UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL HORMONAL E AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA HEMODINÂMICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BÚFALAS EM DIFERENTES CATEGORIAS

ARIANE DANTAS

Botucatu - SP
Junho - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL HORMONAL E AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA HEMODINÂMICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BÚFALAS EM DIFERENTES CATEGORIAS

ARIANE DANTAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora

Orientadora: Dra. Eunice Oba

Botucatu - SP
Junho - 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

Dantas, Ariane.
Perfil hormonal e avaliação ultrassonográfica hemodinâmica da glândula mamária de búfalas em diferentes categorias / Ariane Dantas. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Eunice Oba
Capes: 50504002

1. Bovino de leite. 2. Glândulas mamárias. 3. Doppler, Efeito de. 4. Doppler, Ultrassonografia. 5. Fluxo sanguíneo. 6. Hemodinâmica.

Palavras-chave: Avaliação Doppler; Búfalas leiteiras ; Fluxo sanguíneo mamário; Mamogênese; Regulação hormonal.

Ariane Dantas

PERFIL HORMONAL E AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA HEMODINÂMICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BÚFALAS EM DIFERENTES CATEGORIAS

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Eunice Oba
Presidente e orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu /SP

Profª. Drª. Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Membro
Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária - UNOEST - Presidente Prudente /SP

Prof. Dr. Nélcio Antônio Tonizza de Carvalho
Membro
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento - Registro /SP

17 de junho de 2016

DEDICATÓRIA

In Memoriam, a meu pai, Viviano José Dantas.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao marido Roberto França Teixeira pelo seu amor, paciência e tolerância.

A minha pequena Laura Dantas França Teixeira, por toda a felicidade que me proporciona em ser sua mãe.

A minha família pelo incentivo e estímulo.

A minha orientadora, a Profª. Drª. Eunice Oba pela paciência que teve comigo, pelos ensinamentos e pelos conselhos. Obrigada pela confiança e oportunidade de aprender.

A Profª. Drª. Vânia Maria Vasconcelos Machado pelas horas de leituras gastas no meu trabalho, pelas sugestões e dicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal pela oportunidade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. André Mendes Jorge pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Rogério Antônio de Oliveira pela realização das análises estatísticas dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, a Profª. Drª. Fabiana Ferreira de Souza, Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur e Prof. Dr. Nélcio Antônio Tonizza de Carvalho pela disponibilidade e colaboração.

A Profª. Drª. Cyntia Ludovico Martins pelo apoio na realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo e novamente a Drª. Fabiana Ferreira de Souza por fazerem parte de minha banca de qualificação.

Ao Prof. Alcides de Amorim Ramos (*in memoriam*) por todo aprendizado e experiência passados a mim.

Aos meus amigos de Pós-Graduação: Carla Maria Vela Ulian, Denise Theodoro da Silva, Laís Melicio Cintra Bueno, Letícia Ferrari Crocomo, Lidiane da Silva Alves, Letícia Rocha Inamassu, Felipe Rydygier de Ruediger, Murilo Gomes de Soutello Charlier, Aline Sousa Camargos e Mariana Furtado Zorzetto pelo auxílio e esforço.

Aos funcionários da Supervisão das Fazendas de Ensino, Pesquisa e Extensão e setor de bubalinocultura: Benedito Faustino Fogaça, João Faustino Fogaça, João Ratti Júnior, José Antônio Franco, Amarildo Santos Vieira e Wilson Bueno de Oliveira pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... 1

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 2

Anatomia e morfogênese da glândula mamária..... 2

Controle hormonal da morfogênese mamária..... 9

Ultrassonografia da glândula mamária em ruminantes..... 11

3. OBJETIVOS..... 15

4. REFERÊNCIAS..... 16

CAPITULO 1..... 27

ARTIGO 1. AVALIAÇÃO DA ARTÉRIA MAMÁRIA DE BÚFALAS MESTIÇAS MURRAH POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER E SUA REGULAÇÃO ENDÓCRINA DURANTE DISTINTAS FASES DE CRESCIMENTO..... 28

Resumo..... 28

Introdução..... 29

Material e Métodos..... 30

Resultados..... 35

Discussão..... 37

Conclusão..... 40

Referências..... 40

CAPÍTULO 2..... 47

ARTIGO 2. AVALIAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER DA ARTÉRIA MAMÁRIA DE BÚFALAS MESTIÇAS MURRAH E ASPECTOS ENDÓCRINOS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO..... 48

Resumo..... 48

Introdução..... 49

Material e Métodos..... 50

Resultados..... 56

Discussão..... 62

Conclusão..... 66
Referências..... 66

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 Página

Tabela 1. Coeficientes de correlação Spearman e os níveis de significância obtidos entre os parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias e as concentrações plasmáticas dos hormônios dosados em bezerras (Grupo 1) e novilhas (Grupo 2) mestiças Murrah..... 45

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Coeficiente de correlação Spearman e nível de significância verificados entre as variáveis hemodinâmicas das artérias mamárias esquerdas e as concentrações plasmáticas dos hormônios estudados em búfalas mestiças Murrah, avaliadas na gestação (Grupo 1) e lactação (Grupo 2) 60

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA Página

FIGURA 1. Vascularização (irrigação arterial e drenagem venosa) da glândula mamária de uma vaca..... 4

FIGURA 2. Suprimento sanguíneo e inervação dos órgãos genitais e da glândula mamária *in situ* da vaca; vista lateral esquerda..... 5

FIGURA 3. Mamogênese durante o período pré-natal..... 7

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Posicionamento do transdutor sobre a superfície cranial da glândula mamária, paralelamente à teta (ultrassonografia transcutânea), e o registro das imagens realizado em planos sagital (A) e transversal (B)..... 42

FIGURA 2. Morfologia da curva espectral de ondas de mesma amplitude sistólica e diastólica, obtidas de três ciclos cardíacos consecutivos das artérias mamárias esquerdas de bezerras (A) e novilhas (B) mestiças Murrah..... 42

FIGURA 3. Médias do índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B) e diâmetro interno (C) das artérias mamárias de bezerras (Grupo 1) e novilhas (Grupo 2) mestiças Murrah, avaliadas durante 12 meses..... 43

FIGURA 4. Média da concentração plasmática dos hormônios dosados de cada grupo em cada mês..... 44

FIGURA 5. Evolução do peso das fêmeas dos grupos 1 e 2 em cada

pesagem durante todo experimento..... 45

FIGURA 6. Relação entre o peso corporal e o índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B) e o diâmetro interno (DI) das artérias mamárias de bezerras (Grupo 1) e o índice de resistividade (D), índice de pulsatilidade (E) e o diâmetro interno (F) das artérias mamárias de novilhas (Grupo 2) mestiças Murrah, avaliadas durante o estudo..... 46

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Demonstração do posicionamento do transdutor sobre a superfície cranial da glândula mamária, paralelamente à teta (ultrassonografia transcutânea) e as imagens foram registradas em planos sagital (A) e transversal (B)..... 53

FIGURA 2. Demonstração da modulação espectral das ondas de mesma amplitude sistólica e diastólica obtidas de três ciclos cardíacos consecutivos das artérias mamárias esquerdas de búfalas mestiças Murrah gestantes (A) e lactantes (B)..... 54

FIGURA 3. Média do índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B), diâmetro interno (C) das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas de búfalas mestiças Murrah gestantes (Grupo 1). Índice de resistividade (D), índice de pulsatilidade (E), diâmetro interno (F) das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas de búfalas mestiças Murrah lactantes (Grupo 2), avaliadas mensalmente, ao longo do estudo. (↑) Indicam menor IR e maior DI, nos cinco e três meses finais da gestação e maior DI nos sete primeiros meses de lactação, apresentados nos quadros (A), (C) e (F), respectivamente..... 58

FIGURE 4. Média da concentração plasmática dos hormônios dosados de cada grupo em cada mês..... 59

FIGURA 5. Média do peso corporal de cada grupo em cada mês..... 59

FIGURA 6. Relação do peso corporal sobre o índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B) e o diâmetro interno (C) das artérias mamárias esquerdas de búfalas mestiças Murrah gestantes (Grupo 1). Influência linear do peso corporal sobre o índice de resistividade (D), índice de pulsatilidade (E) e diâmetro interno (F) das artérias mamárias de fêmeas bubalinas mestiças Murrah lactantes (Grupo 2), avaliadas durante o período experimental..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
DI	Diâmetro interno do vaso
17β-E_2	Estradiol
ELISA	Ensaio imunoenzimático
E_2	Estrogênio
GH	Hormônio do crescimento
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IN	Insulina
IP	Índice de Pulsatilidade
IR	Índice de Resistividade
kg	Quilograma
µIU	micro unidades internacionais
mL	Mililitro
MTVM	Média de tempo da velocidade máxima
ng	Nanograma
PC	Peso corporal
PVS	Pico da velocidade sistólica
pg	Picograma
P_4	Progesterona
RIA	Radioimunoensaio
VDF	Velocidade diastólica final

RESUMO

Ariane Dantas. PERFIL HORMONAL E AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA HEMODINÂMICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BÚFALAS EM DIFERENTES CATEGORIAS. Botucatu - SP. 2016. 69 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

