

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“EFEITO DA OVARIECTOMIA E IDADE SOBRE AS CONCENTRAÇÕES
SÉRICAS DE HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO EM ÉGUAS”

RENATA CRISTINA ULIANI

Botucatu/SP
Novembro 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“EFEITO DA OVARIECTOMIA E IDADE SOBRE AS CONCENTRAÇÕES
SÉRICAS DE HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO EM ÉGUAS”

RENATA CRISTINA ULIANI

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Co-Orientador: Alan James Conley

Botucatu/SP

Novembro/ 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Uliani, Renata Cristina.

Efeito da ovariectomia e idade sobre as concentrações séricas de hormônio Anti-Mülleriano em éguas / Renata Cristina Uliani. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Coorientador: Alan James Conley

Capes: 50504002

1. Égua - Reprodução. 2. Ovariectomia. 3. Hormônio Antimülleriano. 4. Células da Granulosa. 5. Folículo ovariano.

Palavras-chave: Célula da granulosa; Folículo ovariano; Folículo pré-antral; População folicular; Reserva ovariana.

Nome do autor: Renata Cristina Uliani

Título: Efeito da ovariectomia e idade sobre as concentrações séricas de hormônio
Anti-Mülleriano em éguas

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga
Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Cezinande de Meira
Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva
Membro

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dra. Claudia Barbosa Fernandes
Membro

Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo

Data da Defesa: 22 de Novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que isso tudo fosse possível.

Aos animais, os que mais colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESP pelo apoio e incentivo a pesquisa. Para este trabalho foram destinados minha bolsa de doutorado (Processo 2014/13191-1) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (Processo 2015/01113-9), além do auxílio a pesquisa (Processo 2014/13777-6), essencial para sua execução.

A CAPES pela bolsa de doutorado no início desta jornada.

A toda a FMVZ pelos 13 anos de ensinamentos, aprendizado, carinho. Sinto-me em casa.

Ao professor Marco Antonio Alvarenga, orientador, amigo, conselheiro, pela ajuda e força em todos os momentos.

Ao professor Alan James Conley, co-orientador deste projeto, pelo apoio e disposição em ajudar em todas as etapas. Por me receber em seu laboratório, abraçar minhas ideias e ser minha família na Califórnia.

Aos integrantes da banca examinadora, professor Dr. Cezinande de Meira, Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva e Dra. Claudia Barbosa Fernandes, pela dedicação, atenção e contribuição.

Aos suplentes da banca examinadora, Dra. Camila Louise Ackerman e Dr. Rubens Paes Arruda pela disposição em ajudar.

A todos os veterinários e proprietários dos diversos haras que permitiram a amostragem dos animais. A todos os funcionários que me ajudaram na colheita de mais de 1.000 animais e fizeram dos dias pesados, dias divertidos.

Aos pós graduandos que foram minha equipe durante o experimento. Grandes amigos que pude contar em cada momento. Infinitos agradecimentos. Parabéns pelo espírito de equipe e pelos ótimos profissionais que são.

A todos os professores da área de Reprodução Animal por toda ajuda e conhecimento passado. Meu orgulho de formação profissional e pessoal.

Aos funcionários e residentes do departamento de Reprodução Animal por toda a colaboração e paciência para que tudo ocorresse muito bem.

Agradecimento especial ao Paulo por cuidar de minhas “filhas” e quebrar muitos galhos. Obrigada, amigo.

Aos funcionários e amigos do EndoLab (University of California – Davis) por me ensinar as técnicas e me permitir participar da rotina do laboratório.

A minha família e namorado sempre presentes, pelo apoio e paciência.

Ao Preto, meu mais fiel companheiro.

À todos os amigos que me receberam em suas casas no período em que não morei em Botucatu. Obrigada pela confiança e hospitalidade. À Gabriela e ao Victor por dividir a casa e a vida comigo.

A todos os amigos que a vida me permitiu fazer durante esses anos. Estarão pra sempre comigo.

A todos meus amigos de fora do doutorado, por manter a amizade e carinho, mesmo com tanta ausência.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – AMH é secretado por folículos primários e pré-antrais, inibe o recrutamento folicular inicial e o crescimento folicular estimulado pelo FSH (Adaptado de La Marca e Volpe, 2006)..... 4
- Figura 2** – Dados de AMH sérico. A linha vermelha é o modelo que melhor se encaixa aos 3.260 pontos apresentados como triângulos. O coeficiente de determinação, r^2 , é 0,34, indicando que 34% da variação nas concentrações de AMH sérico é devida somente a idade. O pico no AMH sérico é aos 24,5 anos (KELSEY et al., 2011)..... 8
- Figura 3** – Concentrações séricas médias de Hormônio Anti-Mülleriano e progesterona durante o ciclo estral em éguas cíclicas (n=6). Amostras foram coletadas segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira durante um período interovulatório (ALMEIDA et al., 2011)..... 11
- Figura 4** – Box plots das concentrações plasmáticas de AMH em éguas jovens (3–8 anos), éguas de meia-idade (9–18 anos) e éguas idosas (19–27 anos). O ponto isolado indica um outlier. Concentrações plasmáticas de AMH foram menores em éguas idosas ($P < 0.008$) que em éguas de meia-idade. Letras diferentes sobre os quadros indicam diferenças estatísticas significativas. Nível de significância $P < 0,05$ (Adaptado de Claes et al., 2015a)..... 12
- Figura 5** – Correlações entre contagem de folículos antrais (AFC) e AMH plasmático dentro de diferentes grupos de idade (mostrados da esquerda para a direita: jovens [3-8 anos], meia-idade [9-18 anos] e éguas velhas [19-27 anos]). Os pontos pretos representam a AFC média e concentrações de AMH. O coeficiente de correlação Spearman foi maior em éguas velhas ($p = 0,86$, $P < 0,0001$) do que em éguas de meia-idade ($p = 0,60$, $P = 0,01$), enquanto não foi detectado correlação significativa ($p = 0,40$, $P < 0,4$) em éguas jovens (Adaptado de Claes et al., 2015a)..... 13
- Figura 6** – Correlação entre contagem de AFC e concentração de AMH plasmático independente da idade da égua. Os pontos pretos representam AFC médio e concentração de AMH. AFC é positivamente correlacionado com concentrações plasmáticas de AMH ($\rho = 0,77$, $P < 0,0001$) (Adaptado de Claes et al., 2015a)..... 13

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMH	Hormônio Anti-Mülleriano
ACF	Contagem de folículos antrais
FIV	Fecundação in vitro

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
1.1 Hormônio Anti-Mulleriano.....	3
1.2 AMH em humanos.....	6
1.3 AMH em equinos.....	9
1.4 AMH nas demais espécies de animais domésticos.....	14
2 REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO II.....	25
ARTIGO.....	26

Resumo

ULIANI, R. C. Efeito da ovariectomia e idade sobre as concentrações séricas de hormônio Anti-Mülleriano em éguas. Botucatu. 2016. 50p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O hormônio Anti-Mülleriano (AMH) tem sido proposto como marcador fidedigno da reserva ovariana, estimando a expectativa de vida reprodutiva remanescente da fêmea. Atualmente, em reprodução assistida humana, tem sido utilizado para determinar o tratamento a ser seguido e conduzir a expectativa da paciente. Em equinos, pouco se sabe sobre a produção de AMH e sua importância clínica. Sendo assim, o objetivo principal deste estudo foi descrever a concentração de AMH ao longo da vida das éguas e avaliar sua concentração após ovariectomia, em busca de relacionar AMH com reserva folicular ovariana. Foram realizados 2 experimentos. Experimento 1: Foi realizada a colheita de sangue de 1058 éguas Quarto de Milha, de 1 dia a 33 anos de idade, com o objetivo de relacionar AMH com a idade da égua. Experimento 2: 13 éguas (6 jovens e 7 idosas) foram submetidas a duas cirurgias de ovariectomia com intervalo médio de 111 dias. Amostras de sangue para dosagem de AMH foram retiradas imediatamente antes da primeira cirurgia e diariamente durante 15 dias. Na segunda cirurgia, amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da cirurgia e 15 dias após a mesma. AMH foi dosado por técnica de ELISA (Equine AMH ELISA; Ansh Labs, Webster, TX, USA). Testes não paramétricos foram utilizados para confrontar as medianas dos níveis de AMH entre diferentes categorias de idade e médias dos períodos pré e pós operatórios. A idade foi responsável por somente 5% da variabilidade dos níveis de AMH. A concentração média foi mantida desde o nascimento até aproximadamente 18 anos de vida, quando começa a cair lentamente. A queda se acentua com aproximadamente 23 anos de idade e chega a zero aos 30 anos. A concentração de AMH após ovariectomia unilateral apresenta uma queda abrupta no pós operatório imediato. Após intervalo entre primeira e segunda cirurgia, as éguas apresentaram uma recuperação na concentração sérica de AMH. Em conclusão, AMH não apresenta relação com idade em éguas. Mais trabalhos precisam ser realizados com intuito de relacionar AMH com atividade folicular ovariana em éguas.

Palavras-chave: Folículo ovariano, população folicular, folículo pré-antral, célula da granulosa, reserva ovariana.

Abstract

ULIANI, R. C. Effect of ovariectomy on age and serum concentrations of Anti-Müllerian Hormone in mares. Botucatu. 2016. 50p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Anti-Müllerian hormone (AMH) has been proposed as a reliable marker of ovarian reserve, estimating the expected remaining female reproductive life. Currently, in human assisted reproduction, AMH has been used to determine the treatment to be followed and lead to the expectation of the patient. In horses, little is known about the production of AMH and its clinical significance. Thus, the aim of this study was to describe the production of AMH lifelong of mares and evaluate its production after ovariectomy, aiming to relate AMH with ovarian follicular reserve. 2 experiments were performed. Experiment 1: 1058 Quarter Horse mares, from 1 day to 33 years old were sampled in order to relate AMH with the age of the mare. Experiment 2: 13 mares (6 young and 7 old) underwent two ovariectomy surgeries with a mean interval of 111 days. Blood samples for AMH levels were drawn immediately before surgery and daily for 15 days. In the second surgery, blood samples were collected immediately before surgery and 15 days after. AMH was measured by ELISA (Equine AMH ELISA; Ansh Labs, Webster, TX, USA). Non-parametric tests were used to compare the median AMH levels between different age categories and the mean in the pre and postoperative periods. Age was responsible for only 5% of the variability in AMH levels. The average production was maintained from birth to about 18 years, when started to fall slowly. The decrease is higher with approximately 23 years of age and reaches zero after 30 years. The production of AMH after unilateral ovariectomy shows an abrupt drop in the post-surgery period. After the interval between the first and second surgery, the mares showed a recovery in the production of serum AMH. In conclusion, AMH doesn't have a correlation with age in mares. More works need to be carried out with the aim of linking AMH with ovarian follicular activity in mares.

Key-Words: Ovarian follicle, follicular population, preantral follicle, granulosa cell, ovarian reserve.

Capítulo I

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nosso atual conhecimento da função reprodutiva feminina supõe que o ovário contém um número finito de oócitos dentro dos folículos primordiais, e que seu esgotamento anuncia a perda da fertilidade feminina que acontece com o avançar da idade (WALLACE & KELSEY, 2010). Essa população de folículos primordiais é formada durante a vida fetal e uma pequena parte dela é ativada e estimulada a crescer diariamente durante a vida reprodutiva de uma fêmea, incluindo a infância, sendo a grande maioria destinada a sofrer atresia (MCGEE & HSUEH, 2000). Antes da puberdade, todos os folículos em crescimento vão se tornar atresícos e, após a puberdade, somente um por mês vai escapar deste fato e atingir a ovulação.

A mensuração precisa da reserva ovariana tem sido buscada há tempos em medicina reprodutiva, sendo tema de grande interesse em pesquisas. Pela dificuldade em acessar a população de oócitos/folículos existentes nos ovários, indicadores endocrinológicos e ultrassonográficos são utilizados como uma forma indireta de acessar a reserva ovariana. Com este intuito, já foram testados os hormônios FSH, LH, progesterona, inibina e estrógeno, mas nenhum deles foi capaz de produzir informações sobre a população de folículos existente nos ovários (VAN ROOIJ et al., 2005).

O Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) foi primeiramente descrito na década de 40 com base na sua produção pelas células de Sertoli fetais, resultando em atresia do ducto Mülleriano no macho (JOST, 1947 apud CLAES et al., 2016). Recentemente, níveis séricos de AMH têm sido introduzidos como um mensurador original da reserva ovariana. O AMH é um produto das células da granulosa dos folículos pré-antrais a partir dos estágio primário (DURLINGER et al., 2002a). Níveis de AMH em mulheres são mais baixos que em homens durante a vida. Em mulheres, níveis séricos de AMH podem ser quase indetectáveis ao nascimento, com um aumento súbito nos primeiros 2-4 anos de idade; então AMH apresenta-se estável até a vida adulta, quando diminui como um sinal de exaustão da reserva folicular (LEE et al., 1996). Níveis de AMH séricos têm sido mensurados em diferentes momentos durante o ciclo menstrual, sugerindo uma flutuação extremamente sutil ou não-existente (COOK et al., 2000). A Flutuação mínima nos níveis séricos de AMH poder estar relacionada com crescimento contínuo de folículos pequenos. Por isso, a mensuração do AMH possui é conveniente, especialmente pelo fato de apresentar uma alta estabilidade de expressão

durante o ciclo menstrual, fazendo disso um determinante atrativo da atividade ovariana (COOK et al., 2000).

Os níveis séricos de AMH declinam com a idade e são relacionados com o número de folículos presentes nos ovários (VAN ROOIJ et al., 2002). Pelo fato de a idade cronológica no estágio final do envelhecimento reprodutivo mostrar uma variação individual considerável, é provável que as fêmeas difiram no que diz respeito ao status da população de oócito/folículo a certa idade. Hoje, em medicina humana, é reconhecido que a mensuração do AMH no soro é uma medida muito mais acurada da reserva ovariana que os outros hormônios previamente estudados (VAN ROOIJ et al., 2005).

O hormônio anti-Mülleriano pode representar uma ferramenta chave para o estudo da reserva folicular nas fêmeas de todas as espécies e, em especial, na espécie equina. Porém, os estudos nesta área estão apenas iniciando e muitas informações precisam ser conhecidas para que seja aplicado na prática clínica.

1.1 Hormônio Anti-Mülleriano

Nos estágios iniciais do desenvolvimento em mamíferos, os fetos de ambos os sexos apresentam dois pares de ductos: O ducto de Wolffian e o ducto Mülleriano. Na década de 40, Alfred Jost mostrou que um produto testicular diferente de testosterona foi responsável pela regressão do ducto de Müller em fetos machos. Este produto foi chamado de “hormone inhibitrice” (JOST, 1947 apud CLAES et al., 2016). Há trinta anos, o gene humano para o hormônio anti-Mülleriano (AMH) foi isolado e sequenciado (CATE et al., 1986).

AMH, também conhecido como substância inibitória de Müller com peso molecular de 140 kDa, é um membro “sexualmente especializado” da família do fator de crescimento transformante (TGF- β) pelo fato de ser expressado exclusivamente por células somáticas gonadais e apresentar efeitos nas gônadas e no trato reprodutivo. Seu efeito biológico principal, a inibição do desenvolvimento do ducto Mülleriano em fetos machos, representa o primeiro passo da diferenciação fenotípica do sexo masculino (LA MARCA & VOLPE, 2006). AMH é fortemente expressado nas células de Sertoli da diferenciação testicular até a puberdade e, na ausência do AMH, os ductos Müllerianos de ambos os sexos se desenvolvem em útero, trompas de falópio e a parte anterior da vagina (BEHRINGER et al., 1994). Em fêmeas, AMH não é expresso durante o período de diferenciação sexual, assegurando o desenvolvimento normal do trato genital feminino (HIROBE et al., 1992). A expressão de AMH nos ovários tem sido observada a partir das 36 semanas de gestação em humanos. Após

o nascimento, AMH é expresso nas células da granulosa de folículos pré-antrais nos ovários, inibe o recrutamento dos folículos primordiais do pool de folículos em crescimento e diminui a responsividade ao FSH (Figura 1; REY et al., 2003; LA MARCA e VOLPE, 2006). As células da granulosa de folículos primários mostram expressão homogênea de AMH; em folículos grandes, AMH é principalmente produzido em células próximas ao oócito e em poucas células ao redor do antro. AMH continua a ser expresso nos folículos em crescimento no ovário até atingirem o tamanho e estágio de diferenciação no qual eles são selecionados a ser dominantes pela ação do FSH pituitário. AMH não é expresso em folículos atresícos e células da teca (WEENEN et al., 2004).

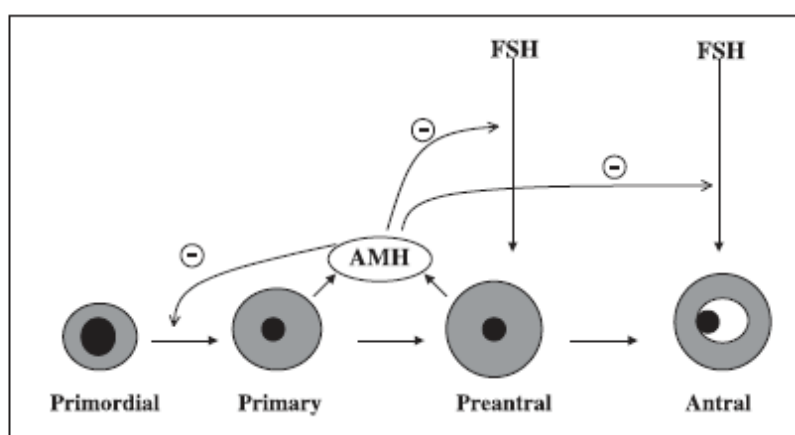


Figura 1 – AMH é secretado por folículos pré-antrais, inibe o recrutamento folicular e o crescimento folicular estimulado pelo FSH (Adaptado de La Marca e Volpe, 2006).

O AMH é hoje reconhecido como o principal regulador do recrutamento folicular inicial e do pool primordial (DURLINGER et al., 2002a). Ratos desprovidos de AMH (null mice) demonstraram depleção acelerada do número de folículos primordiais e aumento de quase 3 vezes no número de folículos em crescimento (DURLINGER et al., 1999a). Este aumento no número de folículos em crescimento ocorreu apesar de baixas concentrações de FSH, sugerindo que na ausência de AMH, os folículos são mais sensíveis ao FSH e avançam mais rápido aos estágios iniciais de desenvolvimento folicular. AMH é produzido por folículos pequenos em crescimento, mas não por folículos primordiais (WEENEN et al., 2004), embora dados sugiram que concentrações séricas de AMH são também relacionadas com número de folículos primordiais tanto em humanos (HANSEN et al., 2011) como em roedores (KEVENAAR et al., 2006).

Os mecanismos que regulam a expressão do AMH ovariano permanecem desconhecidos, mas a expressão do receptor de AMH nas células da granulosa sugere que pode desempenhar um papel importante na fisiologia ovariana (JOSSO et al., 2001). A ativação dos folículos primordiais e o passo do desenvolvimento folicular são regulados por fatores positivos e negativos. AMH é considerado um regulador negativo dos estágios iniciais de desenvolvimento.

Para investigar se os efeitos do AMH foram diretamente aos folículos primordiais, ovários neonatais de ratos desprovidos de AMH de 2 dias de vida foram cultivados *in vitro* na presença de AMH. Após 2 dias da exposição *in vitro* ao AMH, aproximadamente 50% menos folículos em crescimento foram encontrados, mostrando que AMH pode diretamente afetar os folículos primordiais (DURLINGER et al., 2002b). Este estudo sugere que a presença de AMH atua como uma inibição na ativação dos folículos primordiais e o crescimento de folículos pré-antrais. A determinação hormonal em fêmeas desprovidas de AMH revelou que o FSH nesses animais foi baixo comparado aos animais tipo-selvagem, e que apesar destes baixos níveis de FSH, o número de folículos em crescimento foi maior, sugerindo que na ausência do AMH, os folículos podem ser mais sensíveis ao FSH (DURLINGER et al., 1999a). Assim, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os folículos são mais sensíveis ao FSH em ausência do AMH. O efeito inibitório do AMH na sensibilidade dos folículos ao FSH pode ter um papel importante no processo de seleção.

Durante o crescimento folicular, um grupo de folículos é recrutado do grupo de folículos pequenos produtores de AMH, a continuar o crescimento até o estágio pré-ovulatório. Supõe-se que, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, cada folículo requer uma determinada concentração de FSH para continuar a crescer, ou seja, cada folículo exibe seu próprio limiar de concentração de FSH e esta concentração deve ser excedida para garantir a seleção. Sendo que o AMH afeta a sensibilidade dos folículos ao FSH, este pode desempenhar um papel importante na determinação dos folículos em avançar na emergência ou ser removido através da atresia. Tal papel do AMH é sustentado pelo padrão diferencial de expressão do AMH em folículos pré-antrais grandes não-atréticos e pequenos folículos antrais no ovários de ratos (BAARENDS et al., 1995). Embora morfológicamente indistinguíveis, alguns folículos mostraram expressão de AMH mais baixa que outros, e estes folículos podem ser mais sensíveis ao FSH, e mais prováveis de ser selecionados.

Foi demonstrado recentemente que os oócitos regulam a expressão de AMH nas células da granulosa de maneira dependente do estágio de desenvolvimento do oócito

(SALMON et al., 2004). Esta observação leva à hipótese que oócitos no pool de folículos em desenvolvimento podem controlar o pool de folículos primordiais pela modulação do AMH.

1.2 AMH em humanos

É bem conhecido que, com o aumento da idade, existe um declínio na função reprodutiva feminina devido à redução do pool de folículos ovarianos e a qualidade dos oócitos. Nas últimas décadas, vários marcadores foram propostos para acessar a reserva ovariana. O aumento no FSH e a diminuição na inibina-B e a contagem de folículos antrais através da ultrassonografia mostraram ser confiáveis para investigação da reserva ovariana (LA MARCA & VOLPE, 2006).

A produção do AMH pelas células da granulosa no ovário adulto foi primeiramente descrito em galinhas por Hutson et al., em 1981, mas pesquisa da sua função e utilidade clínica somente aumentou na virada do século, com o desenvolvimento de ensaios disponíveis comercialmente (ANDERSON et al., 2012). Os primeiros estudos demonstraram que AMH sérico apresenta uma correlação próxima com o número de oócitos que foram obtidos após superovulação para FIV (SEIFER et al., 2002), e que declinou com a idade da mulher (VAN ROOIJ et al., 2005). Esses dois achados são centrais no atual entendimento da utilidade do AMH como uma medida da reserva ovariana.

Os primeiros estudos utilizando AMH de rato demonstraram que seu envolvimento mais importante é a regulação do início do crescimento folicular inicial (DURLINGER et al., 1999b), e estudos subsequentes indicaram que pode regular a responsividade ao FSH dos folículos em crescimento (DURLINGER et al., 2001). A falta de produção do AMH pela granulosa mural dos folículos antrais grandes, ou pelo corpo lúteo é fundamental para sua utilização clínica, pois significa que suas concentrações séricas variam pouco durante o ciclo menstrual (VAN DISSELDORP et al., 2010). Assim, para propósitos práticos o AMH pode ser acessado em qualquer estágio do ciclo estral sendo que a flutuação mínima nos níveis séricos de AMH pode ser relacionada com o crescimento contínuo de folículos pequenos não cíclicos. Além disso, AMH na circulação foi eleito como um marcador da atividade folicular durante a gestação. Níveis circulantes de AMH maternal são similares àqueles encontrados na fase folicular de mulheres não gestantes. Não foram encontradas diferenças significativas entre os três trimestres e o puerpério (LA MARCA et al., 2005). Isso indica que a placenta não produz ou secreta AMH na circulação maternal. Estes dados confirmam que o recrutamento folicular inicial não é abolido durante a gestação. Além disso, o crescimento

folicular nos estágios antrais iniciais tem sido descritos em mulheres com deficiente secreção de gonadotropinas, devido a hipofisectomia ou falha no eixo hipotálamo/hipófise (SCHOOT et al., 1994)

A avaliação da reserva ovariana antes da concepção assistida é a indicação mais estabelecida para o emprego do AMH, com muitas clínicas agora utilizando rotineiramente avaliação do AMH antes do tratamento para FIV (ANDERSON et al., 2012). Como AMH correlaciona fortemente com o número de oócitos obtidos após superovulação, uma avaliação do nível sérico permite condução de ambos, estratégia do tratamento e expectativa do paciente (NELSON et al., 2009). Da mesma forma, mulheres com alto AMH são predispostas a responder excessivamente às gonadotropinas exógenas e sua estratégia de tratamento pode ser modificada para minimizar o risco de síndrome da superstimulação ovariana (OHSS). Reciprocamente mulheres com baixo AMH são predispostas a resposta fraca à superestimulação com consequente baixa chance de engravidar, e suas expectativas podem ser conduzidas apropriadamente com discussões alternativas como doação de oócitos.

