Wolff els quals es diferencien en l'epidídim, conducte deferent i les glàndules sexuals accessòries (com per exemple les vesícules seminals). La testosterona també induïx la masculinització del sinus urogenital i els genitals externs. Per altra banda, en la gònada primitiva i un cop formats els cordons testiculars, les cèl·lules de Sertoli fetals sintetitzen l'AMH. En aquest context, l'AMH s'uneix al receptor de membrana AMHRII present a les cèl·lules mesenquimàtiques que envolten els conductes paramesonèrics o de Müller, induint la seva apoptosi i transformació epiteli-mesenquimatoso, i així provocant la regressió dels conductes de Müller. L'expressió del AMHRII és essencial pel desenvolupament doncs mutacions d'aquest resulten en persistència dels conductes de Müller en el mascle ²³. En el fetus femella, l'absència de testosterona i d'AMH resulta en la regressió dels conductes mesonèrics i el manteniment dels conductes paramesonèrics, dels quals s'originen els oviductes, l'úter i el terç superior de la vagina ²⁷.

L'expressió d'AMH en femelles comença més tard en el període fetal o després del naixement, i es prolonga a la vida adulta. Per exemple, en ratolins s'ha observat que aquesta expressió és als 3-4 dies post-natals ²⁶, mentre que en humans l'AMH s'expressa a partir de la setmana 36 de gestació ⁵. El receptor AMHRII s'expressa també als conductes paramesonèrics i gònades de femelles durant el període fetal, tot i que no se li reconeix una funció determinada ²³. Després del naixement segueix l'expressió d'aquest receptor als ovaris, concretament a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles primordials. En rosegadors, s'ha suggerit que el AMHRII també es troba a les cèl·lules de la teca dels fol·licles pre-antrals i antrals petits ⁵. Un cop en la fase adulta, l'expressió de l'AMH es troba per primer cop a les cèl·lules de la granulosa quan els fol·licles primordials són reclutats durant l'ona de creixement. L'AMH continua expressant-se en els fol·licles primaris i la màxima expressió es troba a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles pre-antrals grans i antrals petits ⁷. Els nivells de l'hormona van disminuint gradualment durant

el desenvolupament fol·licular, sent menors les concentracions en els fol·licles antrals de mida gran i absents als estadis finals de creixement dependents FSH i als fol·licles atrètics ⁶. La Taula 1 resumeix la presència d'AMH a l'ovari comparant els diferents tipus de fol·licles i el cos luti en les diferents espècies. Diferents autors varen publicar aquests resultats a partir d'anàlisis immunohistoquímics en teixit ovàric. L'estudi de l'expressió d'AMH segons el tipus de fol·licle basat en aquestes tècniques pot portar una interpretació subjectiva i, per tant, la comparació entre diferents estudis en diferents espècies és difícil. No obstant, com a conclusió, i com s'ha esmentat abans, es considera que la màxima expressió d'AMH és als fol·licles pre-antrals i antrals petits en totes les espècies on s'ha estudiat.

Taula 1. Anàlisi comparatiu de la presència d'hormona antimülleriana (AMH) en els diferents tipus de fol·licles i cos luti a l'ovari (Almeida *et al.* 2018).

	Primordial	Primari	Pe-antral	Antral petit	Antral Gran	Pre-ovulatori	Atrètic	CL	Ref.
Porcí	-/+	++	++	++	++	++	-	++	1
Humà	-/+ a +	+	++	++	++	+ a ++	-/+	-	28,29
Ratolí	-	+	+ / ++	+ / ++	- / +	-	- / +	-	12,26
Rata	-	+	++	++	- / +	-	- / + a +	- / +	1,30,31
Oví	-	- / +	+ / ++	++	+	+	NE	-	32,33
Caprí	- / +	++	+	+	- / +	- / +			34,35
Boví	-	- / +	++	++	+	NE	- / +	-	36,37
Èquid	-	- / +	++	++	NE	NE	-	NE	38,39

CL: Cos luti; Ref: Referència

– sense tinció; -/+ tinció molt lleu; + tinció moderada; ++ tinció elevada; NE no estudiat

De fet, s'ha trobat diferències entre espècies en quant al tipus cel·lular exacte involucrant en la secreció de l'AMH en la vida adulta. Per exemple, en vaques, ovelles, rates, ratolins, gallines i peixos l'expressió de l'AMH a l'ovari és restrictiva a les cèl·lules de la granulosa ²². En canvi, en cabres, porcs i humans l'AMH també s'expressa a les cèl·lules de la teca ⁴. No obstant, l'expressió d'AMH en humans a les cèl·lules de la teca no és clara ja que, aquests resultats s'han basant en estudis immunohistoquímics. Per tant, s'ha especulat que l'expressió potser s'origina a les cèl·lules de la granulosa, però s'observa més cap a la perifèria tal com el fol·licle va creixent, donat la impressió de que prové de les cèl·lules de la teca. En canvi, en porcí, tant estudis immunohistoquímics com d'expressió gènica en ovaris de truja van demostrar que aquesta hormona s'expressava a les cèl·lules de la teca que envolten la capa de granulosa durant la fase fol·licular, i també a les cèl·lules luteals després de l'ovulació. És més, l'anàlisi de les concentracions d'AMH al líquid fol·licular en boví, caprí i porcí, demostrava que els nivells d'AMH disminueixen gradualment en els fol·licles en creixement de bovins i caprins, mentre que a l'ovari porcí no hi ha diferències significatives entre els fol·licles antrals petits i grans ²². Per tant,

aquests autors van suggerir que en caprí és possible que l'expressió d'AMH a les cèl·lules de la granulosa i de la teca disminueixi així com el fol·licle antral va creixent, ja que la concentració al líquid fol·licular de fol·licles antrals es va reduint així com el fol·licle augmenta de mida. En canvi, tal com s'ha dit abans, en porcí s'observa l'expressió tant del gen com de la proteïna d'AMH als fol·licles pre-ovulatoris. Per aquest motiu, el porcí és de moment l'única espècie on s'ha demostrat que l'AMH no sols s'expressa a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles en creixement, sinó que també es manifesta a les cèl·lules de la teca dels fol·licles pre-ovulatoris i persisteix al cos luti ⁴⁰.

Una altra consideració són les concentracions d'AMH segon l'estadi de desenvolupament fol·licular en diferents espècies. En humans l'expressió d'AMH a les cèl·lules de la granulosa variaven dependent de la mida del fol·licle. Les expressions màximes d'AMH s'observaren en els fol·licles de 4-6 mm de mida, mentre que a partir de 8 mm l'expressió era nul·la ⁶. Així, Bontoux *et al.* (2008) va identificar que la concentració d'AMH és un bon marcador en el cas de poblacions de fol·licles sans d'aproximadament 3-7 mm, ja que les cèl·lules de la granulosa d'aquests fol·licles són les que expressen majors nivells d'ARN missatger (ARNm) de l'AMH en comparació amb fol·licles de mides més grans o de fol·licles atrètics. En el cas de diferents espècies domèstiques, Monniaux *et al.* (2013) van publicar concentracions d'AMH al líquid fol·licular de fol·licles antrals utilitzant immunoassajos específics d'aquesta hormona. En boví, caprí i oví les màximes concentracions s'observaven als fol·licles antrals petits i disminuïen marcadament quan els fol·licles augmentaven de diàmetre per arribar a la fase pre-ovulatòria. En canvi, en l'espècie porcina, no es va observar diferències significatives en les concentracions d'AMH intrafol·liculars de fol·licles de diferents mides. D'altra banda, les concentracions d'AMH als fol·licles antrals en porcí varen ser significativament menors en comparació amb els remugants (Figura 2). Com ja s'ha suggerit, les concentracions d'AMH també van lligades a la qualitat fol·licular. En vaques, Monniaux *et al.* (2013) va analitzar l'expressió de l'AMH determinant tant les concentracions en líquid fol·licular com l'expressió d'ARNm en cèl·lules de la granulosa, comparant fol·licles sans i atrètics. En fol·licles de 3-7 mm, l'expressió d'AMH era molt més baixa en els fol·licles atrètics (Figura 3). En canvi, en fol·licles de >7 mm de diàmetre, tot i que les concentracions d'AMH al fluid intrafol·licular eren també més baixes en fol·licles atrètics, no es corresponien amb els nivells d'expressió d'ARNm d'AMH (Figura 3). Es pensa que els mecanismes transcripcionals i post-transcripcionals podrien tenir un paper en la regulació de l'acumulació de l'AMH a l'antrum fol·licular, però no s'ha estudiat en profunditat.

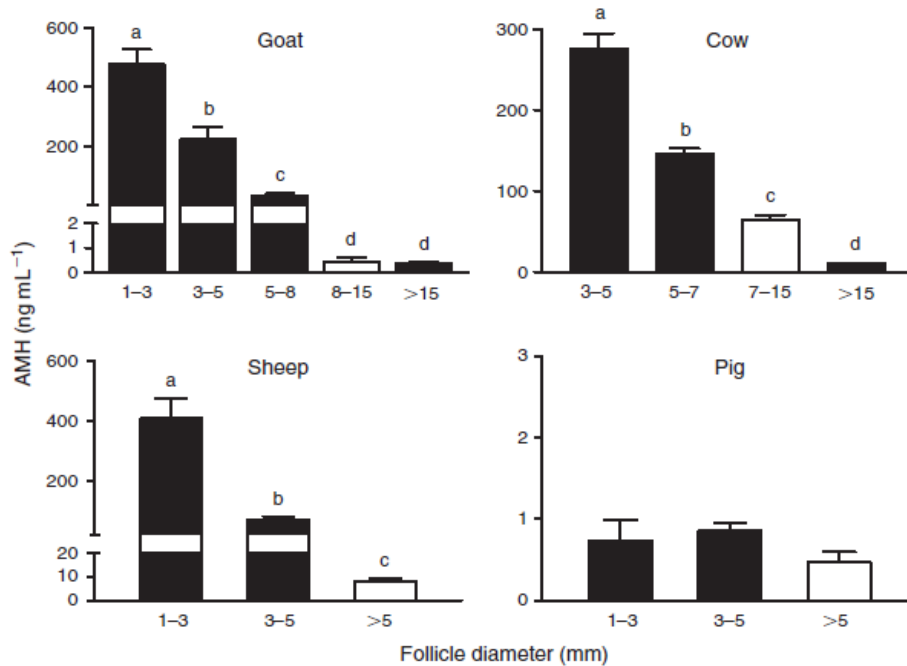


Figura 2. Concentracions d'hormona antimulleriana (AMH) intrafol·liculars, determinades per ELISA, als fol·licles antrals de diferents mides en cabres, vaques, ovelles i porcs (Monniaux *et al.* 2013).

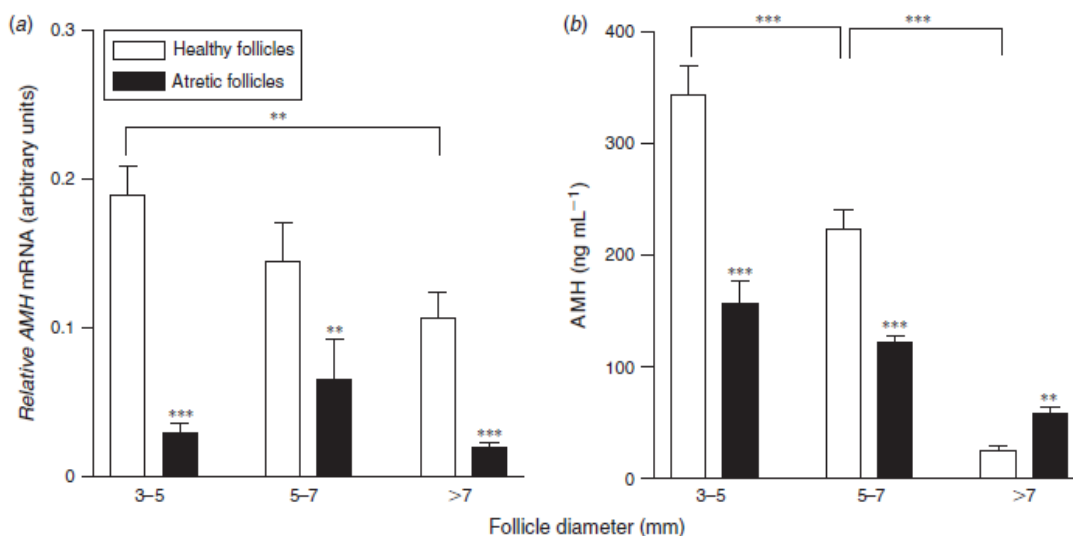


Figura 3. Efectes del creixement fol·licular i atresia en l'expressió de l'ARN missatger de l'hormona antimulleriana (ARNm d'AMH) a les cèl·lules de la granulosa i concentracions d'AMH al líquid fol·licular en fol·licles bovins (Monniaux *et al.* 2013).