O objetivo do presente trabalho foi delinear parâmetros hemodinâmicos e avaliar sua relação com os principais hormônios envolvidos na mamogênese de búfalas mestiças Murrah em diferentes estágios fisiológicos. Utilizou-se 24 animais separados de acordo com a categoria (n= 6): bezerras, novilhas, gestantes e lactantes, com idades iniciais de zero, 12, 24 e 48 meses, respectivamente, criadas extensivamente. Realizou-se a cada 28 dias, ultrassonografia Doppler, colheita de sangue e pesagem, durante um ano (bezerras e novilhas) e 10 meses (gestantes e lactantes). Foram determinados os índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) e o diâmetro interno (DI) das artérias mamárias pela ultrassonografia. Foram mensuradas as concentrações plasmáticas de progesterona (P_4), fator semelhante a insulina tipo I (IGF-I), insulina (IN), hormônio do crescimento (GH) e estradiol (17β-E_2). Utilizou-se ANOVA com medidas repetidas, correlação de Spearman e regressão não linear múltipla, considerando nível de significância de 0,05. Nas bezerras e novilhas, houve redução de IR e IP e aumento do DI (P<0,0001) do primeiro ao último mês de avaliação, contudo, não houve diferença estatística para os índices hemodinâmicos entre as artérias mamárias cranial e caudal. Nas bezerras, detectou-se correlação do IR com o IP (r= 0,94; P<0,0001) e com o DI (r= -0,98; P<0,0001) e também, do IP com o DI (r= -0,98; P<0,0001). Nas novilhas o IR também correlacionou-se com o IP (r= 0,99; P<0,0001) e com o DI (r= -0,95; P<0,0001) e o IP com o DI (r= -0,98; P<0,0001). Nas gestantes e lactantes, a artéria mamária caudal apresentou diferença significativa para os índices hemodinâmicos, apresentando nas gestantes, menor IR (P<0,0001) e maior DI (P<0,0001), nos cinco e três meses finais do estudo, respectivamente; e nas lactantes, maior DI durante os sete primeiros meses (P<0,0001). Houve correlação do IR com o IP, tanto nas gestantes (r= 0,98; P<0,0001) quanto nas

lactantes (r= 0,91; P<0,0006), bem como do IR com o DI nas gestantes (r= -0,98; P<0,0001) e nas lactantes (r= -0,95; P<0,0001). Houve também correlação entre o IP e o DI, nas gestantes (r= -0,98; P<0,0001) e nas lactantes (r= -0,82; P<0,0046). Nas bezerras, os três parâmetros Doppler correlacionaram-se significativamente com as concentrações plasmáticas do IGF-I, GH e P_4 (P<0,05), enquanto que nas novilhas, houve correlação do IR, IP e DI apenas com o IGF-I e P_4. Nas gestantes e lactantes, o IR, IP e o DI correlacionaram-se com o IGF-I, IN e o 17β-E_2, sendo que nas gestantes, o IR, IP e o DI correlacionaram-se também com a P_4 (P<0,05). O peso corporal teve efeito linear sobre o IR (R^2= 0,97; P= 0,0054) e o DI (R^2= 0,97; P= 0,0069) nas bezerras e influência quadrática sobre o IR (R^2= 0,97; P= 0,0116) e o DI (R^2= 0,97; P= 0,0001) nas novilhas, assim como, efeito quadrático sobre o DI, nas gestantes (R^2= 0,99; P< 0,0001) e lactantes (R^2= 0,95; P= 0,0002). Os índices hemodinâmicos das artérias mamárias refletiram a ação hormonal avaliada e permitiram inferir o desenvolvimento mamário de búfalas mestiças Murrah durante as diferentes fases de crescimento, gestação e lactação.

Palavras-chave: mamogênese, fluxo sanguíneo mamário, avaliação Doppler, regulação hormonal, búfalas leiteiras

ABSTRACT

HORMONAL PROFILE AND MAMMARY GLAND HEMODYNAMIC ULTRASOUND EVALUATION OF BUFFALOES IN DIFFERENT CATEGORIES. Botucatu - SP. 2016 69 f. Thesis (Ph.D.) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science.

The objective of this study was to delineate hemodynamic parameters and to evaluate its relationship with key hormones involved in mammogenesis of crossbred Murrah buffaloes in different physiological stages. We used 24 animals divided according to the category (n= 6): calves, heifers, pregnant and lactating females with early ages of zero, 12, 24 and 48 months, respectively, raised extensively. Every 28 days, Doppler ultrasound examinations, blood analysis and weighing were held over one year (for calves and heifers) and over 10 months (for pregnant and lactating females). There were determined resistivity index (RI) and pulsatility index (PI) and internal vessel diameter (ID) of the mammary arteries by ultrasound. Plasma concentrations of progesterone (P_4), insulin-like growth factor 1 (IGF-I), insulin (IN), growth hormone (GH) and estradiol (17β-E_2) were measured. We used repeated measures ANOVA, Spearman correlation and non-linear multiple regression considering 0.05 significance level. In calves and heifers, a reduction of RI and PI and increased ID ($P<0.0001$) from first to last month's assessment, however, there was no statistical difference in hemodynamic indices between the cranial and caudal mammary arteries. All heifers, RI correlation was detected with PI ($r= 0.94$; $P<0.0001$), and ID ($r= -0.98$; $P<0.0001$) and also PI with ID ($r= -0.98$; $P<0.0001$). In heifers RI also correlated with PI ($r= 0.99$; $P<0.0001$) and DI ($r= -0.95$; $P<0.0001$) and PI with the ID ($r= -0.98$; $P<0.0001$). In pregnant and lactating females, the caudal mammary artery showed a significant difference to the hemodynamic indices, showing on pregnant females a lower RI ($P<0.0001$) and a higher ID ($P<0.0001$) during the five final three months of the study, respectively; and in lactating females, higher DI during the first seven months ($P<0.0001$). There was correlation of RI with the PI, in pregnant females ($r= 0.98$; $P<0.0001$) and in lactating females($r= 0.91$; $P<0.0006$) and RI with ID in pregnant ($r= -0.98$; $P<0.0001$) and in lactating females ($r= -0.95$; $P<0.0001$). There was also a correlation between PI and ID, in

pregnant (r= -0.98; P<0.0001) and in lactating females (r= -0.82; P<0.0046). In calves, the three Doppler parameters were significantly correlated with the plasma concentrations of IGF-I, GH and P_4 (P<0.05), while in heifers correlation of PI, ID and only IGF-I and P_4. In pregnant and lactating females, RI, PI and ID correlated with IGF-I, IN and 17β-E_2, and in pregnant females, RI, PI and ID correlated well with P_4 (P<0.05). Body weight had linear effect on RI (R^2= 0.97; P= 0.0054) and ID (R^2= 0.97; P= 0.0069) in heifers and quadratic influence on RI (R^2= 0 97; P= 0.0116) and ID (R^2= 0.97, P= 0.0001) in heifers, as well as quadratic effect on ID in pregnant (R^2= 0.99, P<0.0001) and lactating females (R^2= 0.95; P= 0.0002). Hemodynamic indices of mammary arteries reflected the assessed hormonal action and allowed to infer the mammary development of crossbred Murrah buffaloes during the different stages of growth, pregnancy and lactation.

Keywords: mammogenesis, mammary blood flow, evaluation Doppler, hormone regulation, dairy buffaloes

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil possui aproximadamente 1.320.000 de cabeças de búfalos distribuídas pelo país, com o maior efetivo desta espécie encontrando-se na região Norte (66,49%), seguida das regiões Sudeste (11,32%), Nordeste (9,11%), Sul (8,06%) e Centro-Oeste (5,00%) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, 2016). Entre os anos de 2010 e 2011, a criação de búfalos no país teve crescimento de 7,8%, o que demonstra a excelente capacidade de adaptação dessa espécie ao manejo e às condições ambientais, bem como o significativo potencial de expansão da atividade em nosso país (IBGE, 2016).

No Brasil, os búfalos são tradicionalmente criados objetivando a produção de carne (MARIANTE; MCMANUS; MENDONÇA, 2003), porém a produção de leite vem crescendo e apresentando-se como uma nova alternativa à pecuária leiteira (JORGE et al., 2006). Segundo relatório do IBGE (2016), os produtores brasileiros notaram o potencial de mercado e passaram a investir mais nesta atividade. A produção brasileira de leite de búfala destinada à industrialização apresenta crescimento médio de 25% ao ano desde 2001 e estima-se que a produção de leite seja superior a 92 milhões de litros por ano, destacando-se a região sudeste do país, que apresenta uma desenvolvida cadeia produtiva de leite e derivados (IBGE, 2016).

Em rebanhos leiteiros, o conhecimento dos aspectos relacionados principalmente ao desenvolvimento da glândula mamária é fundamental, uma vez que o crescimento e diferenciação do tecido mamário são fatores importantes e determinantes aos índices produtivos do rebanho (AKERS, 2002).

O desenvolvimento mamário é regulado por mecanismos endócrinos que, por interações sincronizadas, permitem o desenvolvimento de diferentes estruturas em distintas intensidades de crescimento. A ação hormonal inicia-se ainda no desenvolvimento embrionário e persiste ao longo da vida pós-natal; sendo essencial nas diferentes fases de crescimento (HOVEY; TROTT; VONDERHAAR, 2002).

Segundo Capuco et al. (2001), a avaliação hormonal pode ser utilizada como parâmetro de estudo da mamogênese e do desempenho produtivo na bovinocultura de leite. Contudo, estudos envolvendo a influência, controle e as interrelações hormonais no desenvolvimento mamário de búfalas leiteiras, são

escassos, todavia, a realização dos mesmos, é de grande interesse para a atividade leiteira.

O conhecimento do desenvolvimento da glândula mamária de animais de produção é importante tanto para o veterinário quanto para o produtor, pois bons resultados na criação de animais leiteiros dependem da correta aplicação de conhecimentos práticos alicerçados em princípios teóricos básicos e bom uso de práticas biotecnológicas. Dessa forma, a ultrassonografia, técnica de diagnóstico por imagem, já consagrada na medicina humana, entretanto, de uso crescente na medicina veterinária (CARVALHO et al., 2009), apresenta-se como uma importante ferramenta de avaliação da glândula mamária de vacas, cabras e ovelhas (FASULKOV et al., 2012), sendo o número de estudos sobre alterações fisiológicas, anatômicas e funcionais mamárias de búfalas ainda insuficiente.

De posse de informações, quanto a avaliação *in vivo* da estrutura mamária e valores de referência para interpretação dessas informações, se poderá conhecer e acompanhar o desenvolvimento da glândula em tempo real (NISHIMURA et al., 2011). Isto posto, o presente estudo justifica-se pela importância do conhecimento do estado funcional e metabólico mamário, apresentando implicações importantes e pioneiras na área de produção de búfalas leiteiras, bem como representa nova linha de pesquisa e raciocínio no campo da biotecnologia animal.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar, com ultrassonografia Doppler, as características hemodinâmicas da artéria mamária de búfalas mestiças Murrah em diferentes estágios fisiológicos, como forma de monitoramento *in vivo* do desenvolvimento mamário, bem como sua relação com o desempenho corporal e os principais hormônios envolvidos no processo de mamogênese.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anatomia e morfogênese da glândula mamária de fêmeas bubalinas

A glândula mamária é uma glândula cutânea modificada, cuja função nas fêmeas é a síntese e secreção de leite. Está presente em todos os mamíferos em número, localização, tamanho e conformação variáveis, segundo as

diferenças anatomorfológicas de cada espécie (CAPUCO; AKERS, 2009; LEFEVRE; SHARP; NICHOLAS, 2010; OFTEDAL, 2012).