Embora AMH seja primeiramente uma avaliação de quantidade antes de qualidade, é positivamente associada com taxas de nascimento vivo pós FIV independente da idade (YATES et al., 2011). Isto deve-se primariamente à relação com produção ovariana, pois mulheres de qualquer idade com altos níveis de AMH são mais susceptíveis a ter alto número de oócitos recuperados e assim potencialmente maior número de embriões para seleção. A relação custo benefício do uso de uma estratégia de tratamento baseado no AMH em FIV propõe economias substanciais (YATES et al., 2011).

O declínio no AMH durante os anos reprodutivos tardios é um dos achados mais estabelecidos, aumentando assim a possibilidade de prever a menopausa (VAN ROOIJ et al., 2004) e implicando na expectativa de vida reprodutiva remanescente da mulher. Na análise de amostras de sangue seriais de 50 mulheres com mais de 42 anos foi demonstrado que AMH diminui para níveis não detectáveis 5 anos antes do período final da menopausa (SOWERS et al., 2008).

Através da expectativa de vida feminina, AMH circulante vai exibir um aumento inicial seguido por um declínio não linear com a idade. Os níveis séricos de AMH apresentam um aumento súbito nos primeiros 2-4 anos de idade, torna-se aparentemente estável até a vida adulta, quando diminui como um sinal de exaustão da reserva folicular (Figura 2) (LEE et al., 1996).

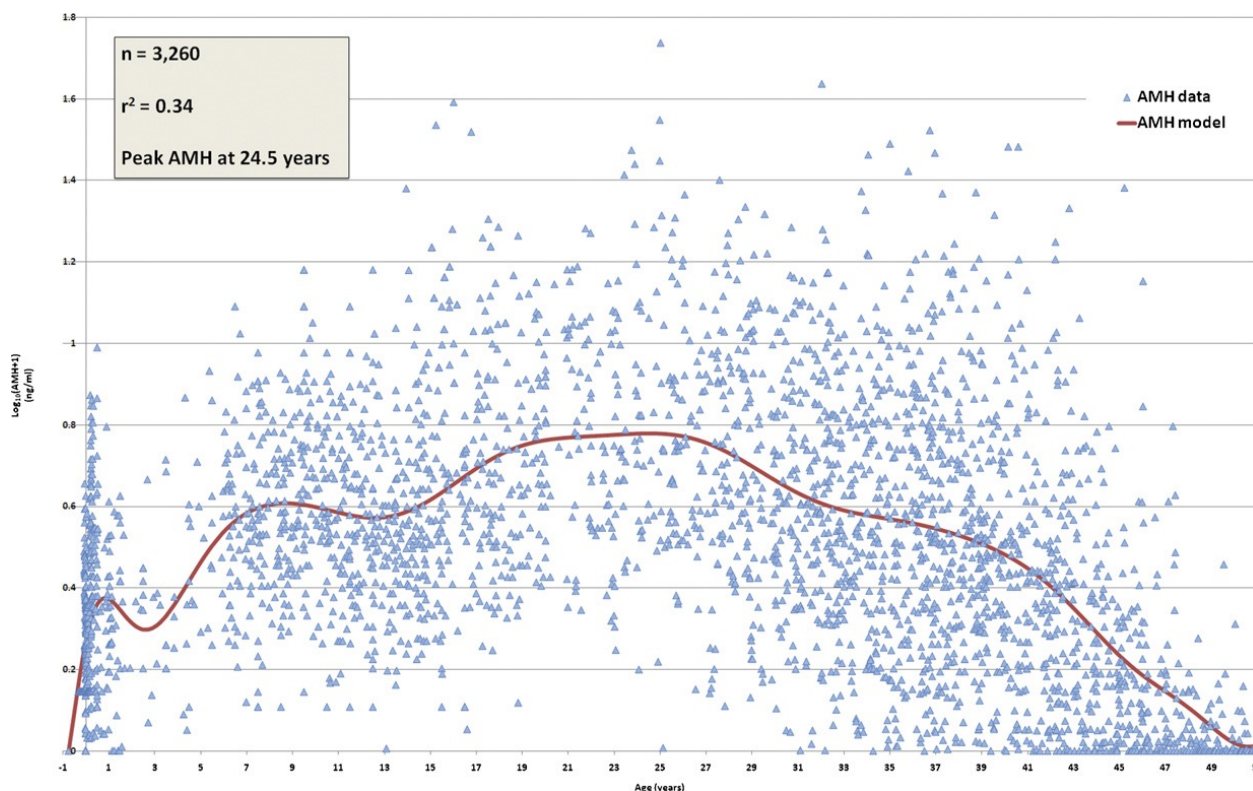


Figura 2 – Dados de AMH sérico. A linha vermelha é o modelo que melhor se encaixa aos 3.260 pontos apresentados como triângulos. O coeficiente de determinação, r^2 é 0,34, indicando que 34% da variação nas concentrações de AMH sérico é devida somente a idade. O pico no AMH sérico é aos 24,5 anos (KELSEY et al., 2011).

Um grupo de mulheres foi estudado duas vezes com intervalo entre 1,1 a 7,3 anos. A redução no nível médio de AMH observado foi cerca de 38%, enquanto o número de folículos antrais e os níveis de FSH e inibina-B não foram alterados (DE VET et al., 2002). Em outro estudo, 81 mulheres foram avaliadas durante 4 anos (idade média de 39,6 e 43,6 no início e no final do estudo, respectivamente). Foi encontrado que o número de folículos em crescimento não alterou ao passar do tempo, enquanto AMH, FSH e inibina-B mudaram significativamente. Entretanto, AMH foi o único marcador da reserva ovariana que mostrou um declínio longitudinal médio com o tempo em mulheres jovens (menor 35 anos) e em mulheres acima de 40 anos (VAN ROOIJ et al., 2005). Entre os outros indicadores conhecidos, AMH é o que melhor reflete o declínio contínuo do pool de oócitos/folículos com a idade (VAN ROOIJ et al., 2004). A diminuição no AMH com o avançar da idade pode estar presente antes das mudanças nas variáveis relacionadas a idade atualmente conhecidas, indicando que níveis séricos de AMH podem ser os melhores indicadores do envelhecimento ovariano e transição menopausal (VAN ROOIJ et al., 2004).

Esses estudos também confirmam a ampla variabilidade no AMH entre mulheres. É esperado uma variação na comparação no número de folículos primordiais (WALLACE & KELSEY, 2010) e a idade na menopausa. Deve ser reconhecido que a idade a menopausa tem influência genética a despeito do grande número de influências ambientais que já foram identificadas (KOK et al., 2005). Atualmente a informação da idade da mãe na menopausa é o fator preditivo mais importante para estimar a idade a menopausa de uma mulher, porém, trabalhos futuros podem avaliar se AMH é um indicador melhor que este (KOK et al., 2005).

Os estudos com AMH se intensificam a cada novo resultado encontrado. Muitos grupos de pesquisa no mundo todo estão se dedicando ao entendimento de sua fisiologia e, principalmente, buscando a relação do AMH com índices reprodutivos. Entre outros trabalhos, foi recentemente observada uma correlação positiva do AMH da doadora com a taxa de gestação após doação de oócito (DELESALLE et al., 2016); também foi estudada a possibilidade de gestação após quimioterapia para câncer de mama, porém sua relação com AMH não foi estabelecida (HAMY et al., 2016). A capacidade do AMH no fluido folicular em predizer a maturação oocitária também foi tema de pesquisa (MILAKOVIC' et al., 2015). Apesar da ausência de relação, os dados mostram a importância que este hormônio vem adquirindo dentro da reprodução assistida.

1.3 AMH em equinos

Existe grande interesse por parte dos proprietários de equinos em aumentar a eficiência reprodutiva de seus animais mais valiosos. Em equinos, como em outras espécies de animais de produção, as fêmeas obtêm seu maior valor econômico quando sua progênie se destaca e isto geralmente acontece quando o animal já atingiu idade mais avançada.

Fêmeas mamíferas apresentam um declínio gradativo na capacidade reprodutiva com o avançar da idade. A seleção na espécie equina não é feita baseando-se nos critérios de fertilidade e o alto valor da prole estimula o uso dos animais em procedimentos de reprodução assistida, fazendo com que muitas éguas permaneçam em reprodução mesmo com idade avançada e baixos índices de fertilidade (CARNEVALE, 2008).

Visando a maximização da eficiência reprodutiva de um sistema de criação de equinos, é essencial trabalhar para a obtenção de um produto por ano de todas as éguas do rebanho. Para isso é necessária a integração entre os aspectos fisiológicos, nutricionais e de manejo. Contudo, apesar de toda a evolução que a reprodução animal tem alcançado nas últimas décadas, especialmente na área de biotecnologia, as desordens de origem ovariana

continuam causando grande prejuízo econômico, pois produz efeito deletério na taxa de concepção, número de serviços por concepção e sobrevivência embrionária. As desordens ovarianas levam a perda de tempo para produção de embriões durante a estação de monta, dinheiro gasto em tentativas sem sucesso de produzir filhos de indivíduos e risco de descarte de animais de alto valor genético (ULIANI, 2012).

O declínio da fertilidade relacionado à idade em fêmeas tem pelo menos dois componentes básicos: a diminuição da taxa de concepção/prenhez por ciclo e um aumento das taxas de morte embrionária e abortamento nesses animais (CARNEVALE, 2008).

Originalmente, as éguas possuem cerca de 40.000 folículos primordiais e ciclam durante 25 anos; assim, usando em média 100 folículos/ciclo, poderá esgotar toda a sua reserva de folículos primordiais ($100 \text{ folículos} \times 16 \text{ ciclos/ano} \times 25 \text{ anos} = 40.000 \text{ folículos primordiais}$) nesse período. Presumivelmente, o “pool” de folículos primordiais é finito, principalmente por não ter sido citado, até o presente momento, a ocorrência de mitoses em oogônias de potras ou éguas (GINTHER, 1992), porém o número de folículos primordiais remanescente nos ovários de éguas velhas ainda não foi determinado.

O efeito da idade sobre a atividade ovariana tem sido caracterizado também pelo decréscimo do volume ovariano, pela redução do número de folículos antrais e pela menor vascularização do estroma ovariano em mulheres idosas (KUPESIC et al., 2003). Não foi observada atividade ovariana em 37% de fêmeas equinas acima de 24 anos, e somente 50% das éguas pôneis ≥ 20 anos tiveram ovulações sequenciais (VANDERWALL et al., 1993). Em outro estudo realizado por Carnevale et al. (1994) 19% das éguas idosas não apresentaram desenvolvimento de um folículo ou ovularam durante 60 dias de monitoração durante período reprodutivo. As informações obtidas até o presente momento são muito conflitantes e isto pode ocorrer devido ao entendimento incompleto do desenvolvimento folicular em éguas idosas, além da relativa inacurácia das técnicas utilizadas, como palpação retal e acesso ao material de abatedouro. Poucas informações estão disponíveis sobre o efeito da idade na reprodução de éguas idosas e o melhor entendimento dos fatores que levam a queda da eficiência reprodutiva poderia ajudar a identificar éguas com alto risco de falha na concepção e então encaminhá-las para monitoramento apropriado (CARNEVALE et al., 1994).

Na égua, a idade pode também afetar os níveis dos hormônios reprodutivos (CARNEVALE et al., 1993a), porém, concentrações de gonadotropinas foram elevadas até o fim da fase reprodutiva de éguas (CARNEVALE et al., 1994). O sinal inicial de envelhecimento reprodutivo na égua é o início da diminuição da ciclicidade reprodutiva com

elevadas concentrações de FSH. As mudanças hormonais foram sugeridas como reflexo das secreções ovarianas alteradas de hormônios moduladores do FSH, incluindo estradiol e inibina, porém o AMH em éguas nunca foi relacionado com produção de FSH.