En conclusió, l'AMH s'expressa en els mascles a les cèl·lules de Sertoli provocant la regressió dels conductes paramesonèfrics o de Müller, i en femelles, s'expressa a les cèl·lules de la granulosa al final de la gestació en humans i després del naixement en la resta d'espècies. La màxima expressió en la vida adulta de les femelles és a partir dels fol·licles reclutats per la

cascada de fol·licles primordials fins que són seleccionats com dominants per l'ovulació. Abans i després d'aquestes dues etapes importants del reclutament fol·licular l'AMH no s'expressa. Tot això ens indica que l'AMH té un paper important a la regulació tant del nombre de fol·licles en creixement com amb la selecció per l'ovulació ²⁶. A continuació, s'explicaran les funcions de l'AMH detingudament en la femella i l'interès pràctic d'aquesta hormona en les diferents espècies.

8.3. Funcions de l'AMH específiques a l'ovari

Els patrons específics d'expressió de l'AMH a l'ovari ens mostren que l'AMH té un paper fonamental durant la fol·liculogènesis, regulant el creixement fol·licular i la seva selecció per l'ovulació ²⁶. El desenvolupament fol·licular ovàric és un procés caracteritzat per una proliferació i diferenciació de les cèl·lules fol·liculars, proporcionant un micro-ambient òptim per la maduració de l'oòcit i la seva preparació per la fertilització després de l'ovulació. Aquest desenvolupament inclou senyals endocrines, paracrines i autocrines dins l'ovari i un intercanvi de senyals endocrines entre els ovaris i la hipòfisi, introduint una combinació d'interaccions entre hormones, factors de creixement, sistemes de comunicació cel·lulars i gens ⁴¹.

L'ovari és el responsable de la producció d'oòcits i de la síntesis d'hormones sexuals (estrògens i progesterona) les quals regulen la fertilització de l'oòcit i el manteniment de la gestació ⁴². Les cèl·lules germinals primordials (PGC) comencen un procés de migració que les porta des de l'endoderma del sac vitel·lí, a través de la matriu extracel·lular del mesènquima del mesenteri dorsal, fins a la seva localització definitiva als plecs o primordis gonadals, ocupant així una posició intraembrionària ⁴³. Aquestes PGC es concentren en el còrtex genital per formar oogònies, les quals proliferen a través de mitosis. Seguidament la primera fase de la meiosi forma els oòcits que queden arrestats en diplotè durant la profase I de la meiosi, abans del naixement ⁴⁴. En la majoria de mamífers, com els primats i espècies animals domèstiques, la població d'oòcits primaris concreta, el que es defineix com reserva ovàrica, s'estableix durant al desenvolupament fetal. En canvi, en els rosegadors aquesta població d'oòcits no s'estableix fins al moment del naixement ⁴⁵.

Tant si és abans com després del naixement, l'oòcit arrestat en profase I és envoltat per una capa simple de cèl·lules planes escamoses de la pre-granulosa per formar el fol·licle primordial ⁴⁵. Aquests són els fol·licles que han esdevingut el que es coneix com a reclutament

inicial, i que en diferents moments de la vida de la femella continuaran el seu creixement. Al llarg de la vida d'una femella, els fol·licles primordials es comencen a desenvolupar i passen a ser fol·licles primaris en transició. Aleshores, les cèl·lules escamoses de la pre-granulosa es transformen en cèl·lules cuboidals de la granulosa que comencen a proliferar. Així com els fol·licles van adquirint capes successives de cèl·lules de la granulosa es converteixen en fol·licles primaris, secundaris i pre-antrals, respectivament. Seguint al desenvolupament fol·licular, l'òocit també adquireix la zona pel·lúcida i augmenta de mida ⁴¹. A l'últim estadi de desenvolupament, el centre del fol·licle desenvolupa una cavitat plena de fluid o antre en el que s'anomena fol·licle antral o de Graaf. De dins a fora, el fol·licle antral està format per una cavitat de líquid, les capes cel·lulars de la granulosa i de la teca interna, separades per una làmina basal, i una capa de teixit connectiu anomenada la teca externa ⁴⁴. El desenvolupament de transició d'un fol·licle primordial fins al període antral està regulat per diferents factors de creixement que actuen localment dins de l'ovari independentment de gonadotropines (Figura 4) ⁴¹. Un cop a la fase antral, el creixement continuat del fol·licle fins a l'ovulació depèn de gonadotropines d'origen pituïtari. Inicialment, la FSH assegura estimular el creixement del fol·licle fins a l'estadi pre-ovulatori. Aquest procés gradual de desenvolupament i diferenciació d'un fol·licle, des d'una estructura primordial fins a un fol·licle pre-ovulatori, és d'aproximadament 8 setmanes en rosegadors i uns 6 mesos en mamífers més grans, com són els humans i bovins ⁴¹.

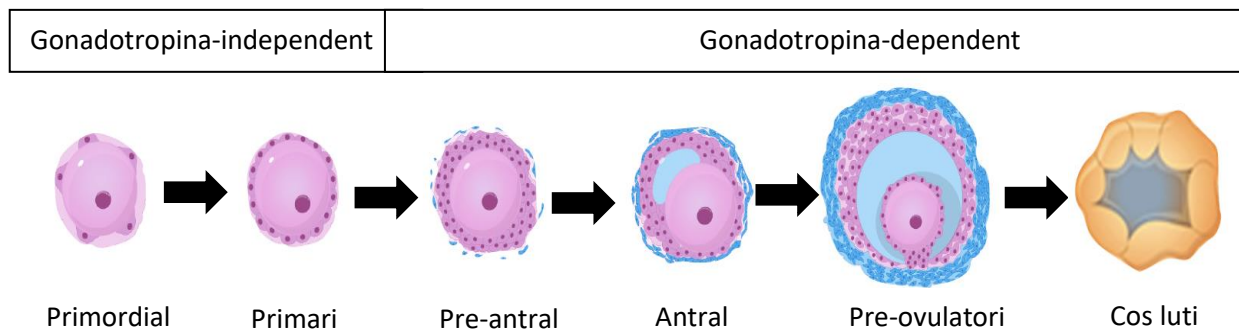


Figura 4. Fol·liculogènesis. Diferents fases de desenvolupament dels fol·licles des d'un fol·licle primordial fins a la fase pre-ovulatòria. La transició d'un fol·licle primordial fins al període antral depèn de factors locals. A partir de la fase pre-antral el creixement depèn de concentracions adequades de gonadotropines (Basada en Zylbersztein, 2008).

El procés de creixement i regressió dels fol·licles antrals que condueix al desenvolupament final d'un fol·licle pre-ovulatori es coneix com dinàmica fol·licular i es refereix al creixement dels fol·licles en ones o grups. En aquestes ones fol·liculars, cada grup de fol·licles és reclutat o escollit perquè pugui iniciar el seu creixement i sortir de l'estat de latència. D'aquest

conjunt, un o varis són seleccionats i finalment, en espècies monotoques, un d'ells es converteix en fol·licle dominant que està destinat a l'ovulació, mentre que els altres sofreixen atresia (Figura 5). Segons l'espècie animal el nombre d'ones fol·liculars durant el cicle estral varia. Per exemple, en petits remugants s'observa fins a tres ones fol·liculars en ovelles i tres o quatre en cabres. En eugues, només s'observa dues ones fol·liculars dins la fase luteal, seguides d'una ona ovulatòria i en vaques de dues a tres ones fol·liculars ⁴¹.

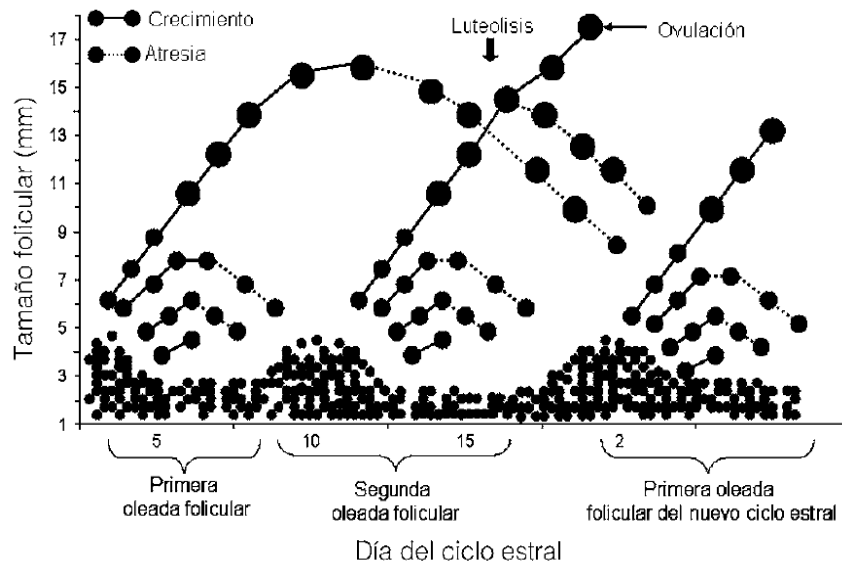


Figura 5. Representació esquemàtica de la dinàmica fol·licular en bovins (Espinoza *et al.* 2007).

Independentment de l'espècie i nombre d'ones fol·liculars, cada ona té tres etapes. La primera és el reclutament, en la que el grup de fol·licles adquireix l'habilitat per respondre a les gonadotropines i començar a créixer ràpidament. Aquest és el que es coneix com a reclutament cíclic i que comença a partir de la pubertat, per distingir-lo del reclutament inicial de fol·licles primordials del qual s'ha parlat anteriorment. Després de la fase de reclutament, la segona és la selecció, on el grup de fol·licles és escollit per no patir el procés d'atresia i poder continuar creixent. En aquesta fase, els fol·licles pre-antrals grans i antrals petits, sensibles a la FSH, seran seleccionats per l'etapa pre-ovulatòria, mentre que els altres patiran atresia ⁵. Finalment, la tercera i última etapa és la de dominància, en la que un o més fol·licles es desenvolupen de forma més ràpida que la resta, inhibint el creixement d'altres fol·licles i impeding el reclutament d'un nou grup fol·licular ⁴¹. El fol·licle o fol·licles que continuaran fins a l'ovulació es coneixen com a dominants. Durant la seva selecció, aquests creixen d'una forma constant mentre que la resta de fol·licles creixen a una velocitat més baixa, deixen de créixer i/o directament s'atrofien.

Tots aquests fenòmens responen a la interacció entre les hormones pituïtàries i les produïdes a nivell local. Les gonadotropines FSH i l'hormona luteïnitzant (LH) són les principals hormones proteiques implicades en el creixement i maduració fol·licular. Són responsables de la selecció fol·licular dels fol·licles dominants, dels canvis esteroidogènics dels fol·licles i de l'ovulació. Actuen activant a través dels seus receptors els processos dependents del fosfat d'adenosina cíclic (AMPC) sobre les cèl·lules de la teca i de la granulosa. La seva regulació depèn de la secreció de l'hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotàlem i de les concentracions d'estradiol, activina i inhibina circulant ⁴⁴. Més concretament, la FSH estimula la producció de la progesterona i l'aromatasa, enzima necessària per la conversió de testosterona en estrògens, a nivell de l'ovari ⁴⁴. Gràcies a l'acció de la FSH, el fol·licle dominant pot ser seleccionat per l'ovulació, ja que aquests fol·licles es caracteritzen per un increment de la sensibilitat de les cèl·lules de la granulosa a la FSH ⁴¹. La LH indueix als fol·licles dominants la maduració dels oòcits, l'ovulació i el desenvolupament i manteniment del cos luti responsable de la producció de progesterona. Sobre les cèl·lules de la teca del fol·licle dominant, la LH provoca un increment de la producció d'andrògens que amb l'acció de la inhibina contribuiran a un major increment de la síntesis d'estradiol per part de les cèl·lules de la granulosa. Així, la LH induirà la maduració final del fol·licle, ja que els estrògens actuaran paracrinament sobre l'activitat de les cèl·lules de la teca i sobre la maduració del oòcit, i autocrinament sobre la diferenciació de les pròpies cèl·lules de la granulosa ⁴⁴.

