

## **Evolución de la expresión de Hormona Anti-Mulleriana (AMH) durante la persistencia folicular a largo plazo en bovinos.**

Díaz, P.U.; Leiva C.J.; Garzón, I.; Gareis, N.; Notaro, U.; Rey, F.; Salvetti, N.R.; Ortega, H.H.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina  
pablourield@hotmail.com

PICT 2008 - “Participación de la superfamilia del Transforming Growth Factor Beta (TGF-Beta) en la patogenia de desórdenes reproductivos de origen ovárico en bovinos”.

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con dispositivos de liberación lenta de progesterona (P4) produce concentraciones intermedias de esta hormona, las cuales pueden prolongar el desarrollo de los folículos dominantes induciendo persistencia folicular. Este estado produce una reducción de la fertilidad a la inseminación y una alta incidencia de pérdidas embrionarias por reanudación prematura de la meiosis en los ovocitos. Además, la persistencia folicular es uno de los múltiples factores que intervienen en la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica (EQO), en este sentido las concentraciones intermedias de P4 inducen un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de LH y así la ovulación, llevando a la prolongación del crecimiento, persistencia de los folículos dominantes e incremento de las concentraciones de estrógenos periféricas<sup>1</sup>. En la actualidad se reconoce la importancia de los factores locales producidos a nivel ovárico como actores importantes en los mecanismos que controlan el reclutamiento de folículos primordiales, proliferación de células de la granulosa y de la teca, maduración del ovocito, esteroidogénesis y ovulación. La AMH (*Anti Mullerian Hormone*) es un miembro de la superfamilia del *Transforming Growth Factor  $\beta$* , secretada en la hembra exclusivamente por células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños sanos. Esta hormona inhibe la activación y enlentece el crecimiento de folículos primarios. También, puede inhibir la estimulación de la enzima aromataasa y del receptor de LH inducida por FSH en células de la granulosa de folículos antrales. Además, existe una correlación inversa entre los niveles de P4 y AMH.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto es que nos planteamos estudiar mediante inmunohistoquímica (IHQ) la evolución de la expresión de AMH en folículos ováricos en un modelo de persistencia folicular a largo plazo. El protocolo de sincronización fue G6G con modificaciones, después de esto los animales fueron divididos en tres grupos hasta los 5, 10 y 15 días de persistencia (P5, P10 y P15; n=5/grupo). Estos grupos fueron mantenidos con niveles subluteales de P4 (dispositivo intravaginal) y se realizó, en cada grupo, ovariectomía bilateral a los 5, 10 y 15 días de persistencia. Sobre cortes histológicos de los ovarios obtenidos en las cirugías se realizó la técnica de IHQ indirecta. Se analizaron imágenes de las distintas categorías de folículos de todos los grupos<sup>2</sup>. Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 11.0.1 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), utilizando un análisis de varianza factorial, modelo lineal general (MLG), univariante para evaluar el efecto que tuvo el tiempo y la categoría folicular, así como su interacción, sobre la expresión de AMH en los tres grupos experimentales.

Se encontró un efecto positivo de la categoría folicular sobre la expresión proteica de AMH ( $p < 0,001$ ), siendo mayor en la categoría antrales respecto de los folículos persistentes y a las demás categorías analizadas ( $p < 0,05$ ). Además, la expresión de AMH en las categorías de folículos preantrales pequeños y grandes fue mayor en relación a aquella encontrada en los folículos primarios, atrésicos y persistentes ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, no se encontró un efecto positivo del tiempo ( $p = 0,288$ ), ni una interacción entre categoría folicular y tiempo ( $p = 0,192$ ), sobre la expresión de AMH a partir de los 5 días de persistencia.