Trabalhos envolvendo o estudo do AMH em equinos são muito escassos na literatura atual. Alguns trabalhos envolvendo este hormônio objetivaram a avaliação de tumores das células da granulosa em éguas e puberdade ou criptorquidismo em machos (ALMEIDA et al., 2012; BALL et al., 2013; CLAES et al., 2013). Até hoje, apenas um trabalho teve como objetivo avaliar a produção fisiológica de AMH em éguas (ALMEIDA et al., 2011). Esses autores avaliaram a produção de AMH durante as fases do ciclo estral e mensalmente durante o período gestacional. Éguas com ciclo estral normal (n=6) tiveram soro e plasma coletados toda segunda, quarta e sexta durante um período interovulatório. Éguas gestantes (n=6) tiveram soro coletado mensalmente durante a gestação para determinação da concentração de AMH. Éguas ovariectomizadas (n=5) tiveram soro sanguíneo coletado uma vez. Neste estudo, a concentração de AMH foi diferente entre as éguas, provavelmente por se tratar de animais de idades diferentes (6 a 13 anos) e com reservas ovarianas variadas. Porém, para cada animal os valores não apresentaram variação significativa durante as fases do ciclo estral (Figura 3) bem como durante os meses de gestação. Éguas ovariectomizadas apresentaram valores inferiores de AMH. Assim como em mulheres, em ovários equinos, a expressão de AMH foi melhor em folículos pequenos em crescimento e em folículos antrais pequenos com reduzida expressão de AMH em folículos antrais maiores (ALMEIDA et al., 2011).

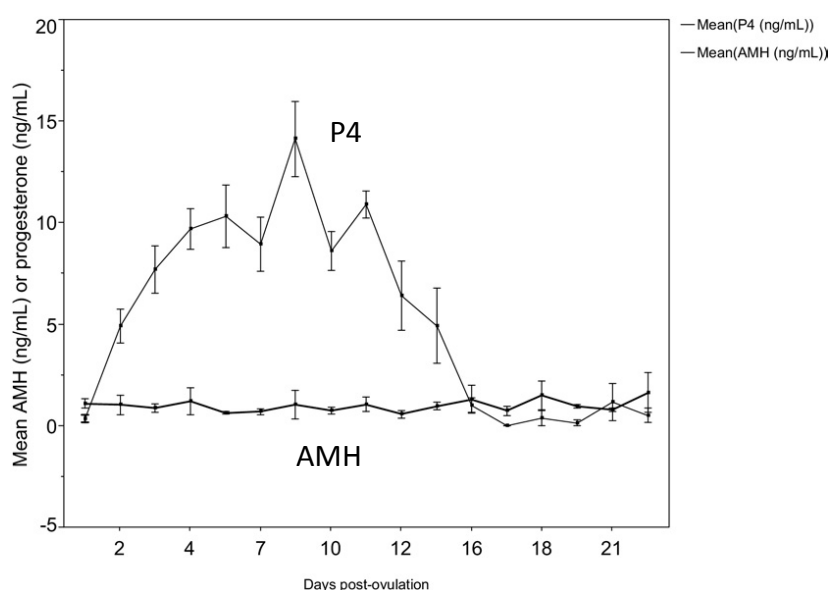


Figura 3 – Concentrações séricas médias de Hormônio Anti-Mülleriano e progesterona durante o ciclo estral em éguas cíclicas (n=6). Amostras foram coletadas segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira durante um período interovulatório (ALMEIDA et al., 2011).

Recentemente foram realizados dois trabalhos com o intuito de relacionar a produção de AMH com a contagem de folículos antrais (AFC) avaliados por ultrassonografia. Claes et al. (2015a), compararam a AFC com a produção de AMH de éguas jovens, de meia-idade e idosas. Todos os folículos ≥ 2 mm foram registrados e as concentrações plasmáticas de AMH foram determinadas usando kit de ELISA (Minitube AMH ELISA). Em comparação com éguas velhas (mediana, 13,6 folículos), a AFC foi maior em jovens ($P<0,007$; mediana, 25,5 folículos) e éguas de meia-idade ($P<0,0006$; mediana, 27,8 folículos), mas não houve diferença ($P=0,4$) na AFC observada entre éguas jovens e de meia-idade. Além disso, AFC foi maior ($P<0,03$) no ovário esquerdo que no ovário direito em éguas de todos os grupos de idades. Concentrações plasmáticas de AMH apresentaram grande variação dentro dos diferentes grupos de idade (Fig. 4). Apesar de não terem sido observadas diferenças entre éguas jovens (mediana, 0,29 ng/ml) e éguas de meia-idade (mediana, 0,47 ng/ml), concentrações plasmáticas de AMH foram menores ($P<0,008$) em éguas velhas (mediana, 0,21 ng/ml) quando comparadas com éguas de meia-idade (Fig 4).

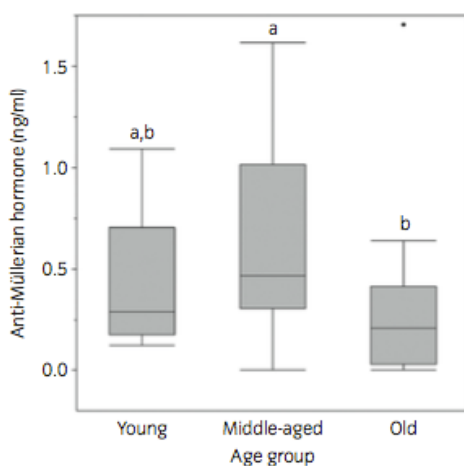


Figura 4 – Box plots das concentrações plasmáticas de AMH em éguas jovens (3–8 anos), éguas de meia-idade (9–18 anos) e éguas idosas (19–27 anos). O ponto isolado indica um outlier. Concentrações plasmáticas de AMH foram menores em éguas idosas ($P<0,008$) que em éguas de meia-idade. Letras diferentes sobre os quadros indicam diferenças estatísticas significativas. Nível de significância $P<0,05$ (Adaptado de Claes et al., 2015a).

Ao relacionar a AFC com a produção de AMH, houve interação com a idade,

indicado pelo maior coeficiente de correlação em éguas idosas ($\rho = 0.86$; $P < 0.0001$) do que em éguas de meia-idade ($\rho = 0.60$; $P = 0.01$; Fig 5). Em contraste, a correlação ($\rho = 0.40$) entre AFC e AMH não foi significativa em éguas jovens (Fig 5). Ao reunir todas as éguas em um só grupo (Fig. 6), a análise demonstrou que as concentrações plasmáticas de AMH foram positivamente associadas ($P < 0.05$) com o número de folículos antrais entre 6 e 20 mm em diâmetro, enquanto o número de folículos entre 2 e 5 mm ($P = 0.2$) ou > 20 mm ($P > 0.2$) não foi associado com as concentrações plasmáticas de AMH (CLAES et al., 20015a).

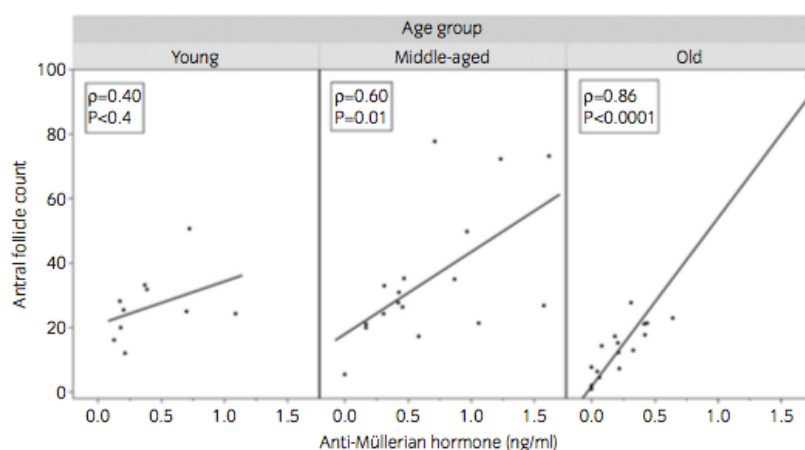


Figura 5 – Correlações entre contagem de folículos antrais (AFC) e AMH plasmático dentro de diferentes grupos de idade (mostrados da esquerda para a direita: jovens [3-8 anos], meia-idade [9-18 anos] e éguas velhas [19-27 anos]). Os pontos pretos representam a AFC média e concentrações de AMH. O coeficiente de correlação Spearman foi maior em éguas velhas ($\rho = 0.86$, $P < 0.0001$) do que em éguas de meia-idade ($\rho = 0.60$, $P = 0.01$), enquanto não foi detectado correlação significativa ($\rho = 0.40$, $P < 0.4$) em éguas jovens (Adaptado de Claes et al., 2015a).

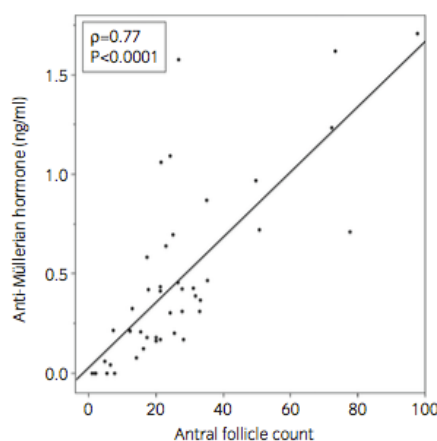


Figura 6 – Correlação entre contagem de AFC e concentração de AMH plasmático independente da idade da égua. Os pontos pretos representam AFC médio e concentração de AMH. AFC é positivamente correlacionado com concentrações plasmáticas de AMH ($\rho = 0,77$, $P < 0,0001$) (Adaptado de Claes et al., 2015a).

Em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa (CLAES et al., 2015b), a AFC foi comparada com fatores relacionados ao AMH no líquido folicular de folículos em crescimento e folículos dominantes. As concentrações de AMH no fluido folicular não foram significativamente associados com AFC ($P=0,4$) ou concentrações plasmáticas de AMH ($P=0,6$). A expressão de AMH ($P=0,004$) e vários genes co-expressados com AMH foi melhor nas células da granulosa de folículos em crescimento do que em folículos dominantes.

Sendo assim, os autores concluíram que a expressão de AMH e genes co-expressados com AMH no folículo equino tanto quanto concentrações de AMH intrafoliculares diminuiram durante o desenvolvimento folicular.

1.4 AMH nas demais espécies de animais domésticos

De forma geral, o AMH vem sendo intensamente estudado em várias espécies de animais domésticos. Os esforços são concentrados em tentativas de relacionar o AMH com indicadores reprodutivos.

Em cães, resultados mostraram que o AMH fica baixo no anestro e aumenta no início da transição e retorno ao cio (NAGASHIMA et al., 2016). O AMH também se mostrou uma boa ferramenta na identificação da síndrome do ovário remanescente (YILMAZ et al., 2015). Em gatos domésticos, a dosagem do AMH foi eficiente para identificar animais esterilizados, com 100% de sensibilidade do teste (AXNÉR e HOLST, 2015).

Em ovinos, AMH foi estudado para predizer fertilidade durante o período pré-púbere, com objetivo de selecionar futuras matrizes. Foi encontrada relação entre concentrações plasmáticas de AMH e taxa de prenhez na primeira cobertura. (LAHOZ et al., 2012). Ovelhas também foram utilizadas como modelo experimental para estudar a reativação pós-natal da pituitária, relação da AFC com AMH e fertilidade no primeiro cio (TORRES-ROVIRA et al., 2015). Em caprinos, AMH foi relacionado com a capacidade da doadora em produzir alto ou baixo número de embriões de alta qualidade (MONNIAUX et al., 2011).

Na espécie bovina, trabalhos realizados apresentaram correlação positiva entre a

população folicular e concentração plasmática de AMH (BALDRIGHI et al., 2014, BATISTA et al., 2014). A produção de AMH variou entre diferentes raças (BALDRIGHI et al., 2014, BATISTA et al., 2014). O AMH plasmático também foi capaz de identificar grupos de animais com bons resultados após aspiração de oócitos (VERNUNFT et al., 2015), longevidade reprodutiva (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2015) e bons resultados após tratamentos para superovulação (SOUZA et al., 2015)

Todos os trabalhos realizados relacionando AMH com indicadores reprodutivos são bastante recentes. As técnicas estão em constante evolução e aprimoramento. Recentemente, Arouche et al. (2015) desenvolveram um novo anticorpo específico para AMH de ruminantes, que mostrou ter maior afinidade com AMH de bovinos, ovinos e caprinos. Esse novo teste apresentou maior correlação entre os achados de trabalhos anteriormente realizados com os testes comerciais que utilizam reação cruzada com anticorpos humanos.