Concretament, l'AMH té dues funcions específiques durant aquest procés de fol·liculogènesis. Per una banda, inhibeix el reclutament dels fol·licles primordials en creixement i, per altra banda, bloqueja l'efecte estimulador de la FSH sobre el creixement dels fol·licles preantrals i antrals petits ⁷. Aquestes funcions de l'AMH, s'expliquen detalladament ens els següents subapartats.

8.3.1. L'AMH inhibeix el reclutament de fol·licles primordials en creixement

L'AMH actua en la fase del reclutament inicial inhibint l'inici del creixement fol·licular, concretament, el desenvolupament fol·licular primordial. Aquest desenvolupament és la transició del fol·licle primordial a primari, en el qual el fol·licle va creixent successivament augmentant les capes de cèl·lules de la granulosa, les cèl·lules de la teca i el fluid antral ⁴⁶. Atestant a aquesta funció de l'AMH, es va observa que els ratolins *null*, als quals se'ls havia eliminat el gen codificant per l'AMH, tenien ovaris més grans que els corresponents ratolins silvestres, i això era degut a un nombre major de fol·licles no atrètics en l'absència d'AMH ²⁶.

Com que el nombre de cossos luti no variava entre els dos grups, es va concloure que l'augment del nombre de fol·licles no atrètics no era causat per un creixement retardat o una selecció anòmala dels fol·licles, sinó per un increment en el reclutament de fol·licles primordials en els ratolins *null*. És més, aquest efecte es podia contrarestar cultivant in vitro els ovaris de ratolins nounats *null* en la presència d'AMH. Després de dos dies en cultiu hi havia un 50% menys de fol·licles als ovaris corresponents, suggerint que l'AMH actuava directament sobre els fol·licles primordials ^{23,26} (Taula 2).

Taula 2. Efectes inhibitoris de l'hormona anti-mülleriana (AMH) en el nombre de fol·licles en creixement d'ovaris de ratolins de 2 dies d'edat en cultiu in vitro (Durlinger *et al.* 2002).

Dia del cultiu	Control	+ AMH
2	81 (100%) (<i>n</i> = 9)	50 (59%)* (<i>n</i> = 9)
4	153 (100%) (<i>n</i> = 11)	97 (66%)* (<i>n</i> = 11)

n = nombre d'ovaris examinats

%: el nombre de fol·licles en creixement del control es va establir a 100%

*Indica una diferència significativa en comparació amb el control (no AMH; $P \leq 0.05$)

Altres estudis també han adreçat el control molecular de l'efecte supressiu de l'AMH en la transició dels fol·licles primordials a primaris. Utilitzant també ratolins *null*, no sols es van confirmar aquests efectes sinó que es va observar una interacció d'aquesta hormona amb factors de creixement estimulants, incloent el factor fibroblasts bàsic (bFGF), el factor de creixement *kit ligand* (KITL) i el factor de creixement de queratinòcits (KGF), que s'expressen a les diferents cèl·lules dels fol·licles primordials en desenvolupament ⁴⁶. Més concretament, el receptor de bFGF es troba a les cèl·lules de la granulosa i estimula la proliferació de les cèl·lules estromals i de la granulosa, així com augmenta l'expressió de l'ARNm del KITL ⁴⁷. Els receptors d'aquest factor de creixement KITL estan presents a l'oòcit i a les cèl·lules de la teca i actuen reclutant les cèl·lules de la teca que envolten l'estroma de l'ovari durant la transició dels fol·licles primordials a primaris ⁴⁸. Finalment, el factor de creixement KGF es produeix a les cèl·lules de la teca dels fol·licles primordials durant el desenvolupament inicial ⁴⁹.

Per observar la interacció de l'AMH amb els tres factors de creixement, es van cultivar in vitro ovaris de ratolins *null*, bé amb tractament només d'AMH, i AMH en combinació amb bFGF, KITL o KGF. En els tres casos es va demostrar que la proporció de fol·licles en desenvolupament en els ovaris tractats amb AMH era similar a la dels ovaris tractats en combinació d'AMH i els factors de creixement. Aquests resultats suggereixen que l'AMH inhibeix els efectes estimulants que tenen els factors de creixement bFGF, KITL i KGF sobre la transició

de fol·licles primordials a primaris ⁴⁶. Aquests autors van concloure que l'AMH tindria diferents punts d'actuació per aconseguir la inhibició de la transició de fol·licles primordials a primaris, donat que els diferents factors de creixement actuen per diferents vies. Així, per frenar les accions de bFGF s'hauria d'influenciar les cèl·lules de la granulosa, en el cas de la inhibició dels efectes de KITL s'hauria d'actuar a l'oòcit, i per inhibir l'acció de KGF s'actuaria sobre els precursors de les cèl·lules de la teca.

En resum, el fet de que l'AMH inhibeixi l'inici del creixement de fol·licles primordials es relaciona també amb el nombre de fol·licles disponibles durant la vida reproductiva d'una femella. Per tant, l'absència d'AMH resultaria en un major de fol·licles primordials sent reclutats per continuar el creixement fol·licular, i s'obté un nombre major de fol·licles pre-ovulatoris. D'aquesta manera, l'AMH actuarà amb un feedback negatiu en el nombre de fol·licles presents a l'ovari provocant una inhibició a la transició de fol·licles primordials a primaris, modulant de la mateixa manera un creixement fol·licular prematur i inhibint un nombre excessiu de fol·licles, evitant així un esgotament prematur de la reserva fol·licular ovàrica.

8.3.2. L'AMH inhibeix l'estimulació de la FSH als fol·licles en creixement

Notablement, l'AMH no actua solament en el reclutament fol·licular inicial, sinó que també té un paper important en la regulació del reclutament cíclic. En aquesta fase, que té lloc a l'estre i després del pic de FSH, els fol·licles pre-antrals grans i antrals petits són reclutats per seguir creixent fins a la fase pre-ovulatòria. Aquest moment en que les concentracions de FSH són elevades és important per l'estimació del nombre de fol·licles que seran reclutats ²³. A més, cada fol·licle necessita una certa concentració de FSH per continuar creixent, per tant, els fol·licles individualment presenten el seu llindar de concentració de FSH i aquest mínim de concentració ha de ser superat perquè puguin créixer fins l'estat pre-ovulatori. S'ha observat que l'AMH pot ser un dels factors involucrats en determinar la capacitat de resposta de cada fol·licle a la FSH durant el reclutament cíclic ²³. No obstant, una de les evidències que l'AMH modula la sensibilitat dels fol·licles a la FSH va venir de l'observació de que els ovaris de ratolins *null* tenien més fol·licles en creixement en comparació als dels ratolins controls. Per altra banda, quan els fol·licles pre-antrals es cultivaven in vitro en un medi suplementat amb AMH, el diàmetre del fol·licle era menor que en aquells cultivats sense AMH ⁵.

Un altra estudi va comparar el creixement fol·licular en femelles de ratolí *null* o controls, en la presència de concentracions sèriques altes o baixes de FSH. Es va observar que hi havia

més fol·licles en creixement en femelles *null* que en controls, tant si les concentracions circulants de FSH eren baixes com altes ²³. Tot això ens conclou que amb expressions nul·les d'AMH els fol·licles tenen una resposta major a la FSH per un augment de la sensibilitat a aquesta hormona, deixant que aquests fol·licles siguin seleccionats per continuar creixent i obtenint així un nombre elevat de fol·licles en creixement. Per tant, l'AMH té un paper important inhibint la sensibilitat dels fol·licles a la FSH ja que d'aquesta manera hi haurà menys fol·licles que seran reclutats per créixer fins la fase pre-ovulatòria ²³.

En conclusió, s'observa que l'AMH té dues funcions essencials durant el desenvolupament fol·licular: la inhibició del reclutament de fol·licles primordials i la seva transició cap a fol·licles primaris, i la inhibició de la sensibilitat dels fol·licles a la FSH (Figura 6). Aquestes funcions són importants durant la fol·liculogènesis perquè d'aquesta manera l'AMH ens regula el nombre de fol·licles en creixement i la seva correcta selecció per l'ovulació. Tot això provoca un desenvolupament fol·licular òptim, limitant el nombre final de fol·licles en creixement, controlant el nombre de fol·licles pre-antrals i antrals petits que continuaran creixent, i regulant els fol·licles que arribaran a la fase pre-ovulatòria, modulant l'efecte de la FSH. Tot alhora serveix per regular el nombre de fol·licles que s'ovularan en un cicle estral així com per evitar un esgotament prematur de la reserva fol·licular ovàrica.

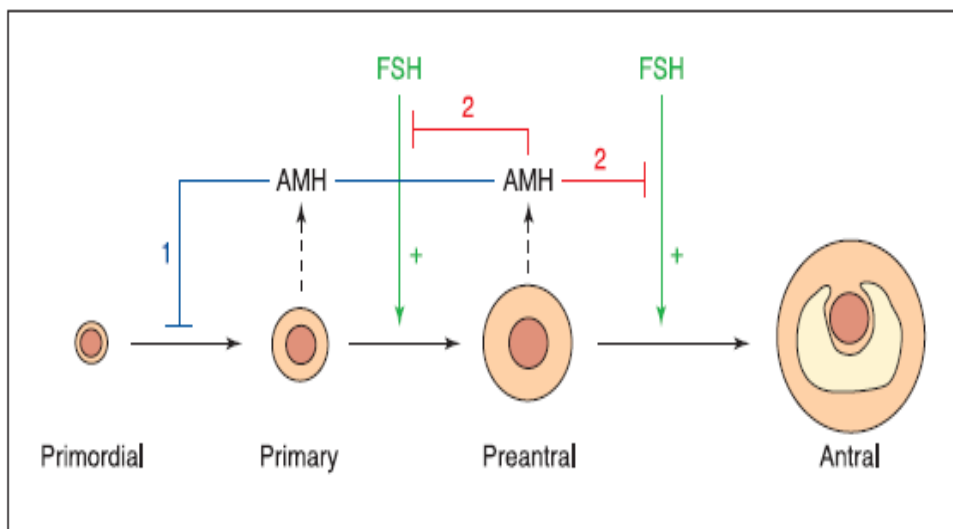


Figura 6. Accions de l'hormona antimülleriana (AMH) a l'ovari. L'AMH es produeix als fol·licles pre-antrals i antrals petits a l'ovari. La inhibició del reclutament inicial (1) i la inhibició de l'efecte estimador de l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) en els fol·licles preantrals grans i antrals petits (2) (Durlinger *et al.* 2002).

8.4. Concentracions sèriques d'AMH

Els nivells circulants d'AMH estan molt més estudiats en humans i aquests varien depenent de l'edat. Al naixement, les concentracions d'AMH són casi indetectables (0.35-1 ng/mL) i es van incrementant sotilment fins arribar a la pubertat quan els nivells són mitjos, d'aproximadament 2.8-4.2 ng/mL. Aquests valors es mantenen estables durant la vida reproductiva, comencen a disminuir a partir de la tercera dècada de la vida i són nuls al arribar a la menopàusia (Taula 3). L'últim cicle menstrual de la dona apareix aproximadament 5 anys després del moment en que l'AMH és indetectable en sang, fet que ens indica que l'AMH sèrica és un bon predictor per saber l'edat menopàusica i signe de disminució de la reserva ovàrica ².

Taula 3. Valors de l'hormona antimülleriana (AMH) en humans en funció de l'edat (Rey *et al.* 2013).

	n	AMH (ng/mL)	
		Mitjana	p3-p97
0-30 dies	41	0.75	<2.5-23
1-11 mesos	6	1.35	3.8-7.6
1-7 anys	50	2.81	7.3-49
8-17 anys: M1	13	4.61	16-62
M2	64	2.77	3.4-54
M3	43	2.25	6.5-68
M4	64	2.13	4.9-57
M5	52	2.30	3.1-53
18-29 anys	60	2.30	5.6-55
30-37 anys	27	1.78	3.3-33
38-45 anys	18	1.27	<2.5-34

M1 a M5: estadis del desenvolupament mamàri segons Tanner (99).