A fêmea bubalina possui quatro glândulas mamárias também chamadas de quartos mamários (quartos mamários anteriores direito e esquerdo; e quartos mamários posteriores direito e esquerdo) e mesmo número de tetas. O conjunto formado pelas glândulas mamárias é denominado de úbere, o qual está localizado na região inguinal do corpo do animal. Cada quarto mamário representa uma unidade glandular independente, ou seja, são anatômica e fisiologicamente distintos (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

As características externas da glândula mamária da fêmea bubalina, assemelham-se com as das bovinas e a estrutura histológica do tecido glandular é similar entre as diferentes espécies de mamíferos (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

Cada glândula é formada por duas estruturas principais: o parênquima mamário e o estroma, sendo a proporção entre os dois tecidos regulada por mecanismos hormonais. O parênquima mamário é composto pelos alvéolos, pequenos ductos e tecido conjuntivo. Os alvéolos são as unidades funcionais de produção de leite da glândula mamária durante a lactação. O leite produzido nos alvéolos é drenado para os ductos, posteriormente para a cisterna da glândula e depois para as tetas e o meio externo (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

Já o estroma é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, linfonodos, nervos e tecido adiposo. O estroma está presente envolvendo e acomodando as estruturas intramamárias, bem como favorecendo o desenvolvimento do parênquima mamário (HOVEY; AIMO, 2010; DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

O úbere é fixado à parede ventral do abdômen do animal pelo sistema suspensor, que é composto pela pele, tecido subcutâneo, ligamentos suspensórios laterais superficiais e profundos, e também pelo ligamento suspensor mediano, que é o responsável pela maior parte da força necessária para manter o úbere fixado sob a pelve (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

O suprimento sanguíneo da glândula mamária de ruminantes é realizado pela artéria aorta caudal, que na região inguinal emite as artérias ilíacas comuns direita e esquerda (Figura 1) (a partir desse ponto a rota passa a ser bilateral),

que posteriormente ramificam-se em artérias ilíacas externas e a seguir em artérias pudendas externas (DYCE; SACK; WENSING, 2010; POPESKO, 2012).

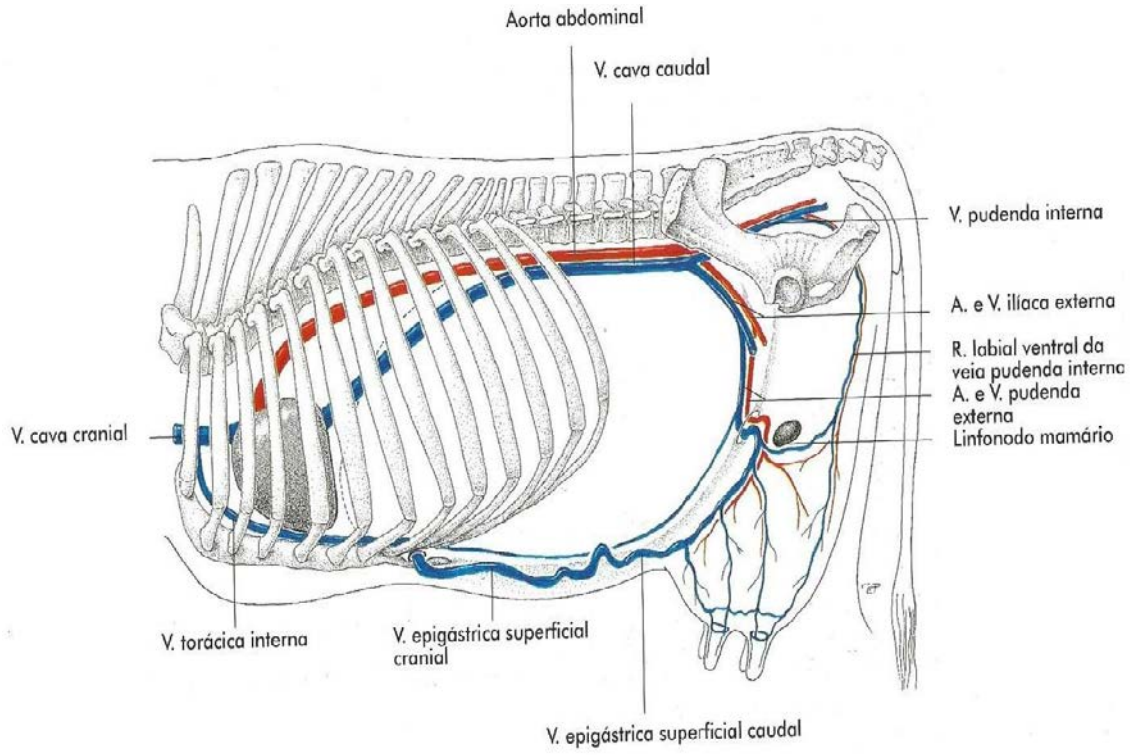


FIGURA 1. Vascularização (irrigação arterial e drenagem venosa) da glândula mamária de uma vaca
Fonte: Bragulla et al., 2011.

A artéria pudenda externa segue dorsocaudalmente em direção à glândula mamária e ao penetrar nas metades direita e esquerda do úbere, emite os ramos cranial e caudal (Figura 2), formando as artérias mamárias cranial e caudal (artéria mamária cranial direita e esquerda; e artéria mamária caudal direita e esquerda), as quais suprem as porções craniais e caudais de cada metade do úbere, respectivamente (DYCE; SACK; WENSING, 2010; POPESKO, 2012). Numerosos ramos desses vasos são emitidos, fornecendo sangue para todas as partes da glândula mamária, fator importante, pois para cada 1 litro de leite produzido é necessária a circulação de aproximadamente 500 litros de sangue pelo tecido mamário (PROSSER et al., 1996).

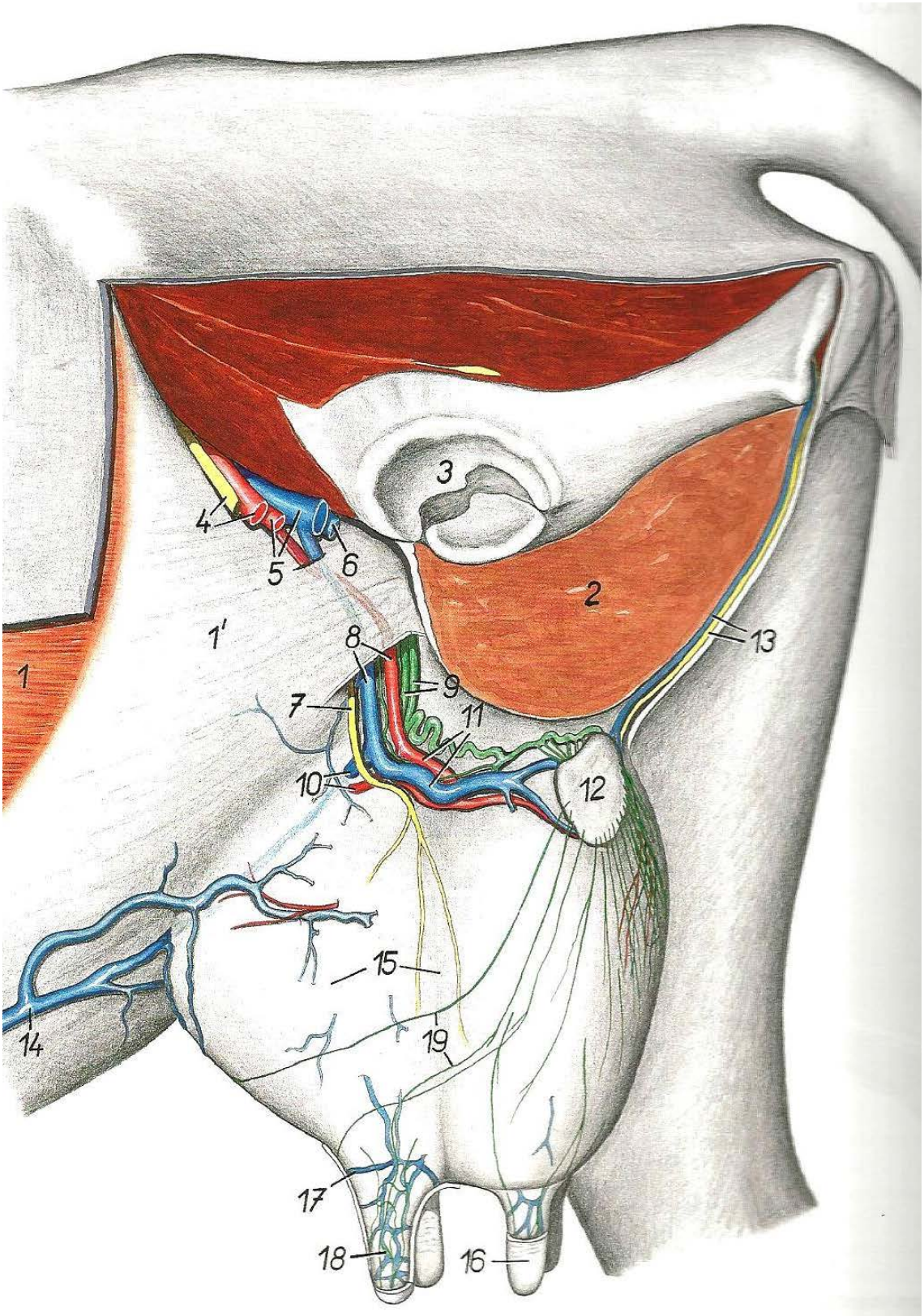


FIGURA 2. Suprimento sanguíneo e inervação dos órgãos genitais e da glândula mamária *in situ* da vaca; vista lateral esquerda

1 Músculo oblíquo externo do abdome; 1’ aponeurose do músculo oblíquo externo do abdome; 2. Músculo grácil, músculo adutor e músculo semimembranáceo; 3. Acetábulo; 4. Nervo e artéria femoral; 5. Artéria femoral profunda, veia femoral; 6. Veia femoral profunda; 7. Nervo genitofemoral; 8. Artéria e veia pudenda externa; 9. Vasos linfáticos eferentes do úbere; 10. Artéria e veia mamária cranial; 11. Artéria e veia mamária caudal; 12. Linfonodo mamário; 13. Veia perineal ventral, nervo perineal profundo; 14. Veia epigástrica cranial superficial; 15. Corpo do úbere; 16. Papila da mama (teta); 17. Círculo venoso da papila da mama; 18. Plexo venoso da papila da mama; 19. Vasos linfáticos superficiais do úbere.
Fonte: Popesko, 2012.

Quanto ao sistema venoso mamário, este é composto por veias que acompanham a rota arterial já descrita anteriormente (Figura 1) e também pelas veias abdominais subcutâneas. Ambas conduzem sangue para a veia cava caudal que por sua vez leva para o coração (DYCE; SACK; WENSING, 2010; POPESKO, 2012).

Já o sistema linfático da glândula mamária é constituído por dois linfonodos mamários presentes dorsocaudalmente em cada metade do úbere e vasos aferentes e eferentes, que juntos formam um plexo linfático responsável pela condução da linfa e proteção da glândula contra infecções (DYCE; SACK; WENSING, 2010; POPESKO, 2012).