O AMH tem apresentado características únicas que devem levar sua rápida adoção em várias indicações no que se refere à reprodução de fêmeas, bem como a avaliação de sua expectativa de vida reprodutiva. O uso potencial e crescente do AMH é evidente, e para que novos estudos possam ser conduzidos com o objetivo de avaliar a expectativa de vida reprodutiva de éguas torna-se necessário uma referência padrão para comparações futuras, objetivando tornar possível sua adoção na prática clínica. Aparentemente não restam dúvidas de que as pesquisas com AMH vão continuar nos próximos anos.

2. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.; BALL, B.A.; CONLEY, A.J.; PLACE, N.J.; LIU, I.K.M.; SCHOLTZ, E.L.; MATHEWSON, L.; STANLEY, S.D.; MOELLER, B.C. Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. **Theriogenology**, v.76, p.1393–1403, 2011.

ALMEIDA, J.; CONLEY, A.J.; MATHEWSON, L.; BALL, B.A. Expression of anti-Müllerian hormone, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1B), androgen receptor, and connexin 43 in equine testes during puberty. **Theriogenology**, v.77, n.5, p.847-857, 2012.

ANDERSONA, R.A.; NELSONB, S.M.; WALLACEC, W.H.B. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: When and for whom is it indicated? **Maturitas** v.71, p. 28-33, 2012.

AROUCHE, N.; PICARD, J. Y.; MONNIAUX, D.; JAMIN, S. P.; VIGIER, B.; JOSSO, N.; CATE, R. L.; CLEMENTE, N.; TAIEB, J. The BOC ELISA, a ruminant-specific AMH immunoassay, improves the determination of plasma AMH concentration and its correlation with embryo production in cattle. **Theriogenology**, v.84 p.1397–1404, 2015.

AXNÉR, E.; HOLST, B. S. Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. **Theriogenology**, v. 83, p. 817–821, 2015.

BAARENDS, W.M.; UILENBROEK, J.T.; KRAMER, P.; HOOGERBRUGGE, J.W.; VAN LEEUWEN, E.C.; THEMMEN, A.P.; GROOTEGOED, J.A. Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. **Endocrinology**, v.136, p.4951–4962, 1995.

BALDRIGHI, J. M.; SÁ FILHO M. F.; BATISTA, E. O. S.; LOPES, R. N. V. R.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. **Reprod Dom Anim** v. 49, p. 1015–

1020, 2014.

BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R. N. V. R.; RENNO, F. P.; BARUSELLI, P. S. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reprod Dom Anim**, v.49, p.448–452, 2014.

BALL, B.A.; ALMEIDA, J.; CONLEY, A.J. Determination of serum anti-Müllerian hormone concentrations for the diagnosis of granulosa-cell tumours in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.45, n.2 p.199-203, 2013.

BEHRINGER, R.R.; FINEGOLD, M.J.; CATE, R.L. Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. **Cell**, v.79, p.415-425, 1994.

CATE, R.L.; MATTALIANO, R.J.; HESSION, C.; TIZARD, R.; FARBER, N.M.; CHEUNG, A.; NINFA, E.G.; FREY, A.Z.; GASH, D.J.; CHOW, E.P.; FISHER, R.A.; BERTONIS, J.M.; TORRES, G.; WALLNER, B.P.; RAMACHANDRAN, K.L.; RAGIN, R.C.; MANGANARO, T.F.; MCLAUGHLIN, D.T.; DONAHOE, P.K. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. **Cell**, v.45, p.685-698, 1986.

CLAES, A.; BALL, B.A.; ALMEIDA, J.; CORBIN, C.J.; CONLEY, A.J. Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. **Theriogenology**, v.79, n.9, p.1229-35, 2013.

CLAES, A.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J. J.; CONLEY, A. J.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p. 537–541, 2015a.

CLAES, A.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H. T.; CURRY JR., T. E.; SQUIRES, E. L. SCOGGIN, K. E. Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral

follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations. **Equine Veterinary Journal**, v.0 p. 1-8, 2015b.

COOK, C.L.; SIOW, Y.; TAYLOR, S.; FALLAT, M.E. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual Cycles. **Fertility and Sterility**, v.73, p.859-861, 2000.

DE VET, A.; LOVEN, J.S.; DE JONG, F.H.; THEMMEN, A.P.; FAUSER, B.C. Anti-Mullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertility and Sterility**, v.77, p.357-362, 2002.

DELESALLE, A; ROBIN, G.; THOMAS-DESROUSSEAUX, P.;1, DEWAILLY, D.; CATTEAU-JONARD, S. Anti-Müllerian hormone serum level and other markers associated with pregnancy outcome in oocyte donation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14:4, 2016.

DURLINGER, A.L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.140, p.5789–5796, 1999a.

DURLINGER, A.L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T., GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.140, p.5789–5796, 1999b.

DURLINGER, A.L.; GRUIJTERS, M.J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; KUMAR, T.R.; MATZUK, M.M.; ROSE, U.M.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.142, p.4891-4899, 2001.

DURLINGER, A.L.; VISSER, J.A.; THEMMEN, A.P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. **Reproduction**, v.124, p. 601–609, 2002a.

DURLINGER, A.L.; GRUIJTERS, M.J.; KRAMER, P.; KARES, B.; INGRAHAM, H.A.; NACHTIGAL, M.W.; UILENBROEK, J.T.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, v.143, p.1076-1084, 2002b.

HAMY, A. S.; PORCHER, R.; ESKENAZI, S.; CUVIER, C.; GIACCHETTI, S.; COUSSY, F.; HOCINI, H.; TOURNANT, B.; PERRET, F.; BONFILS, S.; CHARVÉRIAT, P.; LACORTE, J. M.; ESPIE, M. Anti-Müllerian hormone in breast cancer patients treated with chemotherapy: a retrospective evaluation of subsequent pregnancies. **Reprod Biomed Online**, 2016.

HANSEN, K.R.; HODNETT, G.M.; KNOWLTON, N.; CRAIG, L.B. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. **Fertility and Sterility**, v.95, p.170–175, 2011.

HIROBE, S.; HE, W.W.; LEE, M.M.; DONAHOE, P.K. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. **Endocrinology**, v. 131, p.854–862, 1992.

HUTSON, J.; IKAWA, H.; DONAHOE, P.K. The ontogeny of Müllerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. **Journal of Pediatric Surgery**, v.16, p.822–827, 1981.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D. M.; NEUDER, L. M.; IRELAND, J. L. H.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W.; TEMPELMAN, R. J.; FERRIS, T.; ROUDEBUSH, W. E.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. **Journal of Dairy Science**, v. 98, (5) p. 3036–3045, 2015.

JOSSO, N.; CLEMENTE, N.; GOUEDARD, L. Anti-Mullerian hormone and its receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.179, p.25-32, 2001.

JOST, A. Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin. III. role des gonades foetales dans la differenciation sexuelle somatique. **Arch Anat Mi- crosc Morphol**

Exp, v. 36, p.271–315, 1947.

KEDEM-DICKMAN, A.; MAMAN, E.; YUNG, Y.; YERUSHALMI, G. M.; HEMI, R.; HANOCHI, M.; DOR, J.; HOURVITZ, A. Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes **Reproductive BioMedicine Online**, v.24, p. 540-546, 2012.

Kelsey, T. W.; Wright, P.; Nelson, S.M.; Anderson, R. A.; Wallace, W. H. B. (2011) A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. **PLoS ONE**, v. 6(7), 2011.

KEVENAAR, M.E.; MEERASAHIB, M.F.; KRAMER, P. VAN DE LANG-BORN, B.M.; DE JONG, F.H.; GROOME, N.P.; THEMMEN, A.P.; VISSER, J.A. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. **Endocrinology**, v.147, p.3228–3234, 2006.

KOK, H.S.; VAN ASSELT, K.M.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; PEETERS, P.H.; WIJMENGA, C. Genetic studies to identify genes underlying menopausal age. **Human Reproduction Update**, v.11, p.483–493, 2005.

LA MARCA, A.; GIULINI, S.; ORVIETO, R.; DE LEO, V.; VOLPE, A. Anti-Mullerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. **Human Reproduction**, v.20, p.1569-1572, 2005.

LA MARCA, A.; VOLPE, A. Anti-mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? **Clinical Endocrinology**, v.64, p.603-610, 2006.

LEE, M.M.; DONAHOE, P.K.; HASEGAWA, T.; SILVERMAN, B.; CRIST, G.B.; BEST, S.; HASEGAWA, Y.; NOTO, R.A.; SCHOENFELD, D.; MACLAUGHLIN, D.T. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.81, p.571-576, 1996.

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 Veterinary Research**, v. 8:118, 2012.

MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v.21, p.200–214, 2000.

MILAKOVIC, T. T.; HORVAT, L. P.; AVLOVIC, K. C.; SEVERINSKI, N. S.; VILASIC, H.; VLASTELIC, I.; LJILJAK, D.; BADOVINAC, A. R. Follicular fluid anti-Müllerian hormone: a predictive marker of fertilization capacity of MII oocytes. **Arch Gynecol Obstet** v. 291, p.681–687, 2015.

MONNIAUX, D.; BARIL, G.; LAINE, A.; JARRIER, P.; POULIN, N.; COGNIÉ, J.; FABRE, S. Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat **Reproduction**, v.142, p. 845–854, 2011

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**, v. 51(1), p.158-64, 2016.

NELSON, S.M.; YATES, R.W.; LYALL, H.; JAMIESON, M.; TRAYNOR, I.; GAUDOIN, M.; MITCHELL, P.; AMBROSE, P.; FLEMING, R. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. **Human Reproduction**, v.24, p.867–875, 2009.

REY, R.; LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; BEDECARRAS, P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.211, p.21–31, 2003.

SALMON, N.A.; HANDYSIDE, A.H.; JOYCE, I.M. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. **Developmental Biology**, v.266, p.201-208, 2004.

SCHOOT, D.C.; HARLIN, J.; SHOHAM, Z.; MANNAERTS, B.M.; LAHLOU, N.; BOUCHARD, P.; BENNINK, H.J.; FAUSER, B.C. Recombinant human follicle-stimulating

hormone and ovarian response in gonadotropin-deficient woman. **Human Reproduction**, v.9, p.1237-1242, 1994.

SEIFER, D.B.; MACLAUGHLIN, D.T.; CHRISTIAN, B.P.; FENG B.; SHELDEN, R.M. Early follicular serum Müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. **Fertility and Sterility**, v.77, p.468–471, 2002.

SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA, L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; DRESCH, A. R.; VERSTEGEN, J. P.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, (1) p. 169–178, 2015.

SOWERS, M.R.; EYVAZZADEH, A.D.; MCCONNELL, D.; YOSEF, M.; JANNAUSCH, M.L.; ZHANG, D.; HARLOW, S.; RANDOLPH, J.F. JR. Anti-Müllerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, p.3478–3483, 2008.

TE VELDE, E.R.; PEARSON, P.L. The variability of female reproductive ageing. **Human Reproduction Update** v.8, p.141–154, 2002.

TORRES-ROVIRA, L.; SUCCU, S.; PASCIU, V. MANDA, M. E.; GONZALES-BULNES, A.; LEONI, G. G.; PENNINO, M.; SPEZZIGU, A.; GALLUS, M.; DATTENA, M.; MONNIAUX, D., NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Postnatal Pituitary and Follicular Activation: A Revisited Hypothesis in a Sheep Model. **Reproduction**, 2015.

ULIANI, R. C. Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-b e Doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação. Dissertação – UNESP Botucatu – Botucatu, 2012.

VAN DISSELDORP, J.; LAMBALK, C.B.; KWEE, J.; LOOMAN, C.W.; EIJKEMANS, M.J.; FAUSER, B.C.; BROEKMANS, F.J. Comparison of inter- and intra-cycle variability of

anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. **Human Reproduction**, v.25, p.221–227, 2010.

VAN ROOIJ, I.A.; BROEKMANS, F.J.; TE VELDE, E.R.; FAUSER, B.C.; BANCSI, L.F.; JONG, F.H.; THEMMEN, A.P. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Human Reproduction**, v.17, p.3065–3071, 2002.

VAN ROOIJ, I.A.; TONKELAAR, I.; BROEKMANS, F.J.; LOOMAN, C.W.; SCHEFFER, G.J.; DE JONG, F.H.; THEMMEN, A.P.; TE VELDE, E.R. Anti-Müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. **Menopause**, v.11, p.601–606, 2004.