En animals, les concentracions d'AMH en sèrum són altament variables entre els individus d'una mateixa espècie. No obstant, al igual que en humans, els nivells d'AMH estan relacionats amb el nombre de fol·licles antrals petits en creixement. Per aquest fet, l'AMH és un marcador endocrí per determinar el nombre de fol·licles en creixement, amb un interès pràctic per establir una bona fertilitat i aplicar biotecnologies reproductives ²². Semblant al que passa en humans, en vaques els nivells d'AMH també comencen a augmentar abans de la pubertat,

entre el primer i tercer mes d'edat i es mantenen elevats fins als 6 mesos d'edat. Després aquests nivells van disminuint fins als 12 mesos d'edat, que es correspon amb l'edat de la pubertat ²².

En quant a variacions en les concentracions d'AMH al llarg del cycle estral, no s'han observat en humans, encara que les concentracions arriben al màxim durant la fase fol·licular ²². En vaques, sí que es va observar un perfil dinàmic a quant a nivells d'AMH, però independent de les ones fol·liculars del creixement pre-ovulatori. Específicament, es va observar una disminució ràpida de les concentracions d'AMH després de l'estre, arribant als nivells mínims els dies 4-8 del cycle, i seguit d'un petit augment d'aquestes concentracions fins el pròxim cycle (Figura 7) ⁵⁰. Aquests canvis en la concentració d'AMH en vaques no estaven associats a canvis en el nombre de fol·licles detectats amb ultrasonografia ovàrica. No obstant, en estudis in vitro on s'han cultivat cèl·lules de la granulosa de vaca, s'ha observat que la presència d'altres concentracions de FSH inhibeix la síntesis d'AMH ²². Per tant, es creu que aquests nivells circulants d'AMH en vaques disminueixen dies després de l'estre en resposta als nivells elevats de FSH pre- i peri-ovulatoris.

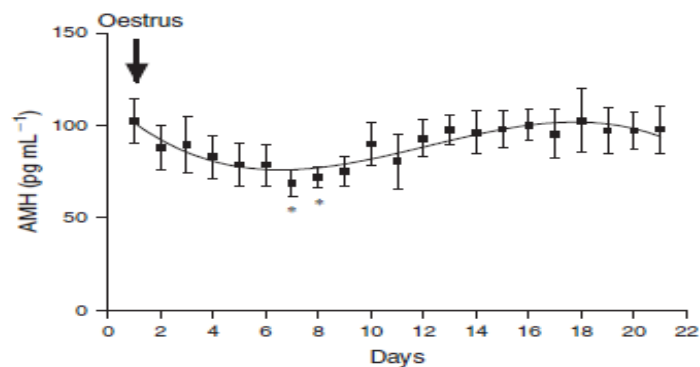


Figura 7. Canvis en la concentració d'hormona antimülleriana (AMH) en plasma durant els primers 20 dies de l'estre natural en boví (Monniaux *et al.* 2013 adaptat de Rico *et al.* 2011).

En vaques, els nivells d'AMH també presenten variacions durant la gestació. Es va observar que les concentracions d'AMH en sèrum eren més elevades durant els 3 primers mesos de gestació, després disminuïen fins abans del part i seguien baixes durant el període de post-part. Finalment, augmentaven un altra cop durant els 3 primers mesos de la segona gestació tornant a disminuir després del segon part (Figura 8) ²². Els autors van observar una diferència en el nombre de fol·licles antrals petits entre la gestació i el post-part. Per tant, van concloure que l'AMH es secreta exclusivament per les cèl·lules de la granulosa i que les fluctuacions en les

concentracions d'AMH durant la gestació i el post-part són conseqüència de la població de fol·licles amb alta secreció d'AMH als ovaris.

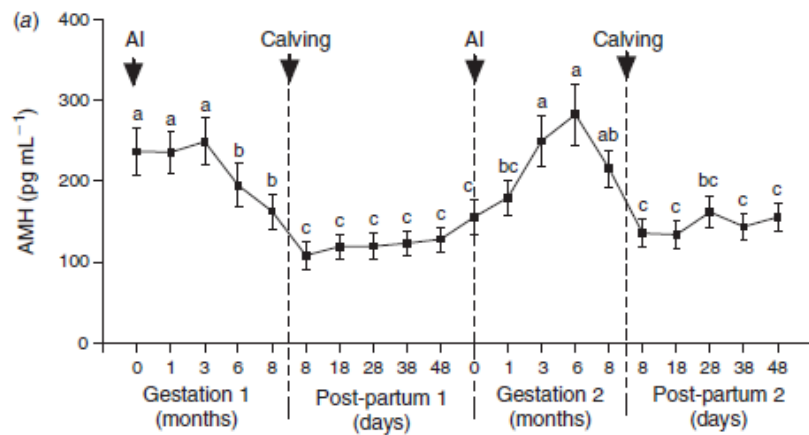


Figura 8. Concentracions plasmàtiques d'hormona antimülleriana (AMH) durant els períodes de gestació i post-part en vaques (Monniaux *et al.* 2013).

8.5. Regulació de l'expressió de l'AMH segons les hormones i els factors de creixement a les cèl·lules de la granulosa

Les cèl·lules de la granulosa, com s'ha explicat abans, són les úniques cèl·lules que produeixen l'AMH en les femelles de la majoria de les espècies estudiades. Aquesta expressió d'AMH s'inicia amb l'activació del creixement fol·licular i acaba quan el fol·licle entra en atresia o atura el seu desenvolupament. Per tant, la producció d'AMH és una activitat de les cèl·lules de la granulosa immadures i en proliferació, caracteritzades per una activitat esteroidogènica baixa ²².

Alguns autors estudiaren els diferents factors de creixement i hormones involucrats en l'expressió d'AMH a les cèl·lules de la granulosa. Observaren en bovins que les BMP, en concret BMP4 i BMP6, expressades als oòcits i cèl·lules de la teca respectivament, augmentaven l'expressió de l'ARNm de l'AMH a les cèl·lules de la granulosa. En canvi, concentracions altes de FSH en sèrum inhibien aquesta expressió ⁵⁰. D'acord amb aquests resultats, en bovins i ovins, la suplementació de cultius de cèl·lules de la granulosa amb FSH conjuntament amb diferents isotips de BMP, provocà una inhibició a l'efecte positiu de les BMP sobre l'AMH, manifestada com a reducció de l'expressió de l'AMH a nivell de l'ARNm (Figura 9) ²². Aquests resultats ens indiquen que les BMP i la FSH tenen efectes oposats sobre l'expressió de l'ARNm de l'AMH. Per

tant, les BMP al augmentar l'expressió genètica i secreció proteica d'AMH a les cèl·lules de la granulosa dels remugants, tindrien un paper important en augmentar i mantenir l'expressió de l'AMH als fol·licles antrals petits, així participant en el desenvolupament fol·licular. No obstant, els mecanismes exactes de regulació d'aquests efectes de la FSH i BMP no estan molt estudiats.

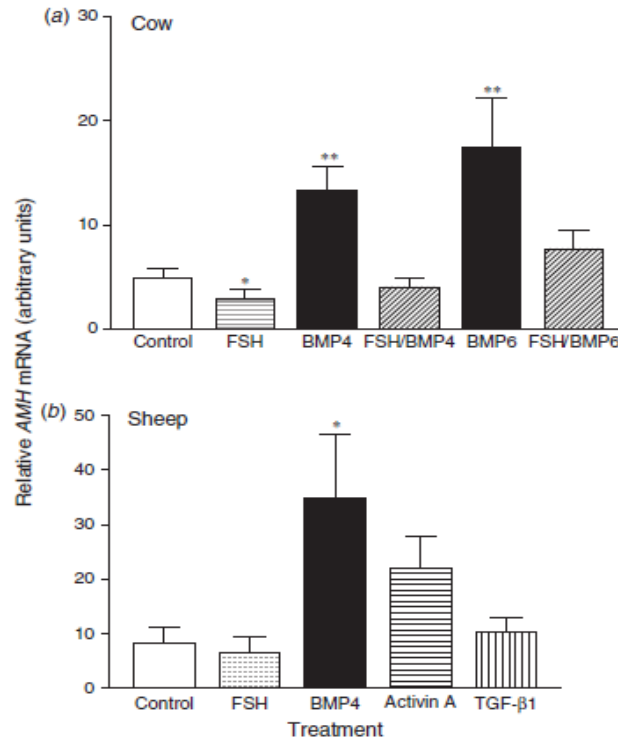


Figura 9. Efectes de l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) i les proteïnes morfogèniques de l'os (BMP) a l'expressió de l'ARN missatger de l'hormona antimülleriana (AMH) en cèl·lules de la granulosa de bovins (a) i ovins (b). (a) Les cèl·lules de la granulosa es van estimular amb tractaments de FSH, BMP4, BMP6, FSH+ BMP juntament. (b) Les cèl·lules de la granulosa es van estimular amb tractaments de FSH, BMP4, activina A i el factor de creixement transformant-β1 (TFG-β1) (Monniaux *et al.* 2013).

Com s'ha recalcat abans, l'AMH disminueix la resposta dels fol·licles en creixement a la FSH. Així mateix, en rates i truges, també va reprimir l'expressió de l'hormona luteïnitzant/receptor de coriogonadotropina (LHCGR) i el gen citocrom P450 de l'aromatasa (CYP19A1) a les cèl·lules de la granulosa estimulades per FSH ²⁴. Es va suggerir que aquesta relació inversa entre l'expressió de l'aromatasa i l'AMH a les cèl·lules de la granulosa durant el desenvolupament fol·licular terminal era deguda a l'acció de la FSH. És a dir, s'havia observat que la FSH induïa l'expressió de CYP19A1 a les cèl·lules de la granulosa de la majoria de les espècies estudiades, també que suprimia l'expressió de l'AMH directament i a través del seu

efecte antagonista sobre les accions estimulants de les BMP, en cèl·lules de la granulosa bovines ²².

La Figura 10 resumeix les interaccions entre la producció de l'AMH, i altres hormones i factors de creixement durant la fol·liculogènesis. El color blau intens representa les concentracions d'AMH a les cèl·lules de la granulosa, denotant que aquesta expressió d'AMH és elevada als fol·licles antrals petits. S'observa com les BMPs indueixen i mantenen la síntesis d'AMH a les cèl·lules de la granulosa d'aquests fol·licles. Aquestes concentracions altes d'AMH als fol·licles antrals petits participen en la inhibició dels efectes de la FSH sobre la cèl·lules de la granulosa. Així com es desenvolupa el fol·licle antral, les cèl·lules de la granulosa disminueixen l'expressió d'AMH i es tornen més sensibles a la FSH, provocant així que la FSH reprimeixi aquesta expressió d'AMH i les accions estimulants de les BMP. Participant en aquestes interaccions, s'ha observat també que altes concentracions d'estradiol poden interferir en l'activitat inhibidora de la FSH sobre la producció d'AMH ²². Aquest increment en la producció d'estradiol es deu a una elevació de la proteïna kinasa A (PKA), i conseqüent dels nivells d'AMPc i expressió de CYP19A1 a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles antrals grans ⁵¹.

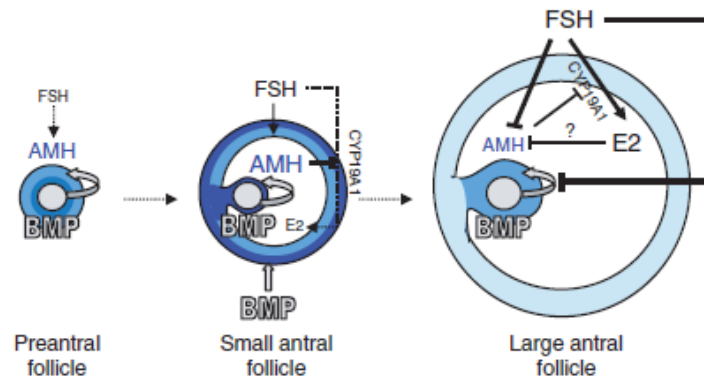


Figura 10. Regulació paracrina i endocrina de la producció de l'hormona antimülleriana (AMH) durant el desenvolupament fol·licular en mamífers. El color blau intens representa concentracions d'AMH a les cèl·lules de la granulosa. L'expressió de l'AMH és major a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles antrals petits. Les proteïnes morfogèniques de l'os (BMPs) indueixen la síntesis d'AMH a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles pre-antrals i antrals petits. Durant el desenvolupament del fol·licle, l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) inhibeix l'expressió d'AMH i té un efecte antagonista sobre les accions estimulants de les BMPs a l'AMH. Es suggereix que aquests efectes inhibitoris de la FSH a l'expressió d'AMH poden estar mediat per altes concentracions intrafol·liculars d'estradiol (E2) que resulten d'un increment en l'expressió del gen citocrom P450 de l'aromatasa (CYP19A1) a les cèl·lules de la granulosa de fol·licles antrals grans (Monniaux *et al.* 2013).