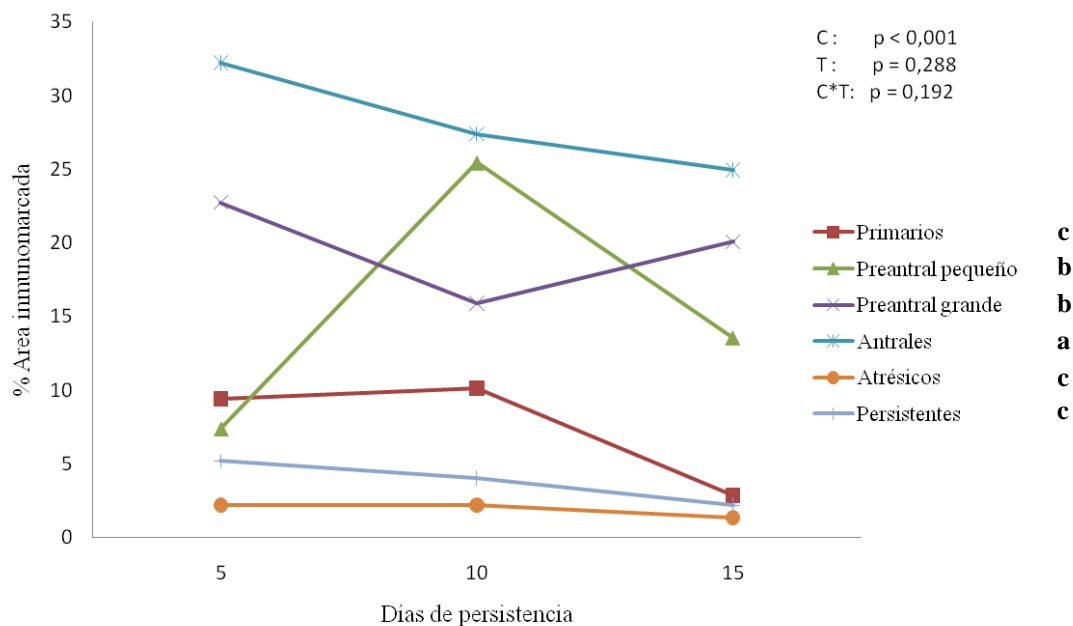


Figura 1: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en células de la granulosa a los 5, 10 y 15 días de persistencia folicular. C: efecto de la categoría folicular, T: efecto del tiempo de persistencia, C\*T: interacción entre categoría folicular y tiempo de persistencia. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las distintas categorías foliculares ( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media.

Este es el primer trabajo que evalúa la expresión de AMH durante el desarrollo de folículos persistentes a largo plazo. En los resultados aquí obtenidos, y en concordancia con los hallazgos hechos por otros autores en animales sanos, se observa una mayor expresión de AMH en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales. Este comportamiento en los niveles de expresión de AMH se mantiene a través de los 15 días de persistencia aquí evaluados, evidenciándose un significativo efecto de la categoría folicular sobre la expresión de AMH. Además, los niveles de AMH en folículos persistentes fueron similares a aquellos hallados en folículos atrésicos y significativamente menores a los observados en folículos antrales, estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por estudios previos en vacas con quistes foliculares. En este sentido, los bajos niveles de AMH podrían ser una característica compartida por los folículos persistentes y los folículos con EQO<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta la implicancia de AMH sobre el pool de reserva ovárico, la expresión de receptores para gonadotrofinas, enzimas y su relación con las concentraciones de P4, es que la expresión alterada de AMH en folículos persistentes podría interferir negativamente en la dinámica folicular, adquiriendo así un rol de importancia en la falla de los complejos mecanismos que controlan el crecimiento folicular, la ovulación y el establecimiento de entidades patológicas como la persistencia folicular y la EQO.

1- **Bridges, P.; Fortune, J.** (2003). Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 25, 199-214.

2- **Díaz, P.; Stangaferro, M.; Gareis, N.; Silvia, W.; Matiller, V.; Salvetti N.; Rey, F.; Barberis, F.; Cattaneo, L.; Ortega, H.** (2015). Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*, 84, 1149-1160.

3- **Monniaux, D.; Clemente, N.; Touzé, J.; Belville, C.; Rico, C.; Bontoux, M.; Picard, J.; Fabre, S.** (2008) Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biology of Reproduction*, 79, 387-396.