VAN ROOIJ, I.A.J.; BROEKMANS, F.J.M.; SCHEFFER, G.J.; LOOMAN, C.W.; HABBEMA, J.D.; DE JONG, F.H.; FAUSER, B.J.; THEMMEN, A.P.; TE VELDE, E.R. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. **Fertility and Sterility**, v.83, p.979–987, 2005.

VERNUNFT, A.; SCHWERHOFF, M.; VIERGUTZ, T.; DIEDERICH, M.; KUWER, A. Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. **J. Reprod. Dev.** v.61, p.74–79, 2015.

WALLACE, W. H. B.; KELSEY, T. W. Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. **PLoS ONE**, v. 5(1), 2010.

WEENEN, C.; LAVEN, J.S.; VON BERGH, A.R.; CRANFIELD, M.; GROOME, N.P.; VISSER, J.A.; KRAMER, P.; FAUSER, B.C.; THEMMEN, A.P. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary; potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.77-83, 2004.

YATES, A.P.; RUSTAMOV, O.; ROBERTS, S.A.; LIM, H.Y.; PEMBERTON, P.W.; SMITH, A.; NARDO, L.G. Anti-Müllerian hormone-tailored stimulation protocols

improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. **Human Reproduction**, v.26, p.2353–2362, 2011.

YILMAZ, O. T.; TOYDEMİR, T. S. F.; KIRSAN, I.; UCMAK, Z. G.; KARACAM, E. C. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches. **Vet Res Commun**, v. 39, p.159–162, 2015.

Capítulo II

O artigo redigido neste trabalho segue as normas do periódico **Theriogenology**, ISSN 0093-691X, fator de impacto 1.838, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2016. Link para consulta do “Guia para autores”, com as normas para redação de artigos: <http://www.theriojournal.com/content/authorinfo>

Hormônio Anti-Mülleriano: marcador do envelhecimento ovariano em éguas?

Renata C. Uliani^a, Alan J. Conley^b, Marco A. Alvarenga^a

^aDepartamento de Reprodução Animal, FMVZ – UNESP Botucatu – São Paulo, Brasil.

^bDepartment of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, Davis, California, USA.

Autor correspondente: Renata Cristina Uliani

e-mail: renatauliani@fmvz.unesp.br

Resumo

O hormônio Anti-Mülleriano (AMH) tem sido proposto como marcador fidedigno da reserva ovariana, estimando a expectativa de vida reprodutiva remanescente da fêmea. Atualmente, em reprodução assistida humana, tem sido utilizado para determinar o tratamento a ser seguido e conduzir a expectativa da paciente. Em equinos, pouco se sabe sobre a produção de AMH e sua importância clínica. Sendo assim, o objetivo principal deste estudo foi descrever a concentração de AMH ao longo da vida das éguas e avaliar sua concentração após ovariectomia, em busca de relacionar AMH com reserva folicular ovariana. Foram realizados 2 experimentos. Experimento 1: Foi realizada a colheita de sangue de 1058 éguas Quarto de Milha, de 1 dia a 33 anos de idade, com o objetivo de relacionar AMH com a idade da égua. Experimento 2: 13 éguas (6 jovens e 7 idosas) foram submetidas a duas cirurgias de ovariectomia com intervalo médio de 111 dias. Amostras de sangue para dosagem de AMH foram retiradas imediatamente antes da primeira cirurgia e diariamente durante 15 dias. Na segunda cirurgia, amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da cirurgia e 15 dias após a mesma. AMH foi dosado por técnica de ELISA (Equine AMH

ELISA; Ansh Labs, Webster, TX, USA). Testes não paramétricos foram utilizados para confrontar as medianas dos níveis de AMH entre diferentes categorias de idade e médias dos períodos pré e pós operatórios. A idade foi responsável por somente 5% da variabilidade dos níveis de AMH. A concentração média foi mantida desde o nascimento até aproximadamente 18 anos de vida, quando começa a cair lentamente. A queda se acentua com aproximadamente 23 anos de idade e chega a zero aos 30 anos. A concentração de AMH após ovariectomia unilateral apresenta uma queda abrupta no pós operatório imediato. Após intervalo entre primeira e segunda cirurgia, as éguas apresentaram uma recuperação na concentração sérica de AMH. Em conclusão, AMH não apresenta relação com idade em éguas. Mais trabalhos precisam ser realizados com intuito de relacionar AMH com atividade folicular ovariana em éguas.

Palavras-chave: Folículo ovariano, população folicular, folículo pré-antral, célula da granulosa, reserva ovariana.

1. Introdução

Nosso atual conhecimento da função reprodutiva feminina supõe que o ovário contém um número finito de oócitos dentro dos folículos primordiais, e que seu esgotamento anuncia a perda da fertilidade feminina que acontece com o avançar da idade [1]. Essa população de folículos primordiais é formada durante a vida fetal e uma pequena parte dela é ativada e estimulada a crescer diariamente durante a vida reprodutiva de uma fêmea, incluindo a infância, sendo a grande maioria destinada a sofrer atresia [2]. Antes da puberdade, todos os folículos em crescimento vão se tornar atresícos e, após a puberdade, somente um por mês vai escapar deste fato e atingir a ovulação.

A mensuração precisa da reserva ovariana tem sido buscada há tempos em medicina reprodutiva, causando um grande aumento nas pesquisas neste campo. Pela dificuldade em acessar a população de oócitos/folículos existentes nos ovários, marcadores endócrinos e ultrassonográficos são utilizados como uma forma indireta de acessar a reserva ovariana. Com este intuito, já foram testados os hormônios FSH,

LH, progesterona, inibina e estrógeno, mas nenhum deles foi capaz de produzir informações sobre a população de folículos existente nos ovários [3].

O hormônio Anti-Mülleriano (AMH) é expresso nas células da granulosa de folículos em desenvolvimento inicial, quando ainda não são dependentes de gonadotropinas, mas não pelos folículos primordiais. Inibe o recrutamento dos folículos primordiais da população ovariana e diminui a responsividade ao FSH [4]. Atualmente, a avaliação da reserva ovariana antes da concepção assistida é a indicação mais estabelecida para a mensuração do AMH em humanos, sendo utilizado rotineiramente antes da escolha do tratamento [5]. Como AMH tem sido correlacionado com o número de oócitos remanescentes nos ovários, sua avaliação permite escolher o melhor tratamento e orientar a expectativa do paciente [6].

O declínio no AMH durante os anos reprodutivos tardios é um dos achados mais estabelecidos, aumentando assim a possibilidade de prever a menopausa [7] e implicando na expectativa de vida reprodutiva remanescente da mulher.

O sinal inicial de envelhecimento reprodutivo na égua é o início da diminuição da ciclicidade reprodutiva com elevadas concentrações de FSH. Pouco se sabe sobre AMH em éguas. Assim como em mulheres, os níveis de AMH não variaram durante as fases do ciclo estral, nem durante os meses de gestação. Em ovários equinos, a expressão de AMH foi maior em folículos pequenos em crescimento e em folículos antrais pequenos com reduzida expressão de AMH em folículos antrais maiores [8]. Concentrações plasmáticas de AMH foram menores em éguas velhas quando comparadas com éguas de meia-idade (mediana, 0,21 e 0,47 ng/ml respectivamente) [9]. Éguas jovens (mediana, 0,29 ng/ml) não diferiram de éguas idosas e éguas de meia-idade na produção do AMH.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar se a concentração sérica de AMH em éguas tem relação com a idade. 2) observar o perfil do AMH após ovariectomia unilateral e completa de éguas jovens e idosas.

2. Material e métodos

Este experimento foi aprovado pela comissão de ética da FMVZ UNESP – Campus de Botucatu, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA (Protocolo CEUA 27/2016).

2.1 Experimento 1 - Relação dos níveis séricos do hormônio Anti-Mülleriano com a idade

Foram utilizadas 1058 éguas não gestantes da Raça Quarto de Milha, residentes em diversos haras, com ótimo estado de condição corporal. As colheitas de sangue para dosagem hormonal de AMH foram realizadas durante a mesma estação de monta. Foi realizada uma única colheita de sangue de todas as fêmeas presentes em cada propriedade. Todos os animais tiveram sua idade confirmada em seu registro de nascimento (Figura 1). O sangue de 43 animais foi coletado no dia de seu nascimento.

A colheita de sangue foi realizada da veia jugular com material de colheita a vácuo. Após o procedimento de colheita foi realizada a centrifugação do sangue a 1500 x g durante 10 minutos para a obtenção do soro. O soro sanguíneo das éguas foi acondicionado em freezer -20°C até o processamento das amostras.

As concentrações séricas de AMH foram determinadas pelo Clinical Endocrinology Laboratory (University of Califórnia – UC Davis – USA) usando kit de ELISA disponível comercialmente (Equine AMH ELISA; Ansh Labs, Webster, TX, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

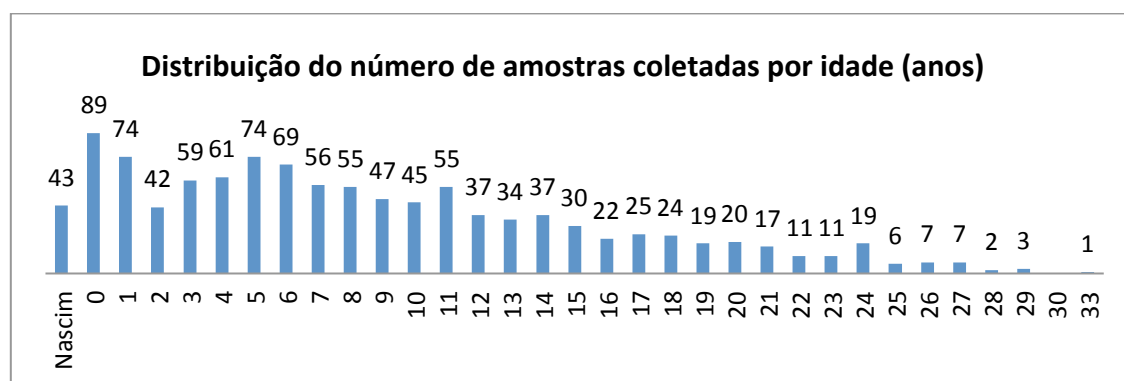


Figura 1 – Distribuição das éguas coletadas, de acordo com os anos de vida.

2.2 Experimento 2 – Cirurgias de ovariectomia em éguas jovens e idosas

Seis éguas jovens (entre 5 e 8 anos) e 6 éguas idosas (≥ 18 anos) foram submetidas a ovariectomia unilateral a fim de avaliar a variação do hormônio Anti-Mülleriano sistemicamente após a redução de um ovário. As éguas foram avaliadas semanalmente e, após apresentarem sinais de anestro fisiológico, as éguas foram

novamente submetidas à ovariectomia, para retirada do ovário remanescente, a fim de comparar a produção ovariana de AMH entre os dois ovários. Os animais selecionados apresentavam bom escore corporal, ciclicidade reprodutiva no momento da primeira cirurgia e anestro na segunda cirurgia. Todas as éguas estavam livres de administração de hormônios durante a estação de monta.

Durante o período do experimento, os animais foram alimentados diariamente com 4 kg de ração laminada, 6 kg de feno de tifton e sal mineral e água *ad libitum*.

As cirurgias para ovariectomia foram realizadas com o animal em estação, iniciando pelo ovário direito. O animal foi previamente sedado com Detomidina (20µg/Kg/IV). Anti-inflamatório, antibiótico e soro antitetânico eram aplicados anteriormente à cirurgia.

Após tricotomia da região do flanco, foi realizada anestesia local com 60 mL de lidocaína 2% no subcutâneo da linha de incisão, localizada no meio do espaço entre a última costela e a tuberosidade coxal. A cirurgia foi realizada com incisão vertical de aproximadamente 15 cm na pele e subcutâneo, seguida de afastamento das camadas musculares no sentido das fibras. Após perfuração do peritônio, o ovário foi localizado e exteriorizado através da linha de incisão. O pedículo ovariano foi ligado e o ovário removido. A incisão foi fechada em duas camadas de sutura contínua na musculatura, uma de aproximação do subcutâneo e pele. A sutura era higienizada diariamente até a retirada dos pontos 12 a 14 dias após a cirurgia.

O Sangue das éguas foi coletado imediatamente antes da primeira cirurgia e diariamente durante 15 dias após a retirada do primeiro ovário, para dosagem de AMH. Na segunda cirurgia, o sangue foi coletado imediatamente antes da cirurgia e 15 dias após a mesma. A colheita e processamento das amostras foi realizado da mesma forma que no experimento 2.1.