8.6. L'AMH i la reserva ovàrica

En la majoria de mamífers, les femelles neixen amb una població d'òcits variable que disminueix durant la vida reproductiva de cada individu fins arribar al final d'aquesta etapa reproductiva. Aquest nombre relatiu de fol·licles i òcits varia entre els individus, i la disminució final d'òcits s'associa amb un descens de la fertilitat ⁵². La reserva ovàrica es defineix com el nombre de fol·licles i òcits morfològicament sans continguts a l'ovari ¹¹. Per tant, està associat amb la fertilitat de l'individu i ens ajuda a quantificar i qualificar l'ovari ¹⁴.

En femelles de diferents espècies domèstiques la població fol·licular a l'ovari es pot determinar fent un recompte de fol·licles antrals amb ecografia ¹⁴. En humans també s'utilitzen diferents marcadors hormonals per l'avaluació de la reserva ovàrica, com un increment dels nivells de FSH i una disminució de l'estradiol en dies concrets del cicle. No obstant, es va observar que l'AMH era probablement el millor marcador, degut al fet de que la seva secreció reflexa el nombre de fol·licles i és independent de la secreció de gonadotropines i del dia del cicle menstrual ¹¹. Les concentracions d'AMH estan positivament correlacionades amb el nombre total de fol·licles i òcits sans a l'ovari. Com s'ha comentat anteriorment, l'AMH té un paper important durant el desenvolupament fol·licular, regulant el nombre de fol·licles en creixement (inhibint el reclutament) i en la selecció d'aquests fol·licles per ser ovulats (inhibint la sensibilitat a FSH). Per altra banda, s'ha demostrat que els nivells sèrics d'AMH disminueixen significativament al llarg del temps i la vida reproductiva, mentre que altres nivells hormonals, com la FSH i la inhibina B, i el recompte de fol·licles antrals no sempre es modifiquen d'una forma tant representativa ¹¹.

Alguns estudis en ratolins indicaren que la concentració sèrica d'AMH és un marcador excel·lent per determinar la mida de la cascada de fol·licles primordials, així com determinar la reserva ovàrica. Per altra banda, també s'observà que el AFC és un bon predictor, així com l'AMH, per detectar la fertilitat dels individus ¹². Per aquest motiu, es van realitzar estudis en animals domèstics de producció per tal d'esbrinar si també hi havia una correlació entre els nivells d'AMH i el AFC i si aquests paràmetres podien ser útils per detectar la capacitat reproductiva dels individus. Mossa *et al.* (2019) van organitzar el AFC en tres nivells: baix, mitjà i alt (Taula 4), per demostrar que aquest AFC estava associat positivament amb la reserva ovàrica en els remugants. Realitzaren una comparació entre els animals amb un alt i un baix AFC, observant que els individus amb un alt AFC tenien un 80% més de fol·licles i òcits totals morfològicament sans a l'ovari, afirmant així que la reserva ovàrica és major en els animals amb un alt vs. baix AFC.

Taula 4. Classificació del nombre de fol·licles antrals (AFC) segons el nombre de fol·licles > 3 mm a l'ovari per ona fol·licular.

	Alt AFC	Mitjà AFC	Baix AFC	Referència
Nombre de fol·licles >3 mm per ona fol·licular	≥ 25 fol·licles	16-24 fol·licles	≤15 fol·licles	7,53

Per altra banda, també es va estudiar més detingudament com el AFC afectava la fertilitat i vida productiva de les vaques. Per aquest motiu es van comparar paràmetres com la taxa de gestació a la primera inseminació i al final de la vida reproductiva, el nombre de cobriments necessaris per arribar a una gestació, i el nombre de lactacions productives entre els grups de vaques amb un AFC alt, mitjà o baix (Taula 5). La taxa de gestació a la primera inseminació artificial (IA) va ser més alta en vaques amb AFC mitjà. A més, la probabilitat de quedar-se prenyades era menor en vaques amb un AFC baix en comparació amb un AFC mitjà, sense diferències entre les vaques amb AFC baix vs. alt. La taxa de gestació al final de la vida reproductiva era superior en els individus amb un AFC alt, sent aquesta 3.34 vegades major que la dels animals amb un AFC baix. Per altra banda, les vaques amb un AFC baix varen rebre un nombre major de inseminacions durant la seva vida productiva en comparació amb els animals amb un AFC mitjà, però no es van detectar diferències entre el nombre de IA entre els grups d'un AFC alt vs. baix. Finalment, el nombre de lactacions va ser menor en els animals amb un baix AFC en comparació amb els que tenien un AFC alt ⁵³. Tot això ens conclou que les vaques amb un AFC ≤ 15 fol·licles tenen una menor productivitat i fertilitat en comparació amb els individus amb AFC > 15 fol·licles. A més, també es va observar que les vaques amb un AFC molt alt no eren necessàriament les millors reproductores, donat que la seva fertilitat no era òptima i tenien una vida reproductiva més curta en comparació amb aquelles amb un AFC mitjà. És possible que aquests individus amb un AFC ≥ 25 fol·licles tinguin una ovulació anormal, similar a les dones amb síndrome d'ovari poliquístic (PCOS), el qual també que afecta a la seva fertilitat ^{7,53}.

Taula 5. Valors de paràmetres reproductius segons el nombre de fol·licles antrals (AFC).

	Alt AFC	Mitjà AFC	Baix AFC	Referència
Taxa de gestació a la 1a IA	34.5%	47.1%	35.2%	53
Taxa de gestació al final de la vida reproductiva	91.2%	86.7%	83.2%	53
Cobriments	NE	Menors	Majors	53
Lactacions	2.6	NE	1.9	53

IA: inseminació artificial; NE: no estudiat

Estudis subseqüents, han establert la possible relació entre l'AMH i el AFC. En aquests, es va observar una correlació positiva entre la variació dels nivells d'AMH, el AFC i el nombre total de fol·licles de tots tipus (primordials, transitoris, primaris, secundaris i antrals) i oòcits a l'ovari. Es va analitzar aquesta relació en vedelles afirmant que les concentracions d'AMH durant les ones fol·liculars eren aproximadament 6 vegades majors en animals amb un AFC alt i el doble en animals amb un AFC mitjà, en comparació amb un AFC baix. Aquests resultats varen confirmar que els nivells d'AMH i la població fol·licular antral estan associades positivament i es poden utilitzar com marcadors predictius per estimar la reserva ovàrica també en animals de producció ⁷.

En l'espècie equina també s'ha analitzat la relació entre l'AMH, el AFC i la reserva ovàrica. Les eugues tenen una reserva ovàrica menor i més variable que altres espècies domèstiques, ja que el seu nombre de fol·licles primordials entre dos i quatre anys és aproximadament de 35000, sent aquest molt baix en comparació amb els de remugants (120000). Igualment, els canvis de fertilitat en les eugues estan associats amb una disminució de la reserva ovàrica, com la majoria de les espècies domèstiques, la qual es pot predir amb el AFC així com amb les concentracions sèriques d'AMH ⁵². Així mateix s'ha demostrat que existeix una correlació altament positiva entre l'AMH i el AFC. Més específicament, examinaren els nivells d'AMH i AFC a la pubertat (12-18 mesos) i als dos anys d'edat, observant que aquests valors es relacionaven i que tenien una utilitat per poder predir la fertilitat de les eugues ¹⁵. Per altra banda, com tant el nombre de fol·licles com les concentracions d'AMH són influenciades per l'edat, es va també observar que la correlació entre l'AMH i el AFC era superior en el cas d'eugues adultes (19-27 anys) i d'una edat mitjana (9-18 anys) que en eugues joves (3-8 anys) ³⁸.

En conclusió, tots aquests resultats ens indiquen que l'AMH està relacionada tant amb el nombre de fol·licles antrals com amb el nombre total de fol·licles a l'ovari, i en conjunt ens ajuda a estimar la reserva ovàrica. Per tant, tant l'AMH com el AFC es poden utilitzar com a bons marcadors per estimar el potencial reproductiu i l'estat de fertilitat de les diferents espècies animals, incloent per exemple l'estimació de la qualitat dels oòcits, la producció d'embrions, respostes a la superovulació i altres protocols estimulants, la taxa de gestació, etc. ⁵², creant així un interès diagnòstic per poder valorar millor l'estat de la vida productiva i possibilitat d'èxit en un animal en concret.

8.7. L'AMH en els animals de producció

En vaques les dinàmiques ovàriques són un punt important per identificar aquelles femelles amb una baixa fertilitat. Una disminució en la reserva ovàrica ens condueix a una reducció en l'eficiència reproductiva. Per tant, el mesurament de les concentracions d'AMH ens ajuda a predir aquesta reserva ovàrica per poder aconseguir millor eficàcia en el control reproductiu dels remugants i aconseguir una potencial productiu més elevat. Diferents autors varen observar que en vedelles una vida productiva més curta es correlacionava amb baixes concentracions circulants d'AMH, afirmant que la determinació de la concentració d'AMH en vedelles de llet de 11-15 mesos ens ajudava a predir la seva futura longevitat productiva ⁵⁴. Per tant, aquesta determinació dels nivells d'AMH, si s'aplica a la pràctica, podria ser un paràmetre reproductiu per determinar vedelles amb taxes de supervivència elevades i més eficients per la producció.

Per altra banda, altres estudis demostraren que les vaques de dos i tres parts tenien unes concentracions més elevades que les d'un sol part. Afirmant així que els animals amb baixa concentració d'AMH tenien menors taxes de gestació després de la primera IA i una major incidència a pèrdues de gestació i menor taxa de gestació en els següents parts ⁵⁵. També es va observar que l'AMH no tenia cap relació negativa amb l'aplicació d'una sincronització del cycle estral, ja que a la pràctica aquesta sincronització s'utilitza freqüentment en vaques per incrementar la fiabilitat a obtenir una fertilitat més elevada. Les concentracions d'AMH no mostraren diferències entre un cycle estral natural o sincronitzat, al contrari, aquests nivells estaven altament correlacionats ¹⁴. Els tractaments de superovulació en remugants es varen veure relacionats amb l'AMH, així com el potencial d'embrions, observant que, tant les vaques ⁵⁶ com les cabres ³⁵ i ovelles ⁵⁷, amb un AFC alt, així com una elevada concentració d'AMH, produïen majors nombres d'embrions transferibles. Arribem així a la conclusió que estimar els nivells d'AMH podria ser un mètode pràctic per predir la resposta a tractaments superovulatoris i la producció d'un nombre alt o baix d'embrions, millorant així la eficiència dels programes de transferència d'embrions en ovulacions múltiples. Concretament en petits remugants, també es va observar que les xaies prepuberals que varen quedar gestants en el primer aparellament tenien unes concentracions d'AMH majors en comparació amb aquells animals que no varen quedar gestants o varen necessitar un segon aparellament. Aquest fet ajudaria als ramaders a seleccionar més precisament animals amb una fertilitat millor al primer aparellament, i per tant, una millor eficiència reproductiva i productiva ⁵⁸.

8.7.1. Factors que impacten les concentracions circulants d'AMH en remugants

Està documentat que l'ambient durant el desenvolupament fetal i la vida neonatal dels animals té influències en algunes funcions fisiològiques i malalties a l'etapa adulta. Hi ha moltes circumstàncies que afecten a la vida fetal i al seu desenvolupament, com per exemple la nutrició maternal, alteracions endocrines, malalties, etc. S'ha estudiat com aquests factors afecten durant la gestació a les concentracions circulants d'AMH a la descendència tenint un impacte a llarg termini en la vida reproductiva d'aquests individus ⁷.