A inervação do úbere é realizada por dois tipos de fibras, as aferentes e eferentes, ambas oriundas da região lombar da medula espinhal. Os nervos aferentes são responsáveis pela inervação tanto da porção cranial como caudal do úbere, bem como o flanco e parede abdominal adjacente, conduzindo os impulsos nervosos para o sistema nervoso central (Figura 2). Enquanto as fibras nervosas eferentes inervam os músculos lisos que circundam os vasos sanguíneos e, portanto, regula o abastecimento de sangue no úbere, além de inervar o sistema de ductos, esfíncter e as células mioepiteliais que contornam os alvéolos, atuando diretamente no reflexo de ejeção do leite (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Quanto ao desenvolvimento mamário, este inicia-se no período pré-natal e persiste ao longo de toda a vida reprodutiva do animal. Ocorre de forma dinâmica e é compreendido por etapas bem definidas, onde acontecem mudanças

morfofuncionais que preparam a glândula para a lactação (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014).

Durante o período antenatal, o desenvolvimento da glândula mamária consiste na migração e agregação de células do ectoderma para formar, respectivamente, a banda mamária, linha mamária e botões mamários primários e secundários (Figura 3), os quais designam a disposição da glândula mamária no corpo do animal (AKERS, 2002; SINGH; ROY, 2003a; CHALLANA et al., 2014). À medida em que o feto se desenvolve, ocorre a formação dos ductos, cisterna da glândula e, externamente, as tetas (ROWSON et al., 2012).

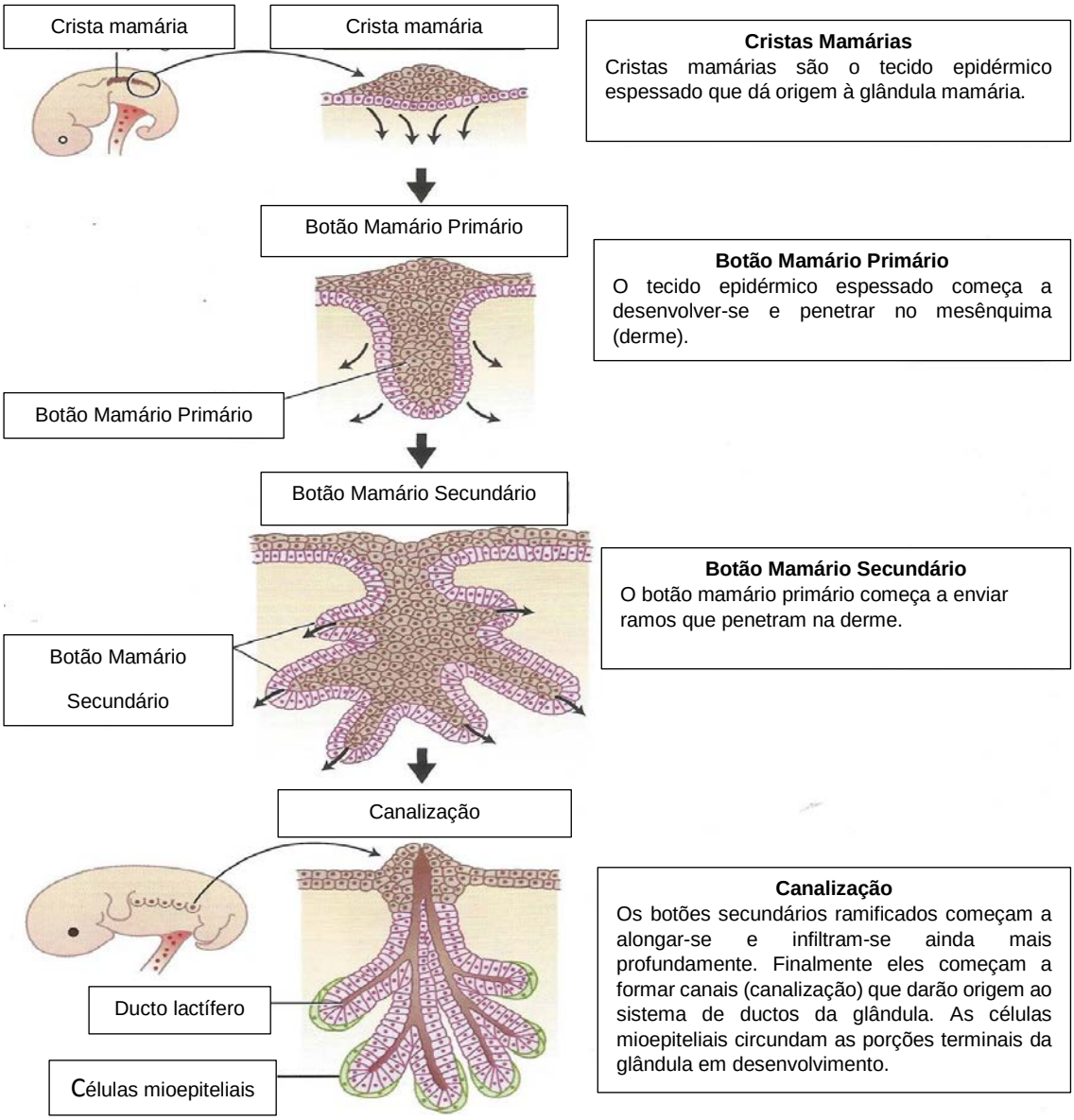


FIGURA 3. Mamogênese durante o período pré-natal

Fonte: Senger, 2005. Tradução: Ariane Dantas

Próximo ao nascimento, os sistemas vascular e linfático, os tecidos conjuntivo e adiposo e também o ligamento suspensor médio da glândula mamária do feto já estão formados, contudo, o parênquima mamário não está presente (ROWSON et al., 2012).

Ao nascimento, o desenvolvimento da glândula mamária é relativamente pequeno e corresponde ao crescimento dos tecidos conjuntivo e adiposo, bem como os ductos mamários (SINGH; ROY, 2003b). Durante a primeira etapa de crescimento, o desenvolvimento mamário ocorre de forma isométrica, ou seja, o crescimento ocorre proporcionalmente ao desenvolvimento corporal (SERJSEN; PURUP, 1997). Os sistemas vascular e linfático estão essencialmente organizados como ficarão no úbere já desenvolvido, no entanto, poucos alvéolos são formados (HOVEY; McFADDEN; AKERS, 1999; HINCK; SILBERSTEIN, 2005; STERNLICHT, 2006).

Quando próximo do início da puberdade, o desenvolvimento da glândula mamária passa a ser alométrico positivo, isto é, superior à taxa de desenvolvimento corporal (SERJSEN, 1994). Durante esse período há intenso crescimento do tecido adiposo e ampliação do sistema de ductos, projetando-se na estrutura intramamária (CAPUCO et al., 1995; ELLIS; MCFADDEN; AKERS, 1998). De acordo com Serjsen et al. (1982) a distribuição da área percentual do estroma, lúmen e parênquima mamário de novilhas pré-púberes corresponde a 84%, 12% e 3%, respectivamente. Durante essa fase já é possível observar um formato mais definido do úbere e aumento no tamanho.

Do fim da puberdade até a concepção, a intensidade do desenvolvimento mamário desacelera, retornando à forma isométrica. Nessa fase, o crescimento da glândula mamária consiste no alongamento, espessamento e ramificação dos ductos e os alvéolos são gradualmente formados obedecendo os acontecimentos fisiológicos de cada ciclo estral (ROWSON et al., 2012).

Ao longo da gestação, o desenvolvimento mamário ocorre exponencialmente e consiste primordialmente em intensa formação de tecido alveolar, e da rede de células mioepiteliais que o envolvem, e hiperplasia vascular. No entanto, o crescimento dos ductos persiste e ocorre redução do desenvolvimento do tecido adiposo (YASUGI, KAIDO e UEHARA, 1989; MATSUMOTO et al., 1992; DJONOV et al., 2001).

A maior parte do desenvolvimento da glândula mamária ocorre durante a primeira gestação, mais precisamente na etapa final, de tal modo que poucas mudanças ocorrerão após o parto (CAPUCO; AKERS; SMITH, 1997). Segundo Capuco e Akers (1990) aproximadamente 80% das células mamárias são formadas durante a gestação e início da lactação. Durante esse período, a glândula mamária aumenta expressivamente de tamanho e adquire um formato característico.

Ressalta-se que a quantidade de tecido presente na glândula mamária aumenta exponencialmente durante a gestação de novilhas de tal forma que ao final de cada mês há 35% a mais de tecido presente do que havia ao final do mês anterior, assim a maior parte da incorporação ocorre nos últimos 3 meses de gestação (SWANSON; POFFENBARGER, 1979).

Já o desenvolvimento mamário durante a lactação concentra-se primordialmente durante os primeiros meses, porém, ocorre com intensidade bem menor do que durante a gestação e consiste principalmente na proliferação adicional de células alveolares (NEVILLE et al., 2002; HOVEY; TROTT, 2004; AKERS, 2006).

Durante o período de lactação, o desenvolvimento da glândula mamária regride gradual e progressivamente, passando a um estado não-secretor. A cessação do estímulo de sucção ou de amamentação promove o início da involução do tecido mamário, no qual ocorrem os processos de apoptose, degradação proteolítica, diminuição da atividade metabólica e redução da maior parte do tecido epitelial, bem como, do tamanho da glândula mamária (CAPUCO; AKERS, 1999; CAPUCO et al., 2001; SORENSEN et al., 2006; SANTSCHI et al., 2009).

Esse período é importante pois permite a renovação celular, possibilitando a recuperação da glândula mamária antes do início da próxima lactação, diminuindo a susceptibilidade à mastite (CHURCH et al., 2008; WATTERS et al., 2008; NEWMAN et al., 2010; COLLIER; ANNEN-DAWSON; PEZESHKI, 2012).

Portanto, para que o desempenho e, consequentemente, a eficiência produtiva de búfalas leiteiras possam ser melhorados, é fundamental compreender os fatores envolvidos na regulação do desenvolvimento e diferenciação mamária.

2.2. Controle hormonal da morfogênese mamária

O desenvolvimento da glândula mamária é um processo complexo modulado por controle sistêmico e local. A interação de hormônios, principalmente hipofisários e ovarianos, com fatores de crescimento é muito importante para o desenvolvimento funcional da glândula (KLEINBERG; BARCELLOS-HOFF, 2011).

Trata-se de um processo cíclico, regulamentado pelo equilíbrio de etapas de crescimento iso e alométrico, que se inicia antes mesmo do nascimento e prossegue por toda a vida reprodutiva do animal (HOVEY et al., 2002; AKERS, 2006). Contudo, durante o período pré-natal, o desenvolvimento da glândula mamária está primordialmente sob controle de fatores genéticos.