2.3 Análise estatística

A distribuição das concentrações de AMH para cada égua foi verificada utilizando-se testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas. No experimento 1, determinou-se a curva de tendência que melhor representou os valores de AMH observados em éguas de diferentes idades, verificando-se qual modelo proporcionou um maior coeficiente R^2 . Posteriormente, as éguas foram classificadas em intervalos de 5 anos de idade e as diferenças entre as medianas das concentrações

de AMH dentre cada grupo foi verificada com o teste de Kruskal-Wallis. Para o experimento 2, o teste de Friedman foi utilizado para confrontar as diferenças entre as medianas de AMH das éguas entre os períodos pré e pós cirúrgicos e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para verificar diferenças entre as medianas dos grupos de éguas jovens e idosas entre os mesmos períodos. Todas as análises adotaram nível de significância de 0,05 e foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 5.0.

3. Resultados

Experimento 1

O coeficiente de variação intra e inter-ensaio para as concentrações de AMH foram 3,1 e 7,8% respectivamente.

O nível sérico de AMH de éguas no dia do nascimento teve uma grande variação individual. O menor valor obtido foi 0,264 ng/mL e o maior, 15,475 ng/mL. Em média, as potras no dia do nascimento apresentaram $2,6 \text{ ng/mL} \pm 2,1 \text{ ng/mL}$ de AMH.

O AMH sistêmico de 1058 éguas Quarto de Milha de diferentes idades variou com a idade ($R^2 = 0,0502$). As concentrações são altas ao nascimento, apresentam uma pequena diminuição nos primeiros anos de vida e ficam praticamente estáveis dos 4 aos 18 anos de idade quando começam a decair de forma lenta. Aos 23 anos, a queda no AMH sistêmico se acentua, sendo próximo de zero aos 30 anos de idade (Figura 2).

O coeficiente R^2 para o modelo utilizado foi de 0,05 demonstrando que somente 5% da variabilidade nos níveis de AMH foi explicada pela idade.

Ao dividir as éguas em grupos de 5 anos de idade, foi possível observar com mais clareza a variação do AMH com a idade (Figura 3). Éguas de 0-5 anos apresentaram mediana de AMH de 1,8 ng/mL. Éguas de 5-10 anos apresentaram 2,4 ng/mL. 10-15 anos, mediana 2,5 ng/mL. 15-20 anos, mediana 2,2 ng/mL. 20-25 anos, mediana 1,8 ng/mL. > 25 anos, mediana 0,3 ng/mL.

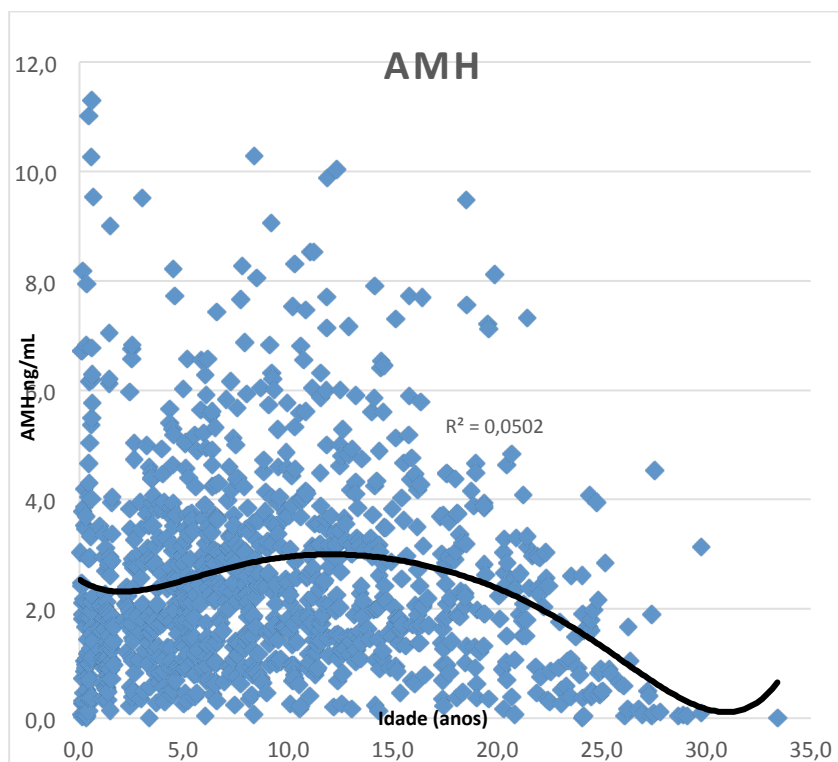


Figura 2 – Gráfico da variação da concentração sistêmica de hormônio anti-Mülleriano com a idade da égua. Cada ponto representa uma das éguas. Uma linha de tendência foi criada.

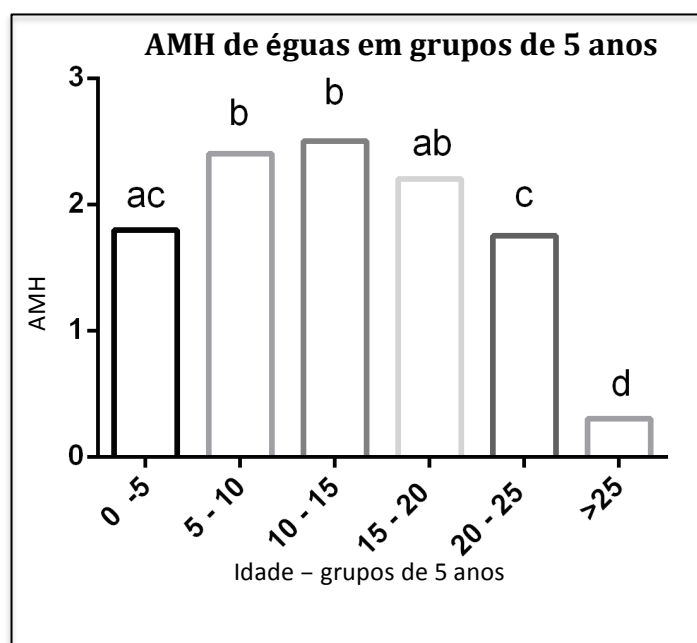


Figura 3 – Mediana do AMH (ng/mL) de éguas em grupos de 5 anos. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$). 0-5 anos, $n=399$; 5-10 anos, $n=272$; 10-15 anos, $n=193$; 15 a 20 anos, $n=110$; 20 a 25 anos, $n=64$; >25 anos, $n=20$.

Experimento 2

A idade média das éguas jovens foi 6 anos ($n=6$) e das éguas idosas foi 18,7 anos ($n=7$). Somente duas éguas, uma jovem e uma idosa, não estavam em anestro no momento da segunda cirurgia. O intervalo médio entre a primeira e a segunda cirurgia de cada égua foi de 111 ± 24 dias. Para éguas jovens, o intervalo entre as cirurgias foi de 113 ± 18 dias e para idosas 109 ± 30 dias. O intervalo mais curto foi de 88 dias e o mais longo de 143 dias.

Para a avaliação estatística deste momento, uma égua foi retirada da avaliação (animal 12). Trata-se de um animal idoso submetido à eutanásia após trauma. O sangue foi retirado anteriormente à eutanásia e seu ovário retirado imediatamente após esta. Porém não foi possível realizar a colheita do momento 15 dias após a segunda cirurgia.

A média dos valores de AMH Foi diferente entre os momentos pré-primeira cirurgia (Pre-hemi = $0,996$ ng/mL) e pós primeira cirurgia (Pós-hemi = $0,414$ ng/mL), mas o momento pré-primeira não diferiu do momento pré-segunda cirurgia (Pré-OVX = $0,735$ ng/mL). Os momento pós-primeira e pré-segunda não diferiram estatisticamente. Os momentos pós primeira cirurgia e pós segunda cirurgia (OVX = $0,049$ ng/mL) não foram estatisticamente diferentes (Figura 5).

Os níveis séricos de AMH reduziram 58% 15 dias após a primeira cirurgia. No momento da segunda cirurgia, as éguas apresentaram uma recuperação de aproximadamente 55% da queda observada após a primeira cirurgia. Quando os animais foram divididos em grupos de idades (jovens e idosas), éguas idosas retomaram 95% da produção de AMH, enquanto éguas jovens recuperaram apenas 13% do AMH produzido pelo ovário remanescente (Figura 6).

Quando as éguas foram divididas em grupos de idades (jovens e idosas), não houve diferença dos níveis séricos de AMH entre os grupos de idades nos momentos observados.

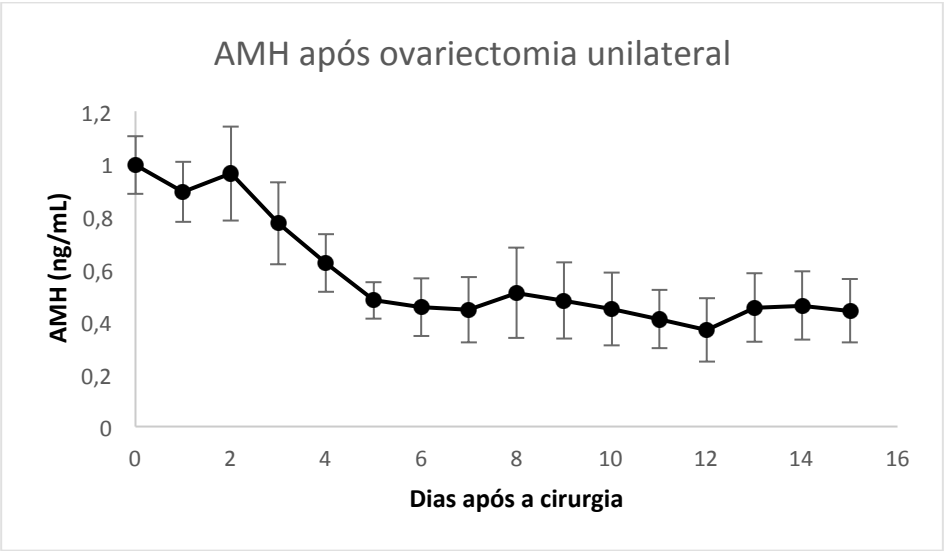


Figura 4: Dosagem de AMH diariamente após a cirurgia de ovariectomia unilateral.

Tabela 1: Média e desvio padrão dos níveis séricos de hormônio Anti-Mülleriano de éguas submetidas a ovariectomia unilateral e total. Valores pré e pós cirurgias.

ID	Idade (anos)	Pre-Hemi	Pos-Hemi	Pre-OVX	Pos-OVX
Média	12,85	0,996	0,414	0,735	0,049
Desvio Padrão		0,366	0,36	0,442	0,043

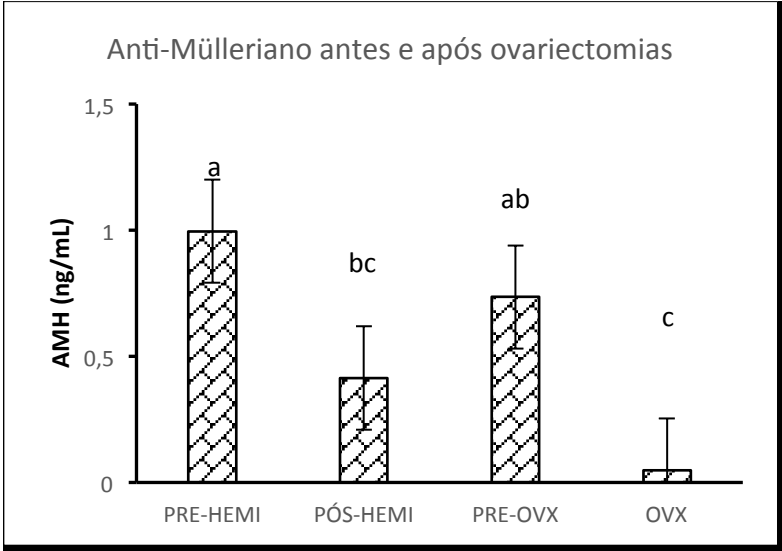


Figura 5: Concentração média sistêmica de AMH antes e após as cirurgias de ovariectomia (pré-primeira cirurgia = Pre-hemi; pós primeira cirurgia = Pós-hemi, 15 dias após a primeira cirurgia; pré-segunda cirurgia = Pré-OVX; pós segunda cirurgia = OVX, 15 dias após a segunda cirurgia). Em todos os momentos, n=12. Letras diferentes representam diferença estatística ($P<0,05$).