Nutrició materna durant la gestació

La nutrició materna es considera una de les causes més importants pel desenvolupament fetal. Diferents estudis han demostrat que una sobre o desnutrició en els animals gestants té impactes sobre les concentracions d'AMH, nombre de fol·licles i la reserva ovàrica a la descendència. En la majoria de casos, estudien com afecta una dieta restrictiva durant el primer trimestre de gestació, per coincidir amb el pic de cèl·lules germinals als ovaris fetals ⁷. Mossa *et al.* (2013) aplicaren una dieta restrictiva al principi de gestació i observaren que les vedelles descendents de les vaques alimentades restrictivament tenien una reserva ovàrica disminuïda, ja que les concentracions d'AMH eren menors durant els 4 mesos i 1.8 anys d'edat, l'AFC també era menor entre la setmana 7 i 1.6 anys d'edat i hi havia un augment en les concentracions de FSH, característica de les vaques amb un AFC baix. No es van observar diferències significatives entre el pes al naixement, l'índex de creixement i l'edat de pubertat d'aquestes vedelles en comparació a la descendència de mares controls alimentades sense restricció.

Altres estudis examinaren que una alimentació alta en proteïnes en vaques de carn al segon trimestre de gestació disminuïa el AFC de la descendència, però en aquest cas no es mesuraren les concentracions d'AMH ⁵⁹. Per altra banda, es va observar que una sobrenutrició materna en les vaques disminuïa el desenvolupament fol·licular fetal ⁶⁰. Tots aquests estudis, igualment utilitzin diferents models experimentals i diferents tipus de dieta, ens conclouen que la producció d'AMH de la descendència es veu afectada pels impactes d'alimentació exigits durant el desenvolupament fetal.

Inflamacions mamàries

Entre les malalties més importants que afecten les vaques de llet està la mamitis, una inflamació de les glàndules mamàries que genera dolor, molèstia i estrès als animals, i com a conseqüència una disminució de la producció ⁶¹. Aquesta malaltia també afecta de manera

important el desenvolupament fetal i el creixement de la descendència. Per aquest motiu, també s'ha estudiat quins efectes potencials té aquesta inflamació mamària de les mares durant la gestació en el desenvolupament i funcions fetals.

Es va demostrar que les vaques amb un recompte alt de cèl·lules somàtiques, les quals són un índex de malaltia inflamatòria crònica, la seva descendència tenia concentracions d'AMH reduïdes en la fase adulta ⁶². Aquest fet ens afirma que una mastitis persistent en vaques durant la gestació no sols afecta la producció de llet, si no que a llarg termini, té un impacte negatiu en el potencial reproductiu de la descendència ⁷.

Alteracions endocrines

Els components endocrins naturals i artificials, així com els productes químics ambientals, poden interferir amb les accions fisiològiques de les hormones i amb la reproducció i sanitat de la descendència. En ovelles, una exposició prenatal de testosterona amb excés dels dies 30 al 90 de gestació disminuïa els nivells d'expressió de la proteïna d'AMH a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles preantrals, però augmentava l'expressió d'AMH als fol·licles antrals. Això indica que l'exposició prenatal a la de testosterona està associada a canvis en l'expressió d'AMH als fol·licles pre-antrals i antrals d'ovaris d'ovelles adultes, suggerint que la testosterona té un paper important en la regulació de la reserva ovàrica ⁶³.

Raça

En vaques, diferents estudis han comparat les concentracions d'AMH i el nombre de fol·licles entre vaques de llet i vaques de carn. Observen que aquestes concentracions d'AMH, el nombre de fol·licles i la mida dels ovaris (estudiats per ultrasonografia) són menors en les vaques de llet en comparació amb les vaques de carn (Figura 11) ⁷. Altres autors també conclouen que vedelles de carn (Angus x Charolais) tenen majors concentracions d'AMH que les vedelles destinades a la producció de llet (Holstein x Jersey) ¹⁴.

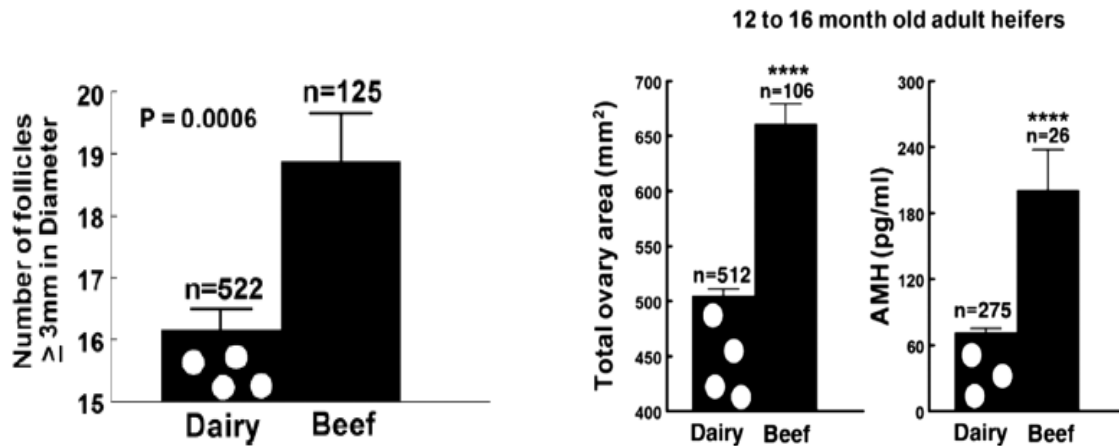


Figura 11. Comparació del nombre de fol·licles ≥ 3 mm, àrea ovàrica total i concentració d'hormona antimülleriana (AMH) entre vaques de carn i vaques de llet (Mossa *et al.* 2017).

Altres estudis també han realitzat comparacions entre les diferents races de vedelles lleteres i els resultats varien entre estudis. Mentre en un estudi no es varen observar diferències significatives entre les vedelles de la raça Holstein i raça Jersey ¹⁴, altres van observar concentracions més altes d'AMH en les vedelles de la raça Jersey, que les d'un creuament Jersey x Holstein i finalment, la raça Holstein ⁶⁴. Per tant, com a conclusió podem afirmar que la concentració d'AMH varia entre alguns grups genètics i entre races de vaques de llet i que és major en vedelles càrniques.

Tots aquests resultats ens conclouen que les concentracions d'AMH a la descendència es veuen afectades per alguns factors durant la gestació i, per tant, també hi haurà un impacte reproductiu en la vida adulta d'aquestes vedelles. Per aquest motiu, el mesurament de les concentracions sèriques d'AMH en el bestiar poder tenir un interès clínic i productiu per poder seleccionar aquells animals amb una major supervivència, millor fertilitat i obtenir una eficiència productiva pels ramaders.

8.8. Aplicacions clíniques de l'AMH en èquids

En eugues, com s'ha esmentat abans, la fertilitat i les concentracions d'AMH estan relacionades. Sembla ser que la fertilitat disminueix més ràpidament al llarg de la vida d'aquelles eugues amb uns nivells d'AMH baixos amb aquelles que tenen concentracions sèriques més altes⁵². A part de poder estimar la fertilitat amb l'AMH, s'ha observat que en èquids el mesurament de les concentracions sèriques d'AMH ens proporcionen un interès clínic elevat, com per exemple pel diagnòstic dels tumors de les cèl·lules de la granulosa (GCT) i poder diferenciar eugues esterilitzades d'aquelles que no ho estan.

El GCT és el tumor més comú en l'ovari equí. Aquest tumor està associat a canvis en la ciclicitat i comportament en els eugues afectades. Típicament, l'ovari afectat augmenta de mida en palpació i a nivell ultrasonogràfic, es poden detectar canvis que no són patonòmics. A més, en palpació sovint no s'aprecia la fossa ovàrica quan hi ha un GCT. El diagnòstic es basa en compilar les troballes clíniques amb un anàlisi endocrí, que inclou la mesura dels nivells de progesterona, testosterona i inhibina. Els resultats més típics compatibles amb un GCT són concentracions baixes de progesterona al mateix temps que un augment de les concentracions d'inhibina i/o testosterona⁶⁵. Les concentracions d'inhibina augmentaren en un 90% d'eugues amb GCT i la testosterona incrementava aproximadament en un 50-60% dels casos⁶⁶. El problema d'aquests dos marcadors endocrins és que també augmenten durant la gestació i una elevació dels nivells de testosterona en eugues no gestants també pot estar associat a un augment de l'activitat de la glàndula adrenal⁶⁵. S'ha estudiat que l'AMH és també un biomarcador important per diagnosticar el GCT equí^{16,65,66}. Per una banda, es va observar que les eugues amb GCT tenien concentracions d'AMH més elevades en comparació amb eugues cícliques, gestants o ovariectomitzades i que també s'observava aquest augment dels nivells d'AMH a nivell local, al líquid dels GCT de l'ovari. Per altra banda, es va demostrar que si s'extreu el tumor, les concentracions d'AMH disminuïen un 50% a les 48 hores de l'extirpació, indicant que l'augment dels nivells d'AMH provenen concretament del tumor a l'ovari. En histopatologia immunoreactiva i RT PCR l'expressió d'ARNm de l'AMH, així com la del seu AMHRII, es trobaven sobre regulats al GCT i es va observar que l'expressió d'ARNm de l'AMH era majors en les cèl·lules de la granulosa tumorals en comparació amb cèl·lules de la granulosa normals¹⁶.

Per tant, l'AMH es considera un millor marcador endocrí per identificar eugues amb GCT. En aquest sentit, la mesura de les concentracions sèriques d'AMH té una major sensibilitat (98%) en comparació amb la inhibina (80%), testosterona (48%) i les dues combinades (84%) per la detecció clínica de GCT. A part, en eugues gestants les concentracions d'AMH no es veien

afectades i en canvi, com s'ha citat abans, la testosterona i inhibina augmenten durant aquest període. A més a més, els nivells circulants de testosterona i inhibina en eugues no gestants també es veien influenciats segons l'etapa del cicle reproductiu ⁶⁵. Tots aquests resultats ens afirmen que l'AMH s'expressa als GCT, per tant, mesurant les concentracions sèriques d'AMH podem diagnosticar aquests tumors d'una manera estable i amb una alta sensibilitat.

Com que l'AMH és una proteïna específica de l'ovari, es va observar que les seves concentracions perifèriques també podien ser de utilitat per diferenciar eugues ovariectomitzades i no ovariectomitzades, on les primeres tenien concentracions circulants d'AMH indetectables ⁶⁵. En eugues no esterilitzades d'una avançada edat amb un nombre baix de fol·licles antrals també es varen obtenir nivells d'AMH baixos o indetectables, per tant, s'haurien d'utilitzar mètodes en conjunt per poder diagnosticar una euga esterilitzada, com per exemple l'examinació per palpació i ultrasonografia transrectal ³⁸. Al contrari, en petits animals es va demostrar que les concentracions d'AMH tenien una sensibilitat i especificitat d'aproximadament un 94% per diferenciar gosses esterilitzades d'aquelles que no ho estan. Igualment en eugues aquestes concentracions tenen un valor elevat per diferenciar animals esterilitzats i no esterilitzats ⁶⁵.

8.9. Aplicacions clíniques de l'AMH en petits animals

En els animals de companyia l'AMH té un paper important, així com ens els animals de producció, com a marcador de la reserva ovàrica. També és útil per predir la resposta a diferents protocols d'estimulació ovàrica, així com millorar la reproducció i genètica d'aquests animals ⁶⁷. Tant en l'espècie canina com felina s'ha estudiat quin interès clínic ens proporciona mesurar les concentracions sèriques d'AMH i s'ha confirmat que l'AMH a la pràctica es pot utilitzar per diagnosticar teixit restant a l'ovari, com a biomarcador dels GCT i estimar, si desconexim l'edat dels animals, en quin estat puberal es troben.

El síndrome d'ovari romanent (ORS) apareix quan alguna part de l'ovari no s'ha extret bé durant el procés quirúrgic d'esterilització ⁶⁸. Per tant, la principal causa és un error durant la tècnica quirúrgica, encara que també s'ha especulat la presència de teixit ovàric ectòpic o la revascularització de teixit ovari que ha caigut a la cavitat abdominal durant la cirurgia. Els principals signes que es visualitzen en gosses i gates són similars a les fases de proestre i estre, com descàrrega vaginal sanguinolenta, inflamació de la vulva i canvis de comportament. Per

diagnosticar el ORS és important una bona anamnesis i signes clínics, les tècniques més utilitzades són una citologia vaginal, exploració amb ultrasonografia o laparotomia, estimulacions hormonals i el mesurament dels nivells de la LH ⁶⁹. Alguns d'aquests mètodes poden ser complicats, amb alt cost i temps. Per aquest motiu, es va estudiar que la determinació de l'AMH en sèrum podia ser un mètode simple i fiable per diagnosticar el ORS ⁷⁰.