Após o nascimento, durante a primeira fase de crescimento do animal, o desenvolvimento mamário é modulado principalmente pela ação do estrogênio (E_2) e do hormônio do crescimento (GH) (KLEINBERG; BARCELLOS-HOFF, 2011). Ambos possuem ação mitogênica e atuam favorecendo especialmente o crescimento do sistema de ductos. Além disso, o E_2 age estimulando a formação de receptores de progesterona (P_4) (SAJI et al., 2000; BERRY et al., 2003; CONNOR et al., 2005).

Com a puberdade, o desenvolvimento da glândula mamária está sob influência das variações hormonais que ocorrem durante o estabelecimento de cada ciclo estral. A atuação do E_2 persiste sobre os ductos, permitindo maior ramificação e infiltração no interior da glândula, formando uma ampla rede de canais e tubos contínuos, ao passo que a P_4 age estimulando a formação do tecido secretório alveolar nas extremidades dos dutos mamários. Soma-se aos hormônios anteriormente descritos, a ação do GH e fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) que possuem efeito semelhante ao do E_2 (AIRES, 2012).

Com a instalação da gestação e durante a maior parte do período gestacional, várias mudanças anatomofisiológicas que ocorrem na glândula mamária são atribuídas às alterações hormonais, principalmente do E_2, P_4 e prolactina. Sob a influência do E_2, ocorre intensa proliferação ductal, acompanhada por involução do estroma, bem como aumento da vascularização e do fluxo sanguíneo. A P_4 induz a hiperplasia lobular, assim como a contínua involução do estroma. Contudo, com a proximidade do parto as concentrações

de P_4 diminuem e os níveis de prolactina aumentam, favorecendo o crescimento e desenvolvimento dos alvéolos, preparando a glândula mamária para lactação (NEVILLE et al., 2002; LAMOTE et al., 2004).

Outros hormônios também estão envolvidos nessa etapa, tais como GH, IGF-I e insulina (IN), que apesar de não terem níveis elevados durante a gestação, são fundamentais para o desenvolvimento contínuo e pleno da glândula mamária (OLLIVIER-BOUSQUET; DEVINOY, 2005).

Na lactação o desenvolvimento mamário ocorre principalmente pela ação da prolactina e do GH. A prolactina age favorecendo o desenvolvimento alveolar, bem como a integridade estrutural e atividade funcional do epitélio mamário durante a lactação e o desempenho produtivo. Já o GH está envolvido na manutenção do número de células mamárias durante a lactação (CAPUCO et al., 2001). Além disso, durante esse período observa-se o efeito mitótico do IGF-I e IN sobre as células mamárias (NEVILLE et al., 2002; HOVEY; TROTT, 2004; CHAIYABUTR et al., 2005; AKERS, 2006).

Ao final da lactação, ocorre a involução mamária a qual é modulada pela diminuição da ação da prolactina, GH e IGF-I. Segundo Accorsi et al. (2002) durante essa fase, a redução dos níveis desses hormônios é considerada como o principal sinal de controle de apoptose e atrofia do tecido mamário. Paralelamente a esse período, ocorre aumento gradual dos níveis de E_2, que agem sutilmente na manutenção dos ductos e lóbulos (CAPUCO et al., 2003).

Portanto, alterações na produção ou atividade de hormônios envolvidos na modulação da glândula mamária, durante qualquer uma das fases de desenvolvimento, podem futuramente afetar a produção de leite, sendo de fundamental importância os estudos sobre esse tema.

2.3. Ultrassonografia da glândula mamária em ruminantes

Na ultrassonografia, ondas sonoras de frequência superior a 20KHz são emitidas por um transdutor em pulsos contínuos sobre os tecidos. As interfaces dos tecidos refletem as frequências, parte delas retorna ao transdutor e, posteriormente, são processadas de modo a gerar imagens em tons de cinzas (PEIXOTO et al., 2010).

É um método preciso, seguro, de fácil execução e relativamente de baixo custo. Além disso, permite a obtenção de informações em tempo real da

estrutura analisada. Trata-se de um exame inócuo e a sedação do paciente, na maioria das vezes, não é necessária. Outras vantagens dessa técnica estão em não utilizar radiação ionizante, portanto, pode ser empregada de forma repetida, sem efeitos nocivos. Além disso, por não requerer a eutanásia do animal, permite avaliações seriadas do mesmo indivíduo sob diferentes circunstâncias (MANNION, 2006; KING, 2006).

É uma técnica indicada para aferição do tamanho, formato, contorno, ecotextura e localização de órgãos, tecidos e vasos, ou monitoramento de suas funções e também para detectar a presença de massas anormais, como tumores, sendo, portanto, considerada modalidade importante de avaliação clínica, tanto na medicina como na veterinária (MANNION, 2006; KING, 2006).

Frente a tantos benefícios, o uso da ultrassonografia faz-se particularmente interessante no estudo da glândula mamária de animais de produção, uma vez que a quantidade e qualidade do leite produzido, assim como a eficiência de sua produção, estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento, à atividade metabólica e à saúde do úbere (AKERS, 2002; CAPUCO et al., 2003 BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENTA; JAMMES, 2004).

Os primeiros registros do uso da ultrassonografia na glândula mamária em animais de produção são relativamente recentes na literatura veterinária, sendo o primeiro relato científico de Caruolo e Mochrie (1967), os quais estudaram o úbere de vacas em lactação. Cartee et al. (1986) utilizaram o ultrassom para avaliação de distúrbios na secreção do leite e alterações mamárias, também em vacas. Posteriormente, diversos outros trabalhos foram conduzidos (STOCKER et al., 1989; SARATSIS; GRUNERT, 1993; SEEH; HOSPES; BOSTEDT, 1996).

Embora a maioria dos estudos com o uso da ultrassonografia mamária foram realizados em vacas (FRANZ et al., 2004; KLEIN et al., 2005; PAULRUD et al., 2005; FLOCK; WINTER, 2006; CELIK et al., 2008; FRANZ; FLOEK; HOFMANN-PARISOT, 2009; SEKERE et al., 2009; GÖTZE et al., 2010; PORCIONATO et al., 2010; NISHIMURA et al., 2011; BRAUN; FORSTER, 2012; SZENCZIOVÁ et al., 2013; FASULKOV et al., 2014; BRAGA et al., 2015; ESSELBURN et al., 2015), há também uma quantidade considerável de trabalhos desenvolvidos em ovelhas (HIEPLER; SCHÖNFELDER; WEHREND, 2009; OLECHNOWICZ; JASKOWSKI, 2009; ALEJANDRO et al., 2014a; PETRIDIS et al., 2014; MAKOVICKÝ; MARGETÍN; MILERSKI, 2015), cabras (FASULKOV et al., 2010;

FASULKOV; KOLEVA, 2011, DÍAZ et al., 2013; ALEJANDRO et al., 2014b; DAR, et al., 2014; FASULKOV, et al., 2013, FASULKOV; KARADAEV; DJABIROVA, 2014) e búfalas (RAMBADU et al., 2008; RAMBADU et al., 2009; AMBORD et al., 2009; AMBORD et al., 2010; CONSTANTE; ACORDA, 2012; KOTB; ABU-SEIDA; FADEL, 2014).

A aplicação mais comum desta técnica consiste na avaliação do crescimento de diferentes estruturas mamárias com dados da produção de leite, o número de lactações e o manejo de ordenha, que permite a obtenção de diversas informações e fatores importantes e determinantes às práticas de manejo e seleção de animais com potencial leiteiro (FASULKOV et al., 2012; SZENCZIOVÁ; STRAPÁK, 2012).

A ultrassonografia também é bastante empregada em estudos para avaliação do estado sanitário da glândula, tanto na elaboração de diagnósticos e prognósticos, quanto no acompanhamento evolutivo de diversas alterações, como: lesões de mucosa, proliferação de tecido, hematoma, abscesso e principalmente mastite (FRANZ; FLOEK; HOFMANN-PARISOT, 2009; KIOSSIS et al., 2009; RAMBABU et al., 2009; PORCIONATO et al., 2010; POTAPOW et al., 2010; FASULKOV, 2011; CONDINO et al., 2012).

No entanto, com uso da ferramenta Doppler, há aumento da sensibilidade e especificidade do exame ultrassonográfico, adicionando ao método convencional a capacidade de avaliar características hemodinâmicas (CARVALHO; CHAMMAS, CERRI, 2008; CARVALHO, 2009), o que permitiu a expansão da aplicação da técnica e, consequentemente, uma avaliação mais detalhada da glândula. De acordo com Petridis et al. (2014), a avaliação da vascularização mamária, por meio do Doppler, apresenta-se como excelente ferramenta a ser utilizada no estudo do estado funcional da glândula mamária.

O efeito Doppler pode ser definido como sendo o princípio físico no qual a frequência do som varia diante da aproximação ou afastamento da fonte emissora em relação ao observador (HEDRICK; HYKES; STARCHMAN, 1995). Quando aplicado à ultrassonografia de vasos sanguíneos, as hemácias em movimento nos vasos correspondem à fonte emissora de som e o transdutor ao observador. Assim, o efeito Doppler se refere à diferença entre a frequência da onda sonora emitida pelo transdutor e a frequência dos ecos que retornam do fluxo sanguíneo em movimento (NYLAND; MATTOON, 2005).

Desta forma, dependendo da modalidade do Doppler escolhido, dados qualitativos e quantitativos, arterial e venoso, podem ser obtidos. Contudo, dentre as variáveis Doppler disponíveis para avaliação, as mais estudadas têm sido os índices de resistividade e pulsatilidade, possivelmente devido a multiplicidade das informações morfológicas e hemodinâmicas que oferecem (DANTAS, 2013; SANTOS et al., 2014).

Tais índices fornecem dados que permitem descrever e determinar padrões de normalidade da perfusão sanguínea, detectar alterações vasculares e a impedância do vaso, além de determinar o estado metabólico do órgão analisado, bem como a presença de doenças (CARVALHO; CHAMMAS; CERRI, 2008; CARVALHO 2009; GINTHER, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre as características hemodinâmicas da artéria mamária de búfalas durante as distintas fases de desenvolvimento.

3. Referências[1]

ACCORSI P. A. et al. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, p. 507-513, 2002. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74102-7

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1011 p.

AKERS, R. M. **Lactation and the mammary gland**. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002. 278p.