Tabela 2: Níveis séricos de hormônio Anti-Mülleriano (ng/mL) das 13 éguas submetidas a ovariectomia unilateral e total. Média e desvio padrão pré e pós cirurgias de éguas jovens (≤ 8 anos) e idosas (≥ 18 anos) (pré-primeira cirurgia = Pre-hemi; pós primeira cirurgia = Pós-hemi; pré-segunda cirurgia = Pré-OVX; pós segunda cirurgia = OVX).

	Animal	Idade (anos)	Pre-Hemi	Pos-Hemi	Pre-OVX	Pos-OVX
JOVENS	1	3	0,829	0,433	0,412	0,018
	2	7	1,12	0,103	0,261	0,023
	3	8	1,113	0,534	0,873	0,042
	4	6	1,336	0,985	0,354	0,008
	5	4	0,812	0,154	0,566	0,019
	6	8	0,987	0,308	0,526	0,139
	MÉDIA	6	1,033	0,42	0,499	0,04
	DESVIO PADRÃO	1,91	0,199	0,321	0,215	0,05
IDOSAS	7	18	0,285	0,003	0,298	0,027
	8	20	0,443	0,39	0,807	0,052
	9	18	1,175	0,61	1,428	0,039
	10	18	1,425	0,207	0,994	0,043
	11	20	0,794	0,21	0,283	0,04
	12	20	1,569	1,251	1,392	-
	13	18	1,058	0,193	1,367	0,132
	MÉDIA	18,71	0,964	0,409	0,938	0,06
	DESVIO PADRÃO	1,25	0,482	0,417	0,498	0,04

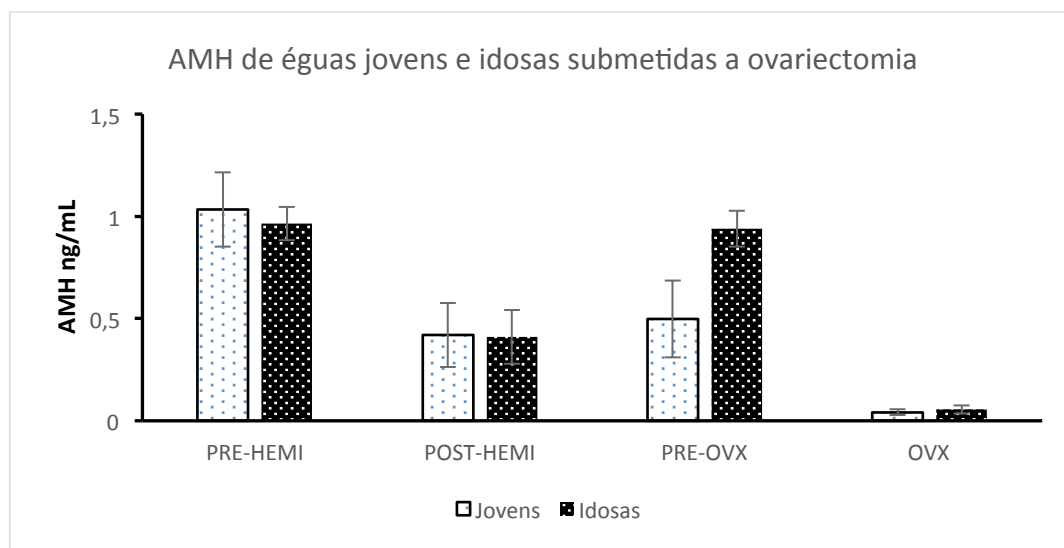


Figura 6: Concentração média sistêmica de AMH antes e após as cirurgias de ovariectomia de éguas jovens (≤ 8 anos, $n=6$) e idosas (≥ 18 anos, $n=6$) (pré-primeira cirurgia = Pre-hemi; pós primeira cirurgia = Pós-hemi; pré-segunda cirurgia = Pré-OVX; pós segunda cirurgia = OVX).

4. Discussão

Fortes evidências mostraram que o AMH não tem correlação com idade, como é sugerido para mulheres e para éguas [10, 11]. No experimento 1, a curva de tendência mostra que a égua passa praticamente a vida toda com nível médio de AMH e a queda acontece somente nos últimos anos de vida. Desta forma, seria possível afirmar que a reserva ovariana é mantida durante toda a vida e que é utilizada somente nos anos mais tardios. Afirmar que o AMH representa reserva ovariana seria contraditório à informação já bem estabelecida, na qual a fêmea nasce com número finito de oócitos e utiliza em ciclos mensais durante toda a vida [12, 13]. É possível que AMH seja representativo de atividade ovariana ao invés de reserva folicular ovariana [14,15]. Apesar do grande interesse observado em mensuração de AMH em mulheres, até o momento não existem trabalhos relacionando AMH com fertilidade em programas de reprodução assistida em éguas.

O envelhecimento reprodutivo é iniciado aproximadamente aos 20 anos de idade em éguas. Relatos anteriores mostraram que 19% das éguas não apresentaram crescimento folicular acima de 20 anos, e 37% não apresentaram atividade folicular após os 24 anos [16]. 50% das éguas idosas acima de 20 anos apresentaram ovulações subsequentes, enquanto 13% apresentaram intervalo inter-ovulatório mais longo e 13% tiveram apenas uma ovulação num período de 80 dias [17]. A diminuição de atividade folicular ovariana pode justificar a queda acentuada do AMH, demonstrada a partir dos 23 anos de idade no Experimento 1.

Ao nascimento, foi observada uma grande variação individual dos níveis de AMH, com indivíduos que produziram muito AMH e outros com produção mínima.

No Experimento 2, após a ovariectomia unilateral, o esperado seria a queda do AMH pela metade, representando a deleção de metade da reserva ovariana existente. Salvo variações individuais, o AMH foi reduzido pela metade após a primeira cirurgia, mas apresentou uma retomada parcial inesperada nos níveis séricos após intervalo de 111 dias. Até hoje, não encontramos descrição de multiplicação oocitária durante a vida das fêmeas. O conhecimento que se tem é que o número de folículos é estabelecido na vida fetal e o pool de folículos existente nos ovários é utilizado durante toda a sua vida, inclusive durante a vida fetal. Desta forma, não seria esperado uma recuperação dos níveis séricos de AMH em qualquer situação de perda da reserva.

Não existem trabalhos com a ovariectomia unilateral de mulheres jovens e saudáveis, porém um trabalho realizou cistectomia em ovários de mulheres de idade média de 30 anos e observou queda no AMH no período pós operatório (4 dias após a cirurgia) e concluiu que a cirurgia provocou diminuição da reserva ovariana pela observação na queda imediata do AMH [18]. Neste trabalho não foi realizada avaliação do hormônio em intervalo maior que 4 dias.

A capacidade de recuperação no AMH pode ser justificada pela retomada do número de folículos primários e secundários em desenvolvimento no ovário remanescente estimulada por um possível mecanismo compensatório apresentado pelo ovário remanescente. Um número médio de folículos é estimulado a entrar nas ondas foliculares de cada vez. Inicialmente o número de folículos em crescimento se dividia entre os dois ovários e, posteriormente, passou a ser produzido por um ovário só. É possível que o efeito inibitório do AMH sobre os folículos primordiais tenha diminuído com a queda do AMH após a primeira cirurgia, permitindo assim, posteriormente, o crescimento de um número maior de folículos no ovário remanescente, por um possível mecanismo compensatório.

Após a segunda cirurgia, a dosagem do AMH é praticamente zero, reforçando a afirmação de que AMH é produzido exclusivamente pelos ovários.

Mais estudos precisam ser realizados para verificar a relação de AMH com qualidade oocitária e atividade folicular ovariana em éguas.

5. Conclusões

Em conclusão, o trabalho mostrou fortes evidências de que o AMH não tem correlação com idade em éguas.

A ovariectomia provocou queda no AMH e uma retomada parcial após intervalo entre cirurgias. O AMH é produzido exclusivamente pelos ovários, assim como demonstrado em outras espécies.

Apoio financeiro: Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo FAPESP 2014/13777-6 – auxílio à pesquisa regular; e Processo FAPESP 2014/13191-1 – bolsa de doutorado)

Referências

- [1] WALLACE, W. H. B.; Kelsey, T. W. Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. **PLoS ONE** 5(1): e8772. doi:10.1371/journal.pone.0008772, 2010.
- [2] MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v.21, p.200–214, 2000.
- [3] VAN ROOIJ, I.A.J.; BROEKMANS, F.J.M.; SCHEFFER, G.J.; LOOMAN, C.W.; HABBEMA, J.D.; DE JONG, F.H.; FAUSER, B.J.; THEMME, A.P.; TE VELDE, E.R. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. **Fertility and Sterility**, v.83, p.979–987, 2005.
- [4] REY, R.; LUKAS-CROISIER, C.; LASALA, C.; BEDECARRAS, P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.211, p.21–31, 2003.
- [5] ANDERSON, R.A.; NELSON, S.M.; WALLACE, W.H.B. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: When and for whom is it indicated? **Maturitas** v.71, p. 28-33, 2012.
- [6] NELSON, S.M.; YATES, R.W.; LYALL, H.; JAMIESON, M.; TRAYNOR, I.; GAUDIN, M.; MITCHELL, P.; AMBROSE, P.; FLEMING, R. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. **Human Reproduction**, v.24, p.867–875, 2009.
- [7] VAN ROOIJ, I.A.; TONKELAAR, I.; BROEKMANS, F.J.; LOOMAN, C.W.; SCHEFFER, G.J.; DE JONG, F.H.; THEMME, A.P.; TE VELDE, E.R. Anti-Müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. **Menopause**, v.11, p.601–606, 2004.
- [8] ALMEIDA, J.; BALL, B.A.; CONLEY, A.J.; PLACE, N.J.; LIU, I.K.M.; SCHOLTZ, E.L.; MATHEWSON, L.; STANLEY, S.D.; MOELLER, B.C. Biological

and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. **Theriogenology**, v.76, p.1393–1403, 2011.

[9] CLAES, A.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; ESTELLER-VICO, A.; KALMAR, J. J.; CONLEY, A. J.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p. 537–541, 2015.

[10] TANIGUCHI, F.; SAKAMOTO, Y.; YABUTA, Y.; AZUMA, Y.; HIRAKAWA, E.; NAGIRA, K.; UEGAKI, T.; DEURA, I.; HATA, K.; HARADA, T. Analysis of pregnancy outcome and decline of anti-Müllerian hormone after laparoscopic cystectomy for ovarian endometriomas. **J. Obstet. Gynaecol. Res.** v. 42, No. 11, p.1534–1540, 2016.

[11] CLAES, A. N. J.; BALL, B. A. Biological Functions and Clinical Applications of Anti-Müllerian Hormone in Stallions and Mares. **Vet Clin Equine**, in press, 2016.

[12] GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. 2 ed. Madison: Equiservices, 1992. 642p

[13] JAMIL, Z.; FATIMA, S. S.; AHMED, K.; MALIK, R. Anti-Müllerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers **Disease Markers**, v. 2016, Article ID 5246217, 9 pages.

[14] BROER, S. L.; BROEKMANS, F. J. M.; LAVEN, J. S. E.; FAUSER, B. C. J. M. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. **Human Reproduction Update**, Vol.20, No.5 pp. 688–701, 2014

[15] MECZEKALSKI, B.; CZYZYK, A.; KUNICKI, M.; PODFIGURNA-STOPA, A.; PLOCIENNIK, L.; JAKIEL, G.; MACIEJEWSKA-JESKE, M.; LUKASZUK, K. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment **J Endocrinol Invest** . Published online June 2016

- 388 [16] CARNEVALE, E. M. The mare model for follicular maturation and reproductive
389 aging in the woman. **Theriogenology**, v. 69 p. 23–30, 2008.
- 390
- 391 [17] Carnevale, E. M.; Bergfelt, D. R.; Ginther, O. J. Follicular activity and
392 concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. **Animal**
393 **Reproduction Science**, v. 35, p. 231-246, 1994.
- 394
- 395 [18] CHUN, S.; CHO, H. J.; JI, Y. I. Comparison of early postoperative decline of
396 serum anti-Müllerian hormone levels after unilateral laparoscopic ovarian cystectomy
397 between patients categorized according to histologic diagnosis. **Taiwan J Obstet**
398 **Gynecol.** v. 55, No 5, p. 641-645, 2016