Un punt important que inclou l'AMH com un mètode per diagnosticar el ORS és que aquesta concentració d'AMH en sèrum és independent de la fase del cicle estral ^{70,71}. Per altra banda, la majoria d'estudis han comparat les concentracions d'AMH entre animals esterilitzats, animals amb ORS i animals no esterilitzats, observant que els nivells d'AMH són menors en els individus ovariectomitzats ^{17,70,72}. Entrant en detall, estudiaren les diferents concentracions d'AMH entre gosses prepuberals (PP), no esterilitzades (OVH-), ovariectomitzades (OVH+) i amb ORS, observant que hi havia diferències significatives entre els grups OVH- i OVH+ i els grups OVH+ i ORS, sent els nivells més baixos en les gosses esterilitzades (Figura 12). Els valors d'AMH de tall en aquest estudi varen ser de 0.28 ± 0.09 ng/mL (OVH+), mentre la mitja dels nivells d'AMH de les gosses no esterilitzades i amb ORS va ser de 4.26 ± 0.082 i 4.40 ± 1.09 ng/mL respectivament ⁷⁰.

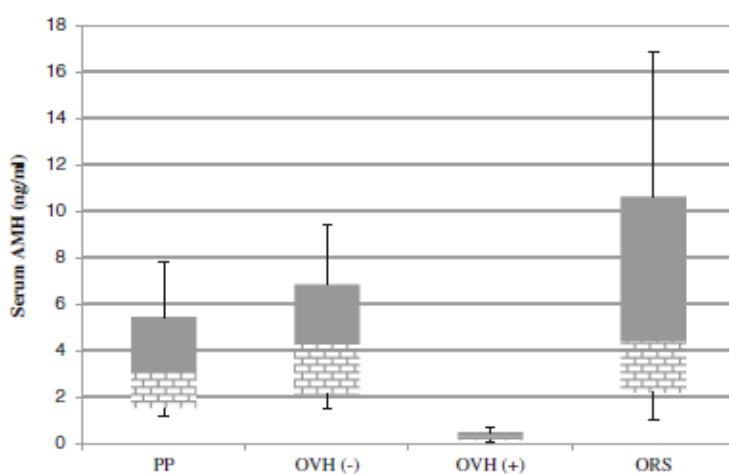


Figura 12. Concentracions d'hormona antimülleriana (AMH) sèriques en gosses prepuberals (PP), no esterilitzades (OVH-), esterilitzades (OVH+) i amb síndrome d'ovari romanent (ORS) (Turna Yilmaz *et al.* 2015).

Altres autors expressen els valors mínims d'AMH ≤ 0.09 ng/mL (gosses esterilitzades), observant que els valors en les gosses no esterilitzades són entre 0.10 – 0.41 ng/mL i els animals amb ORS tenien nivells d'AMH dins d'aquest rang (0.185 ng/mL). Estudiaren que el test d'AMH tenia un 93.9% de sensibilitat (probabilitat correcte de identificar gossos no esterilitzats) i un

93.8% d'especificitat (probabilitat correcta de identificar gossos esterilitzats) ¹⁷. Altres valors de tall d'AMH eren de 0.1 ng/mL amb una especificitat de 98% ⁷¹.

Taula 6. Diferents valors de les concentracions d'hormona antimülleriana (AMH) sèriques publicades per diferents autors en gosses i gates.

	Valors de tall d'AMH (ng/mL)	Valors d'AMH en gosses no esterilitzades (ng/mL)	Valors d'AMH en gosses amb ORS (ng/mL)	Ref.
GOSSES	0.20	3.9	NE	72
	0.1	0.1 – 2.2	NE	71
	0.09	0.10 – 0.41	0.185	17
	0.28	4.26	4.40	70
GATES	0.14	1.3 – 19	NE	73
	NE	0.49 – 23	NE	74

NE: no estudiat; Ref: referència

En la Taula 6 podem observar les concentracions d'AMH publicades per diferents autors com a normals per gosses i gates no esterilitzades, esterilitzades i, si aplica, amb ORS. En gosses s'observa una gran variabilitat entre els estudis, contemplant que dos valors són més baixos que els altres. Aquestes desigualtats possiblement tinguin relació amb el tipus d'assaig utilitzat en cada estudi diferent, ja que alguns autors mesuraren les concentracions d'AMH en gosses amb un assaig ELISA basat amb l'AMH humana ^{17,71}, mentre que altres utilitzaren un assaig ELISA específic per l'espècie canina ^{70,72}, sent en aquests dos casos on s'observen les concentracions més elevades d'AMH ⁷⁵. En gates també es va estudiar el valor de tall d'AMH per animals esterilitzats, sent aquest de 0.14 ng/mL amb una sensibilitat i especificitat del 100% ⁷³, i es va afirmar que els nivells d'AMH són útils per diagnosticar teixit ovàric. S'han observat dos intervals en quant a les concentracions sèriques en gates no esterilitzades, sent aquests entre 1.3 – 19 ng/mL ⁷³ i 0.49 – 23 ng/mL ⁷⁴, respectivament, valors més elevats que els publicats en gosses ¹⁷. Tots aquests resultats ens demostren que un simple assaig del sèrum d'AMH ens ajuda a detectar teixit ovàric en gosses i gates. Els nivells sèrics d'AMH seran menors en el cas dels individus esterilitzats i majors en animals no esterilitzats i amb ORS. Això ens indica que aquests

valors tenen un interès clínic per diferenciar gosses i gates esterilitzades d'aquelles que no ho estan i pel diagnòstic d'animals amb ORS.

Un altra utilitat clínica que pot tenir l'AMH en animals de companyia és el diagnòstic de GCT, així com a l'espècia equina. Aquest és un dels tumors més típics en l'ovari de la gossa ⁷⁶ i quasi la meitat de les neoplàsies ovàriques en gats ⁷⁷. El GCT es pot observar en casos d'animals no esterilitzats així com individus amb ORS ⁷⁶. S'han realitzat estudis comparant les concentracions d'AMH sèriques en gosses amb diferents patologies ovàriques, entre les quals estudiaren els quists ovàrics, adenomes, carcinomes, GCT i altres masses. Observaren que els nivells d'AMH són molt majors en els casos de gosses amb GCT (≥ 0.99 ng/mL) en comparació amb les altres patologies, conclouent que aquestes concentracions sèriques d'AMH eren excel·lents pel diagnòstic d'aquest tumor. Per tant, es va establir un límit de 0.99 ng/mL d'AMH amb una sensibilitat per detectar GCT del 100% i una especificitat de 94.4%, i afirmaren que hi ha una relació entre la mida d'aquests tumors i les concentracions d'AMH, sent majors els nivells d'AMH com més gran és el tumor ⁷⁸. En el cas dels gats, es va descriure que el test d'AMH és diagnòstic del GCT felí i també ens pot ajudar a monitoritzar la recurrència d'aquests tumors ⁷⁷.

Alguns estudis també han relacionat els intervals de referència per l'AMH segons la mida de les gosses. Realitzaren una classificació en quatre grups: mida petita (<12 kg), mitja (13-25 kg), gran (26-40 kg) i gegant (>40 kg). Els diferents intervals es presenten en la Taula 7, observant que existien diferències entre la mida gegant i les altres tres, mentre que entre la mida petita, mitja i gran no hi havia diferències significatives. També analitzaren si els valors d'AMH afectaven al nombre de cadells en la camada, afirmant que les races gegants tenien un nombre menor de cries i que com més elevada era la concentració d'AMH sèrica de la gossa més nombre de cadells tenia la camada ⁷⁵. Per tant, aquests resultats indiquen que les races de major pes tenen menors concentracions d'AMH ^{71,75} i les races petites tenen una correlació positiva amb els nivells d'AMH, per cada 1 ng/mL d'augment de les concentracions d'AMH s'obtenia un 0.3 de cries per camada ⁷⁵. Aquestes troballes poden crear un interès per aplicar a la pràctica en casos de programes de cria en gossos. A més, tot això ens indica que en animals de companyia, així com en els animals de producció, és possible el mesurament d'AMH per identificar el seu potencial reproductiu, facilitar el procés de selecció, augmentar l'eficiència de cria i obtenir un millor potencial genètic.

Taula 7. Intervals de referència de l'hormona antimülleriana (AMH) (ng/mL) segons la mida de les gosses.

Classificació segons la mida	Interval de referència d'AMH (ng/mL)	Referència
Petita (<12 kg)	5.6 – 24.2 ^a	75
Mitja (13-25 kg)	4.3 – 23.7 ^a	75
Gran (26-40 kg)	4.3 – 21 ^a	75
Gegant (>40 kg)	1.75 – 15.6 ^b	75

^{a,b}: Les lletres diferents impliquen diferències significatives entre els grups.

En gates, on s'han fet molt estudis de fertilització in vitro (FIV) també es va estudiar la relació entre els nivells d'AMH i la capacitat de maduració in vitro dels oòcits. Es va demostrar que la probabilitat de maduració dels oòcits augmentava significativament quan l'AMH disminuïa, ja que els oòcits de les gates amb un alt nivell d'AMH tenien menys capacitat de maduració. Això va indicar que l'AMH es podria utilitzar com a marcador per indicar si una gata ha arribat a la pubertat, sobretot en animals de carrer que no es sap l'edat; i per predir si els oòcits, col·lectats després de l'ovariectomia, tindrien un correcte potencial per maduració in vitro ⁷⁴. Es necessita més recerca per verificar aquests resultats, ja que hi ha pocs estudis que parlin de l'ús de l'AMH com a biomarcador per avaluar les condicions de maduració in vitro dels oòcits de gates.

9. Conclusions

En aquesta revisió bibliogràfica s'ha presentat com s'expressa l'AMH i quin interès clínic podem aplicar mesurant les concentracions sèriques d'AMH en les diferents espècies domèstiques. S'ha observat que l'AMH té la seva màxima expressió, en la majoria de les espècies, a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles pre-antrals grans i antrals petits. Aquesta expressió va disminuint gradualment durant el desenvolupament fol·licular, sent menor en els fol·licles antrals grans, pre-ovulatoris i nul·la en els fol·licles atrètics. En porcí, s'ha estudiat que l'AMH també s'expressa a les cèl·lules de la teca dels fol·licles pre-ovulatoris i inclús al cos luti. Per tant, el porcí és, de moment, l'única espècie on l'AMH no s'expressa exclusivament a les cèl·lules de la granulosa.

L'AMH participa en la fol·liculogènesis inhibint el reclutament dels fol·licles primordials i inhibint l'estimulació de la FSH als fol·licles en creixement. Concretament, l'AMH actua en el reclutament inicial frenant la transició del fol·licle primordial a primari, disminuint així el nombre de fol·licles primordials reclutats. Per altra banda, l'AMH actua també en el reclutament cíclic inhibint la sensibilitat dels fol·licles pre-antrals grans i antrals petits a la FSH, provocant així que un menor nombre de fol·licles es desenvolupin fins a la fase pre-ovulatòria. Tot això ens conclou que l'AMH té accions a l'ovari per aconseguir un desenvolupament fol·licular òptim, ja que modula que no hi hagi un creixement fol·licular prematur i un nombre excessiu de fol·licles, així com el nombre de fol·licles que arribaran a la fase pre-ovulatòria. Així doncs, un funció primordial és la d'evitar un esgotament prematur de la reserva fol·licular ovàrica.

És possible detectar les concentracions sèriques d'AMH en les diferents espècies. Aquestes concentracions, juntament amb la determinació del AFC, ens poden ser útils per estimar la reserva ovàrica, i poder millorar l'eficiència reproductiva dels individus. En el cas dels animals de producció, l'AMH és de gran interès per millorar la fertilitat i, en definitiva, la producció d'aquests animals. Estudis han demostrat que les concentracions d'AMH es correlacionen amb la futura longevitat de les vedelles, així com amb la taxa de gestació, la resposta als tractaments de superovulació i la producció d'embrions en remugants. L'objectiu final de tots els ramaders és obtenir la millor eficiència productiva, per tant, a la pràctica, es podria mesurar les concentracions sèriques d'AMH en remugants per seleccionar animals amb millor potencial de paràmetres reproductius, que són un dels punts claus per augmentar aquesta productivitat.