AKERS, R. M.; CAPUCO, A. V.; KEYS, J. E. Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 105, p. 44-49, 2006. DOI: 10.1016/j.livsci.2006.04.026

ALEJANDRO, M. et al. Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 119, p. 138-145, 2014a. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2014.02.007

ALEJANDRO, M. et al. Infrared thermography as a tool to determine teat tissue changes caused by machine milking in Murciano-Granadina goats. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 160, p. 178-185, 2014b. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.11.029

AMBORD, S. et al. Teat anatomy, vacuum to open the teat canal, and fractionized milk composition in Italian buffaloes. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 64, p. 351-353, 2009. DOI: 20093283220

AMBORD, S. et al. Teat anatomy affects requirements for udder preparation in Mediterranean buffaloes. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 77, p. 468-473, 2010. DOI: 10.1017/S0022029910000518

BERRY, S. D. et al. Mammary epithelial proliferation and estrogen receptor alpha expression in prepubertal heifers: effects of ovariectomy and growth hormone. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, p. 2098-2105, 2003. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73799-0

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENTA, J.; JAMMES, H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. **Reproduction, Nutrition, Development**, Les Ulis, v. 44, p. 499-508, 2004. DOI: 10.1051/rnd:2004054

[1]Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 6023, 2002).

BRAGA, A. R. et al. Morphophysiology, disorders and the ultrasound diagnosis gland breast in cattle: Literature Review. **Nucleus Animalium**, Ituverava, v. 7, p. 17-29, 2015. DOI: 10.3738/1982.2278.1168

BRAGULLA, H. et al. Tegumento comum. In: KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos:** texto e atlas colorido**.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. cap. 18, p. 343.

BRAUN, U.; FORSTER, E. B-mode and colour Doppler sonographic examination of the milk vein and musculophrenic vein in dry cows and cows with a milk yield of 10 and 20 kg. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanloese, v. 54, p. 1-5, 2012. DOI: 10.1186/1751-0147-54-15

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. Thymidine incorporation by lactating mammary epithelium during compensatory mammary growth in beef cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 73, p. 3094-3103, 1990. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78997-7

CAPUCO, A. V. et al. Influence of prepubertal dietary regimen on mammary growth of holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 78, p. 2709-2725, 1995. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76902-8

CAPUCO A. V.; AKERS, R. M.; SMITH, J. J. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 80, p. 477-487, 1997. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)75960-5

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. Mammary involution in dairy animals. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 4, p. 137-144, 1999. DOI: 10.1023/A:1018769022990

CAPUCO, A. V. et al. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bst. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 84, p. 2177-2187, 2001. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74664-4

CAPUCO, A. V. et al. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 18-31, 2003. DOI: /2003.81suppl_318x

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. The origin and evolution of lactation. **Journal of Biology**, Dordrecht, v. 8, p. 1-4, 2009. DOI: 10.1186/jbiol139

CARTEE, R. E.; IBRAHIM, A. K.; McLEARY, D. B-mode ultrasonography of the bovine udder and teat. **American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 188, p. 1284-1287, 1986.

CARUOLO, E. V.; MOCHRIE, R. D. Ultrasonograms of lactating mammary glands. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 50, p. 225-230, 1967. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(67)87392-2

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do doppler em ultrassonografia: Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 872-879, 2008. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300047

CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia Doppler em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2009. 288p.

CELIK, H. A. et al. Ultrasonographic evaluation of age related influence on the teat canal and the effect of this influence on milk yield in Brown Swiss cows. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 52, p. 245-249, 2008.

CHAIYABUTR, N. et al. Effects of long-term administration of recombinant bovine somatotropin on milk production and plasma insulin-like growth factor and insulin in crossbred Holstein cows. **Journal of Agriculture Science**, New York, v. 143, p. 311-318, 2005. DOI: 10.1017/S0021859605005538

CHALLANA, A. et al. Morphogenesis of mammary glands in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Anatomy Research International**, New York, v. 1, p. 1-8, 2014. DOI: 10.1155/2014/687936

CHURCH, G. T. et al. The effect of a shortened dry period on intramammary infections during the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, p. 4219-4225, 2008. DOI: 10.3168/jds.2008-1377

COLLIER, R. J.; ANNEN-DAWSON, E. L.; PEZESHKI, A. Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health. **Animal**, Cambridge, v. 6, p. 403-414, 2012. DOI: 10.1017/S1751731111002461

CONDINO, M. P. et al. Milk-flow, ultrasonographic, theloscopic, and histopathological characteristics of the teat in cows with toxic mastitis. **Research in Veterinary Science**, Midlothian, v. 93, p. 865-871, 2012. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.09.003

CONNOR, E. E. et al. Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland. **Journal of Endocrinology**, Colchester, v. 185, p. 593-603, 2005. DOI: 10.1677/joe.1.06139

CONSTANTE, J. L.; ACORDA, J. A. Ultrasound features of the udder and teat of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) at different stages of lactation. **Philippine Journal of Veterinary Medicine**, Laguna, v. 2, p. 76-82, 2012.

DANTAS, A**. Idade à puberdade e desenvolvimento da glândula mamária de cordeiras sob baixa e alta velocidades de crescimento**. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

DAR, M. U. D. et al. Ultrasonography of teat in surti goats. **Indian Journal of Animal Research**, Karnal, v. 1, p. 59-62, 2014. DOI: 10.5958/j.0976-0555.48.1.012

DAVIDSON, P. A.; STABENFELDT, H. G. A glândula mamária. In: KLEIN, G. B. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 6, p. 439-449.

DÍAZ, J. et al. Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 155, p. 114-122, 2013. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.04.007

DJASORENSEN, M. T. et al. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, p. 4632-4639, 2006. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72513-9

DJONOV, V.; ANDRES, A. C.; ZIEMIECKI, A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. **Microscopy Research and Technique**, Hoboken, v. 15, p. 182-189, 2001. DOI: 10.1002/1097-0029(20010115)52:2<182::AID-JEMT1004>3.0.CO;2-M

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Pelve e órgãos reprodutivos dos ruminantes. In: _____. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 4, p. 721-727.

ELLIS, S.; MCFADDEN, T. B.; AKERS, R. M. Prepuberal ovine mammary development is unaffected by ovariectomy. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, v. 15, p. 217-225, 1998. DOI: 10.1016/S0739-7240(98)00009-5

ESSELBURN, K. M. et al. Examination of weekly mammary parenchymal area by ultrasound, mammary mass, and composition in Holstein heifers reared on 1 of 3 diets from birth to 2 months of age. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 98, p. 5280-5293, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9061

FASULKOV, I. R. et al. B-mode ultrasonography of mammary glands in goats during the lactation period. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 13, p. 245-251, 2010.

FASULKOV, I.; KOLEVA, M. Ultrasound imaging findings in acute mammary gland inflammations in goats. **Journal of Mountain Agriculture on the Balkans**, Troyan, v. 14, p. 210- 221, 2011.

FASULKOV, I. R. Ultrasonography of the mammary gland in ruminants: A review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 15, p. 1-12, 2012.

FASULKOV, I. et al. Evaluation of different techniques of teat ultrasonography in goats. **Istanbul Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, Istanbul, v. 1, p. 33-39, 2013.

FASULKOV, I. et al. Ultrasonographic findings of pathological changes in the mammary gland in Bulgarian native goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 1, p. 174-180, 2014. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2014.05.007

FASULKOV, I. R. et al. Visualization and measurement of teat structures in black-and-white cows through ultrasonography, **Macedonian Veterinary Review**, Skopje, v. 1, p. 89-93, 2014. DOI: 10.14432/j.macvetrev.2014.02.010

FLÖCK, M.; WINTER, P. Diagnostic ultrasonography with diseases of the mammary gland. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, p. 314-321, 2006.

FRANZ, S.; HOFMANN-PARISOT, M.; BAUMGARTNER, W. Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 65, p. 1159-1163, 2004.

FRANZ, S.; FLOEK, M.; HOFMANN-PARISOT, M. Ultrasonography of the bovine udder and teat. **Veterinary Clinic of North America**: Food Animal Practice, Maryland Heights, v. 25, p. 669-685, 2009. DOI: 10.1016/j.cvfa.2009.07.007

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 81, p. 112-125, 2014.

GÖTZE, A. et al. Variability of mammary blood flow in lactating Holstein-Friesian cows during the first twelve weeks of lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, p. 38-44 2010. DOI: 10.3168/jds.2008-1781

HEDRICK, W. R.; HYKES, D. L.; STARCHMAN, D. E. **Ultrasound physics and instrumentation**. 3. ed. Saint Louis: Mosby-Year Book, 1995. 365p.

HINCK, L.; SILBERSTEIN, G. B. Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, p. 245-251, 2005. DOI: 10.1186/bcr1331

HIEPLER, T.; SCHÖNFELDER, A.; WEHREND, A. Sonographische Untersuchung des ovinen Euters. **Tieraerztliche Praxis Ausgabe G**: Grosstiere- Nutztiere, Stuttgart, v. 3, p. 157-163, 2009.

HOVEY, R. C.; MCFADDEN, T. B.; AKERS, R. M. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 4, p. 53-68, 1999.

HOVEY, R. C.; TROTT, J. F.; VONDERHAAR, B. K. Establishing a framework for the functional mammary gland: From endocrinology to morphology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 7, p. 17-38, 2002.

HOVEY, R. C.; TROTT, J. F. Morphogenesis of mammary gland development. **Advances in Experimental Medicine Biology**, New York, v. 554, p. 219-228, 2004.

HOVEY, R. C.; AIMO, L. Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 15, p. 279-290, 2010. DOI: 10.1007/s10911-010-9187-8

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Pecuária Municipal: Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 02 maio 2016.

JORGE, A. M. et al. Desempenho e eficiência biológica de bubalinos de três grupos genéticos terminados em confinamento e abatidos em diferentes estádios de maturidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 252-257, 2006. DOI: 10.1590/S1516-35982006000100032

KING, A. M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, p. 408-420, 2006. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.10.014

KIOSSIS, E. et al. Endoscopic and histopathological findings of teats in dairy ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 87, p. 70-75, 2009. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2009.10.009

KLEIN, D. et al. Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 72, p. 296-302, 2005. DOI: 10.1017/S0022029905000920

KLEINBERG, D. L.; BARCELLOS-HOFF, M. H. The Pivotal Role of Insulin-Like Growth Factor I in Normal Mammary Development. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 40, p. 461-471, 2011.

KOTB, E. E. Z.; ABU-SEIDA, A. M.; FADEL, M. S. The correlation between ultrasonographic and laboratory findings of mastitis in buffaloes. **Global Veterinaria**, Dubai, v. 13, p. 68-74, 2014. DOI: 10.5829/idosi.gv.2014.13.01.84171

LAMOTE, I. et al. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. **Steroids**, Philadelphia, v. 69, p. 145-59. 2004. DOI: 10.1016 / j.steroids.2003.12.008

LEFEVRE, C. M.; SHARP, J. A.; NICHOLAS, K. R. Evolution of lactation: ancient origin and extreme adaptations of the lactation system. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 11, p. 219-238, 2010. DOI: 10.1146/annurev-genom-082509-141806

MANNION, P. **Diagnostic ultrasound in small animal practice**. Blackwell Science: Oxford, 2006. 271 p.

MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C.; MENDONÇA, J. F. **Country report on the state of animal genetic resources**. Brasília, DF: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, 2003. 122 p.

MATSUMOTO, M. et al. Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 54, p. 937-943, 1992. DOI: 10.1292/jvms.54.937

MAKOVICKÝ, P.; MARGETÍN, M.; MILERSKI, M. Estimation of udder cistern size in dairy ewes by ultrasonography. **Mljekarstvo**, Zagreb, v. 3, p. 210-218, 2015. DOI: 10.15567/mljekarstvo.2015.0308

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 7, p. 49-66, 2002.

NEWMAN, K. A. et al. Association of milk yield and infection status at dry-off with intramammary infections at subsequent calving. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 77, p. 99-106, 2010. DOI: 10.1017/S0022029909990380

NISHIMURA, M. et al. Ultrasound Imaging of Mammary Glands in Dairy Heifers at Different Stage of Growth. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 73, p. 19-24, 2011. DOI: 10.1292/jvms.09-0503

NYLAND T. G.; MATTOON, J. S. **Ultra-som diagnóstico em pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. 469p.

OLECHNOWICZ, J. M.; JASKOWSKI, M. Ultrasound examination of mammary glands in ruminants. **Medycyna Weterynaryjna**, Lublin, v. 3, p. 147-150, 2009.

OFTEDAL, O. T. The evolution of milk secretion and its ancient origins. **Animal**, Cambridge, v. 6, p. 355-368, 2012. DOI: 10.1017/S1751731111001935

OLLIVIER-BOUSQUET, M.; DEVINOY, E. Physiology of lactation: Old questions, new approaches. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 98, p. 163-173, 2005. DOI: 10.1016/j.livprodsci.2005.10.012

PAULRUD, C. O. et al. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. **Acta Veterinary Scandinavica**, Vanloese, v. 46, p. 137-147, 2005. DOI: 10.1186/1751-0147-46-137

PEIXOTO, G. C. X. et al. Bases físicas da formação da imagem ultrassonográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, São Paulo, v. 4, p. 15-24, 2010.

PETRIDIS, G. I. et al. Ultrasonographic findings in the ovine udder during involution. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 81, p. 288-296, 2014. DOI: 10.1017/S0022029914000223

PORCIONATO, M. A. et al. Milk flow, teat morphology and subclinical mastitis prevalence in Gir cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, p. 15074-1512, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010001200023

POPESKO, P. Pelve e membros - Bovinos. In: POPESKO, P. **Atlas de anatomia topográfica dos animais**. 5. ed. Barueri: Manole, 2012. cap. 3, p. 450-451.

POTAPOW, A. et al. Investigation of mammary blood flow changes by transrectal colour Doppler sonography in an Escherichia coli mastitis model. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 77, p. 205-212, 2010. DOI: 10.1017/S0022029910000105

PROSSER, C. G. et al. Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 7, p. 1184-1197, 1996.

RAMBADU, K. et al. Ultrasonography of the udder and teat in buffaloes: a comparision of four methods. **Buffalo Bulletin**, Bangkok, v. 27, p. 269-273, 2008.

RAMBADU, K. et al. Ultrasonography of the udder and teat in buffaloes. **Buffalo Bulletin**, Bangkok, v. 28, p. 5-10, 2009.

ROWSON, A. R. et al. Growth and development of the gland mammary of livestock: a vire table barnyard of opportunities. **Seminars in Cell Development Biology**, London, v. 23, p. 557-566, 2012. DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.03.018.

SAJI, S. et al. Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 142, p. 3177- 3186, 2001. DOI: http://dx.doi.org/10.1210/endo.142.7.8260

SANTOS, V. J. C. et al. Conventional and Doppler ultrasonography on a goat with gangrenous mastites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, p. 1931-1935, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1678-7062

SANTSCHI, D. E. et al. Short dry period: a new reality: Results from a long-term field study. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, p. 332, 2009.

SARATIS, P.; GRUNERT, E. Diagnostic ultrasound for the examination of the extension of teat stenosis or other anomalies of the teat in dairy cows. **Deutsche Tierarztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 100, p. 159-163, 1993.

SEEH, C.; HOSPES, R.; BOSTEDT, H. The use of visual methods (sonography/endoscopy) for the diagnosis of a webbed teat in a cow. **Tierarztliche Praxis**, Stuttgart, v. 24, p. 438-442, 1996.

SENGER, P. L. The puerperium and lactation. In: _____. **Pathways and pregnancy and parturition**. 2nd ed. Pullman: Current Conceptions, 2005. cap. 15, p. 337.

SEJRSEN, K. et al. Influence of nutrition on mammary development in pre- and postpubertal heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 65, p. 793-800, 1982. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82268-6

SEJRSEN, K. Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. **Nutrition Society Proceedings**, Cambridge, v. 53, p. 103-111, 1994. DOI: 10.1079/PNS19940014

SEJRSEN, K.; PURUP, S. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy herfeirs: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p. 828-835, 1997. DOI: /1997.753828x

SEKERE, I. et al. Relationship between californian mastitis test score and ultrasonographic teat measurments in dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, Malden, v. 87, p. 480-483, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2009.00520.x

SINGH, N.; ROY, K. S. Prenatal development of mammary glands in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Journal**, Bangkok, v. 1, p. 19-25, 2003a.

SINGH, N.; ROY, K. S. Histomorphological study of postnatal development of the mammary gland in the buffalo (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Journal**, Bangkok, v. 1, p. 61-70, 2003b.

STERNLICHT, M. D. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Research**, London, v. 8, p. 1-11, 2006. DOI: 10.1186/bcr1368

STOCKER, H. et al. Evaluation of bovine teat stenosis by means of ultrasonography. **Tierarztliche Praxis**, Stuttgart, v. 17, p. 251-256, 1989.

SWANSON, E. W.; POFFENBERGER, J. I. Mammary development of dairy heifers during their first gestation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 62 p. 702-14, 1979.

SZENCZIOVÁ, I.; STRAPÁK, P. Ultrasonography of the udder and teat in cattle: perspective measuring technique. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 45, p. 96-104, 2012.

SZENCZIOVÁ, I. et al. Relationship of udder and teat morphology to milking characteristics and udder health determined by ultrasonographic examinations in dairy cows. **Annals of Animal Science**, Krakow, v. 13, p. 783-795, 2013. DOI: 10.2478/aoas-2013-0053

WATTERS, R. D. et al. Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, p. 2595-2603, 2008. DOI: 10.3168/jds.2007-0615.

YASUGI, T.; KAIDO, T.; UEHARA, Y. Changes in density and architecture of microvessels of the rat mammary gland during pregnancy and lactation. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 52, p. 115-122, 1989. DOI: 10.1679/aohc.52.115

OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar o estado hemodinâmico mamário, o efeito do desempenho corporal sobre ele, assim como sua relação com os principais hormônios envolvidos na mamogênese de búfalas mestiças Murrah sadias em diferentes estados fisiológicos.

Objetivo específico:

- Determinar, pelo Doppler espectral, os índices de resistividade e pulsatilidade e o diâmetro interno das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas de búfalas mestiças Murrah jovens, adultas, vazias ou gestantes.
- Correlacionar os índices de resistividade e pulsatilidade e o diâmetro interno das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas com as concentrações plasmáticas de progesterona, fator semelhante a insulina tipo I, insulina, hormônio do crescimento e estradiol de búfalas mestiças Murrah durante as fases de crescimento, gestação e lactação.
- Correlacionar os índices de resistividade e pulsatilidade e o diâmetro interno das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas com o peso corporal de bezerras, novilhas, gestantes e lactantes mestiças Murrah.

HIPÓTESE

- Os parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias obtidos pela ultrassonografia Doppler são distintos nos diferentes estágios fisiológicos, sendo de maior intensidade no final da gestação e início da lactação.
- O desenvolvimento da glândula mamária é regido por variações hormonais que acarretarão diretamente em alterações hemodinâmicas do úbere de búfalas mestiças Murrah.
- O desenvolvimento corporal interfere nos índices Doppler da artéria mamária de bezerras, novilhas, gestantes e lactantes mestiças Murrah.

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1. Avaliação da artéria mamária de búfalas mestiças Murrah por ultrassonografia Doppler e sua regulação endócrina durante a fase de crescimento

(Artigo redigido segundo as normas da Journal of Animal Science, ISSN 1751-7311, fator de impacto JCR: 2,093. Disponível em: www.animalsciencepublications.org/files/publications/jas/jas-instructionstoauthors0209.pdf).

Avaliação da artéria mamária de búfalas mestiças Murrah por ultrassonografia Doppler e sua regulação endócrina durante a fase de crescimento

A. Dantas,*[1] V. M. V. Machado,* M. G. S. Charlier,† R. A. Oliveira,‡ A. J. Mendes, § E. Oba,*
*Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu; †Departamento de Diagnóstico por Imagem, Universidade de Uberaba, Uberaba, ‡Departamento de Bioestatística, Universidade Estadual Paulista, Botucatu; §Departamento de Produção Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu;

[1]Autor correspondente: dantas.vet@gmail.com

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar índices hemodinâmicos da artéria mamária e sua relação com os principais hormônios envolvidos na mamogênese de búfalas em diferentes fases de desenvolvimento corporal. Utilizou-se 12 fêmeas mestiças Murrah, distribuídas em dois grupos (n= 6): grupo 1 (bezerras) e grupo 2 (novilhas), mantidas sob sistema de manejo extensivo. Foram realizados exames de ultrassonografia (Doppler) das artérias mamárias cranial e caudal, com intervalo de 28 dias cada, para determinação dos índices resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) e diâmetro interno do vaso (DI), durante um ano. Adicionalmente, realizou-se a pesagem (kg) e a colheita de sangue para a avaliação das concentrações plasmáticas do fator semelhante a insulina tipo I (IGF-I), insulina (INS), hormônio do crescimento (GH), progesterona (P_4) e estradiol (17β-E_2). Utilizou-se análise de variância (ANOVA), com medidas repetidas no período de 12 meses, coeficiente de correlação de Spearman e regressão não linear múltipla, com diferenças estatisticamente significativas quando $P<0,05$. Nos grupos 1 e 2, houve diminuição progressiva do IR e IP e aumento constante do DI, do primeiro ao último mês do estudo ($P<0,0001$). No grupo 1, houve correlações fortes do IR com o IP ($r= 0,94$; $P<0,0001$) e com o DI ($r= -0,98$; $P<0,0001$), além do IP com o DI ($r= -0,98$; $P<0,0001$). No grupo 2, o IR foi fortemente correlacionado com o IP ($r= 0,99$; $P<0,0001$)

e com o DI (r= -0,95; P<0,0001) e o IP teve também correlação forte com o DI (r= -0,98; P<0,0001). No grupo 1, os três parâmetros Doppler correlacionaram-se significativamente com as concentrações plasmáticas do IGF-I, GH e P_4 (P<0,05), entretanto, com magnitude variada, enquanto no grupo 2, houve correlação do IR, IP e DI apenas com o IGF-I e P_4, sendo essas de forte intensidade. No grupo 1, detectou-se efeito linear do peso corporal sobre o IR (R^2= 0,97; P= 0,0054) e o DI (R^2= 0,97; P= 0,0069) e no grupo 2, o peso corporal teve influência quadrática sobre o IR (R^2= 0,97; P= 0,0116) e o DI (R^2= 0,97; P= 0,0001). Verificou-se que a variação dos índices Doppler obtidos das artérias mamárias foi semelhante, independentemente da idade, repercutindo a ação hormonal e o estado vascular da glândula mamária de búfalas sadias nas fases de crescimento avaliadas.