En èquids i animals de companyia, l'AMH proporciona un interès clínic per diagnosticar patologies. És possible utilitzar l'AMH com a marcador endocrí per diagnosticar GCTs en aquestes espècies, així com detectar possible romanents ovàrics després de l'esterilització. Mesurar les concentracions sèriques d'AMH ens pot diferenciar animals esterilitzats d'aquells que no ho estan i, sent molt important a nivell de control poblacional especialment en animals d'història desconeguda. Diferents autors han establert valors de tall per l'AMH en gosses i gates, els quals es podrien utilitzar com a referència per detectar animals esterilitzats.

El mesurament de les concentracions sèriques d'AMH en les diferents espècies pot arribar a ser un paràmetre reproductiu important en un futur. Es necessita més recerca per aplicar-ho a la pràctica, no obstant això, el fet de que l'AMH tingui funcions importants en el desenvolupament fol·licular implica que, a la llarga, podria ser un excel·lent marcador endocrí per diagnosticar patologies reproductives i millorar l'eficiència reproductiva de les espècies domèstiques.

10. Bibliografía

1. Kemp, B. *et al.* Presence of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. *PLoS One* **13**, e0197894 (2018).
2. Rey, R. *et al.* Actualizaciones 1. (2013).
3. Durlinger, A. L. L. *et al.* Anti-Mullerian Hormone in the Mouse Ovary. *Endocrinology* **140**, 5789–5796 (1999).
4. Bontoux, M. *et al.* Anti-Mullerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biol. Reprod.* **80**, 50–59 (2008).
5. Gruijters, M. J. G., Visser, J. A., Durlinger, A. L. L. & Themmen, A. P. N. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **211**, 85–90 (2003).
6. Visser, J. A., Jong, F. H. De, Laven, J. S. E. & Themmen, A. P. N. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. 1–9 (2003). doi:10.1530/rep.1.00529
7. Weber-Nielsen, M. *et al.* Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction* **154**, R1–R11 (2017).
8. Recabarren, M. *et al.* Morfometría ovárica y expresión del ARN mensajero de hormona antimülleriana (AMH), receptor de FSH (FSHR) y factor nuclear kappa B (NFkB) en folículos en crecimiento de borregas expuestas prenatalmente a testosterona. *Arch. Med. Vet.* **46**, 13–21 (2014).
9. Arduaga, I. *et al.* Hormona Antimülleriana (AMH) como predictor del potencial reproductivo en bovinos(Brangus). *11 Simp. Int. Reprod. Anim.* 1–4 (2015).
10. Themmen, A. P. N. *et al.* Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary. *Endocrinology* **142**, 4891–4899 (2014).
11. Capecce, E. *et al.* La hormona antimülleriana como marcador de función ovárica. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.* **53**, 106–113 (2016).
12. Kevenaar, M. E. *et al.* Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* **147**, 3228–3234 (2006).
13. Laine, A., Jarrier, P., Poulin, N., Cognie, J. & Monniaux, D. embryo production in the goat.

(2010). doi:10.1530/REP-11-0211

14. Pfeiffer, K. E., Jury, L. J. & Larson, J. E. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.* **46**, 58–64 (2014).
15. Scarlet, D. *et al.* Anti-Müllerian hormone profiling in prepubertal horses and its relationship with gonadal function. *Theriogenology* **117**, 72–77 (2018).
16. Almeida, J. *et al.* Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. *Theriogenology* **76**, 1393–1403 (2011).
17. Place, N. J. *et al.* Measurement of serum anti-müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **23**, 524–527 (2011).
18. Holst, B. S. Diagnostic possibilities from a serum sample—Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Müllerian hormone. *Reprod. Domest. Anim.* **52**, 303–309 (2017).
19. Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martínez, A. & Madrid-Marina, V. Factor de crecimiento transformante y cáncer. *Salud Publica Mex.* **43**, (2001).
20. Gálvez-Gastélum, F. J., Sandoval-Rodríguez, A. S. & Armendáriz-Borunda, J. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. *Salud Publica Mex.* **46**, 341–350 (2004).
21. Durlinger, A. L. L., Visser, J. A. & Themmen, A. P. N. Durlinger, 2002 Regulation of ovarian function the role of. 601–609 (2002).
22. Monniaux, D. *et al.* Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* **25**, 1–16 (2013).
23. Durlinger, A. L. L., Visser, J. A. & Themmen, A. P. N. Regulation of ovarian function: The role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* **124**, 601–609 (2002).
24. Ilha, G. F. *et al.* Regulation of Anti-Müllerian Hormone and Its Receptor Expression around Follicle Deviation in Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **51**, 188–194 (2016).
25. Liang, A. *et al.* Anti-Müllerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology* **86**, 963–970 (2016).

26. Visser, J. A. & Themmen, A. P. N. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **234**, 81–86 (2005).
27. Rey, R. DIFERENCIACIÓN SEXUAL EMBRIO-FETAL: DE LAS MOLÉCULAS A LA ANATOMIA. *Rev. Chil. anatomía* **19**, 75–82 (2001).
28. Weenen, C. *et al.* Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 77–83 (2004).
29. Modi, D., Bhartiya, D. & Puri, C. Developmental expression and cellular distribution of Müllerian inhibiting substance in the primate ovary. *Reproduction* **132**, 443–453 (2006).
30. Hoogerbrugge, J. W. *et al.* Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* **136**, (2014).
31. DONAHOE, P. K. *et al.* Mullerian Inhibiting Substance in the Adult Rat Ovary During Various Stages of the Estrous Cycle*. *Endocrinology* **125**, 1060–1066 (2009).
32. Estienne, A. *et al.* Anti-müllerian hormone regulation by the bone morphogenetic proteins in the sheep ovary: Deciphering a direct regulatory pathway. *Endocrinology* **156**, 301–313 (2015).
33. Narkwichean, A. *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone on in vivo ovine follicular development. *Hum. Reprod.* **29**, 146–154 (2014).
34. Campbell, B. K., Clinton, M. & Webb, R. The role of anti-müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (Sheep). *Endocrinology* **153**, 4533–4543 (2012).
35. Monniaux, D. *et al.* Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* **142**, 845–854 (2011).
36. Takahashi, M., Hayashi, M., Manganaro, T. F. & Donahoe, P. K. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol. Reprod.* **35**, 447–53 (1986).
37. Yang, M. Y., Cushman, R. A. & Fortune, J. E. Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *Mol.*

- Hum. Reprod.* **23**, 282–291 (2017).
38. Claes, A. *et al.* The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. *Equine Vet. J.* **47**, 537–541 (2015).
 39. Ball, B. A. *et al.* Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in equine granulosa-cell tumors and in normal equine ovaries. *Theriogenology* **70**, 968–977 (2008).
 40. Almeida, F. R. C. L. *et al.* Presence of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. *PLoS One* **13**, 1–18 (2018).
 41. Espinoza, J., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J. & Aréchiga, C. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia* **32**, 93–99 (2007).
 42. Hernández, J. *Fisiología clínica de la reproducción de bovinos.* (2012).
 43. Chuaire, L. & Sánchez, M. C. Células germinativas primordiales femeninas: Origen y migración hacia los primordios gonadales. *Colomb. Med.* **33**, 171–178 (2002).
 44. Vicente Antón, J. S. *et al.* *Fundamentos y técnicas de la reproducción.* (2012).
 45. Castillo Barón, L. V. Factores de crecimiento relacionados con la activación de folículos primordiales en bovinos. *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.* **2**, 43 (2017).
 46. Nilsson, E., Rogers, N. & Skinner, M. K. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction* **134**, 209–221 (2007).
 47. Ben-Haroush, A. *et al.* Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fertil. Steril.* **84**, 1257–1268 (2005).
 48. Parrott, J. A. & Skinner, M. K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: Effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 55–64 (2000).
 49. Kezele, P., Nilsson, E. E. & Skinner, M. K. Keratinocyte Growth Factor Acts as a Mesenchymal Factor That Promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition. *Biol. Reprod.* **73**, 967–973 (2005).
 50. Rico, C. *et al.* Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels¹. *Biol. Reprod.* **84**, 560–571 (2011).
 51. van Helden, J., Evliyaoglu, O. & Weiskirchen, R. Has GnRH a direct role in AMH regulation?

Clin. Endocrinol. (Oxf). 0–2 (2019). doi:10.1111/cen.13967

52. Ball, B. A. *et al.* Relationship between anti-Müllerian hormone and fertility in the mare. *Theriogenology* **125**, 335–341 (2019).
53. Mossa, F. & Ireland, J. J. Physiology and endocrinology symposium: Anti-Müllerian hormone: A biomarker for the ovarian reserve, ovarian function, and fertility in dairy cows. *J. Anim. Sci.* **97**, 1446–1455 (2019).
54. Jimenez-Krassel, F. *et al.* Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci.* **98**, 3036–3045 (2015).
55. Ribeiro, E. S. *et al.* Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J. Dairy Sci.* **97**, 6888–6900 (2014).
56. Souza, A. H. *et al.* Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* **98**, 169–178 (2014).
57. Pinto, P. H. N. *et al.* Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests. *Theriogenology* **113**, 146–152 (2018).
58. Lahoz, B., Alabart, J. L., Monniaux, D., Mermillod, P. & Folch, J. Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Vet. Res.* **8**, (2012).
59. Sullivan, T. M., Micke, G. C., Greer, R. M. & Perry, V. E. A. Dietary manipulation of *Bos indicus* × heifers during gestation affects the prepubertal reproductive development of their bull calves. *Anim. Reprod. Sci.* **118**, 131–139 (2010).
60. Weller, M. M. D. C. A. *et al.* Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *J. Dairy Sci.* **99**, 3056–3071 (2016).
61. Andrade, M., Espinoza, M. & Rojas, A. 63653574004. (2017).
62. Ireland, J. J. A., Smith, G. W. B., Scheetz, D. A. & Folger, J. K. A. Ireland, 2011 Does size matter in females An overview of the impact of. 1–14 (2011).
63. Gris, D. Public Access NIH Public Access. **185**, 974–981 (2013).
64. Greco, L. F. *et al.* Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J. Dairy Sci.* **97**, 6888–6900 (2014).

65. Claes, A. N. J. & Ball, B. A. Biological Functions and Clinical Applications of Anti-Müllerian Hormone in Stallions and Mares. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* **32**, 451–464 (2016).
66. McCue, P. M., Roser, J. F., Munro, C. J., Liu, I. K. M. & Lasley, B. L. Granulosa Cell Tumors of the Equine Ovary. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* **22**, 799–817 (2006).
67. Nagashima, J. B., Hansen, B. S., Songsasen, N., Travis, A. J. & Place, N. J. Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition. *Reprod. Domest. Anim.* **51**, 158–164 (2016).
68. Howe, L. M. Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* **66**, 500–509 (2006).
69. DeNardo, G., Becker, K., Brown, N. & Dobbins, S. Ovarian remnant syndrome: revascularization of free-floating ovarian tissue in the feline abdominal cavity. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **37**, 290–296 (2014).
70. Turna Yilmaz, Ö., Toydemir, T. S. F., Kirsan, I., Gunay Ucmak, Z. & Caliskan Karacam, E. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches. *Vet. Res. Commun.* **39**, 159–162 (2015).
71. Alm, H. & Holst, B. S. Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology* **106**, 15–20 (2018).
72. Themmen, A. P. N. *et al.* The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology* **86**, 1467–1474 (2015).
73. Axné, E. & Ström Holst, B. Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. *Theriogenology* **83**, 817–821 (2015).
74. Snoeck, F., Sarrazin, S., Wydooghe, E. & Van Soom, A. Age and anti-Müllerian hormone levels predict the success of in vitro maturation of cat oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* **52**, 98–102 (2017).
75. Hollinshead, F. K., Walker, C. & Hanlon, D. W. Determination of the normal reference interval for anti-Müllerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size. *Reprod. Domest. Anim.* **52**, 35–40 (2017).
76. Buijtels, J. *The pituitary-gonadal axis in healthy female dogs and bitches with gynecological disorders.* (2011).

77. Heaps, L. A. *et al.* Serum anti-Müllerian hormone concentrations before and after treatment of an ovarian granulosa cell tumour in a cat. *J. Feline Med. Surg. Open Reports* **3**, 205511691772270 (2017).
78. Walter, B. *et al.* Anti-Muellerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed ovarian tumours and cysts. *Reprod. Domest. Anim.* **53**, 784–792 (2018).