Palavras-chave: avaliação hormonal, búfalas leiteiras, Doppler, fluxo sanguíneo mamário, mamogênese

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da glândula mamária é um processo complexo e dinâmico, regulamentado principalmente por ação hormonal que, por interações sincronizadas, permitem o desenvolvimento de diferentes estruturas em distintas intensidades de crescimento (AKERS et al., 2000).

Segundo Sinha e Tucker (1969), a maior parte do desenvolvimento mamário ocorre após o nascimento e é caracterizado pela interação de etapas de crescimento de mesma proporção (isométrico) ou superior (alométrico) à taxa de desenvolvimento corporal, nas quais ocorrem acentuado desenvolvimento de tecido adiposo, ductos e parênquima mamário.

Entretanto, a magnitude do desenvolvimento mamário nos primeiros anos de vida determinará a extensão do desenvolvimento lóbulo-alveolar na vida produtiva do animal

(Sejrsen e Foldager, 1992). Desse modo, a realização de estudos nas distintas fases de desenvolvimento da glândula mamária tem sido de interesse crescente.

Nesse sentido, tem-se buscado métodos alternativos de pesquisa que reduzam o tempo e o custo das análises, bem como permita a avaliação *in vivo* dos animais, de forma não invasiva e em tempo real. A ultrassonografia mamária representa uma ferramenta de importância significativa na área de investigação da fisiologia animal e quando associada ao Doppler fornece informações sobre o fluxo sanguíneo, tornando as avaliações mais completas (Carvalho et al., 2008).

Contudo, valores de referência para interpretação dessas informações são escassos, principalmente na espécie bubalina e, mediante o grande avanço da produção de leite de búfalas no Brasil, estudos abrangendo os aspectos fisiológicos tornaram-se fundamentais.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias por ultrassonografia Doppler e relacioná-los com os principais hormônios envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária de búfalas em diferentes fases de desenvolvimento corporal.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP com o Protocolo nº 79/2013.

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu/SP, no setor de bubalinocultura localizado 22° 49’ de latitude sul e 48° 24’ de latitude oeste e altitude aproximada de 597

metros. Clima temperado quente (Mesotérmico) úmido, com inverno seco e verão quente e úmido, apresentando estação chuvosa de outubro a março.

Delineamento experimental

Animais

Foram utilizadas 12 búfalas mestiças Murrah, pertencentes ao mesmo rebanho, clinicamente saudáveis, separadas em dois grupos (n= 6), sendo bezerras (grupo 1) e novilhas (grupo 2), com idades iniciais de zero e 12 meses, respectivamente, avaliadas durante um ano.

Os critérios de inclusão dos animais no estudo foram: (a) inexistência de anormalidades no exame físico geral e na glândula mamária (inspeção e palpação), conforme descrito por Feitosa (2008); (b) ausência de histórico de doenças reprodutivas ou da glândula mamária; (c) escolha de fêmeas filhas do mesmo reprodutor (mestiço Murrah), para minimizar a influência da heterogeneidade nas características hemodinâmicas.

Manejo dos animais

Os grupos foram mantidos separados em piquetes com bebedouro, cocho coberto e pastagem formada por *Brachiaria Brizantha* cv. Xaraés; e submetidos ao pastejo rotacionado, com fornecimento de mistura mineral *ad libitum*. As bezerras permaneceram com as suas mães até completarem sete meses de idade, quando a desmama foi realizada.

Ultrassonografia

Exames ultrassonográficos das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas foram realizados com intervalos de 28 dias durante o período de um ano, executados sempre no período da manhã, pelo mesmo operador e assistente. Utilizou-se aparelho de ultrassom (Mylab 30; Esaote® SpA, Firenze, Itália) equipado de transdutor linear com frequência de 13 MHz.

No presente trabalho preconizou-se a avaliação das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas como parâmetros representativos, dada a constatação da ausência de diferença

estatística dos principais índices hemodinâmicos da glândula mamária esquerda em comparação com a direita, em diversos trabalhos científicos em ruminantes (Potapow et al., 2010; Petridis et al., 2014; Barbagianni et al., 2015).

O tempo de duração de cada avaliação não excedeu a 15 minutos e todos os exames foram feitos com animais em estação e não anestesiados. Antes de cada avaliação, realizou-se a tricotomia do úbere e aplicação de gel como meio de contato para transmissão ultrassônica (Carbogel - ULT, Carbogel Ind. e Com. Ltda).

As fêmeas do grupo 2 foram submetidas a um período de adaptação, cujo objetivo foi condicioná-las ao manejo que seria realizado durante o experimento e consistiu na ambientação dos animais, ao local, as pessoas e as atividades realizadas nos exames ultrassonográficos. Iniciou-se três meses antes do período experimental e foi caracterizado pela manipulação semanal dos animais.

O transdutor foi posicionado sobre a superfície cranial da glândula mamária, paralelamente à teta (ultrassonografia transcutânea), e o registro das imagens foi realizado em planos sagital e transversal em MODO B (Fig. 1). Primeiramente, a artéria mamária cranial esquerda foi localizada pelo Colour Doppler e, posteriormente, com uso do Doppler espectral, o cursor foi posicionado sobre a artéria a ser avaliada.

O ângulo de insonação utilizado não excedeu 60°. Foram obtidas e registradas imagens das secções transversais da porção inicial da artéria e todas as avaliações feitas na artéria mamária cranial esquerda foram, em seguida, repetidas na artéria mamária caudal esquerda.

As imagens ultrassonográficas foram analisadas comparativamente por três avaliadores, em momentos diferentes, e seus resultados, posteriormente, confrontados. Foram considerados aprovados, após a concordância dos três avaliadores. As avaliações quantitativas foram realizadas com uso do software MyLab (MyLab®Desk software, Esaote, Genova, Italy) e baseou-se na morfologia da curva espectral de ondas de mesma amplitude sistólica e diastólica,

obtidas de três ciclos cardíacos consecutivos (Fig. 2), para cálculo dos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) de cada vaso, conforme as fórmulas: IR= (PVS-VDF)/PSV e PI= (PVS-VDF)/MTVM, onde o PVS é o pico da velocidade sistólica, VDF a velocidade diastólica final e MTVM a média de tempo da velocidade máxima (Ginther, 2007). Foi calculado também o diâmetro interno de cada vaso (DI), expresso em cm.

Avaliação hormonal e pesagem dos animais

Imediatamente após o final de cada exame, amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular usando tubos heparinizados (Vacutainer, 10 mL; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas (2.500 X g por 30 min) para a separação do plasma. As amostras de plasma foram armazenadas em alíquotas de 1mL e congeladas a -20°C até serem analisadas.

Foram aferidas as concentrações plasmáticas de fator semelhante a insulina tipo I (IGF-I), insulina (INS), hormônio do crescimento (GH), progesterona (P_4) e estradiol (17β-E_2), utilizando-se kits comerciais. Com exceção do 17β-E_2, que foi avaliado por ensaio imunoenzimático (EIA), todos os demais hormônios foram quantificados por radioimunoensaio (RIA).

Para avaliação das concentrações plasmáticas do IGF-I foi utilizado o IRMA IGF-I A15729 (Immunotech, Beckman Coulter, Prague, Czech Republic), da INS o Insulin IRMA Kit IM3210 (Immunotech, Beckman Coulter, Prague, Czech Republic), do GH seguiu-se a metodologia proposta por National Hormone e Peptide Program, Harbor- Unisersity of California, Torrance, CA, USA), da P_4 o RIA Progesterone IM1188 (Immunotech, Beckman Coulter, Prague, Czech Republic) e do 17β-E_2 o Estradiol EIA Kit (n° 582251, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA).

Ressalta-se que as instruções de cada fabricante foram rigorosamente seguidas e os valores das concentrações do IGF-I, GH e P_4 foram determinados em nanograma por mililitro

(ng/mL), a INS em μIU/mL (microunidades internacionais) e o 17β-E_2 em picograma por mililitro (pg/mL). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo os coeficientes de variação intra-ensaio de 4,2, 12,3, 10,0, 6,0, e 6,0 para o IGF-I, INS, GH, P_4 e 17β-E_2, respectivamente, e o coeficiente de variação inter-ensaio de 8,5, 14,3, 12,4, 9,7, e 9,5 para o IGF-I, INS, GH, P_4 e 17β-E2, respectivamente.

Após a colheita de sangue, os animais foram pesados em balança digital e o peso corporal (PC) expresso em quilogramas (kg).

Análise estatística

Para análise estatística dos dados coletados, foi utilizado o procedimento PROC GLM do software SAS® (Statistical Analysis System, 2009) e alguns gráficos foram construídos para facilitar a interpretação dos dados, mediante a visualização dos resultados principais. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) para avaliação das médias das variáveis IR, IP e DI (artérias mamárias cranial e caudal), considerando as medidas repetidas ao longo do tempo. Foram classificados como covariáveis os grupos experimentais (1 e 2) e as diferenças foram estatisticamente significativas quando $P<0,05$.

Para estudar os efeitos fixos dos meses e dos pesos, considerou-se os efeitos lineares e quadráticos, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + b_1 Mês_j + b_2 Peso + b_3 Peso^2 + b_4 artérias\ mamárias_k + b_5 Mês_j * artérias\ mamárias_k + e_{ijk},$$

em que Y_{ijk} representa a variável estudada em função do i-ésimo indivíduo, no j-ésimo mês, no k-ésimo grupo da artéria mamária, considerando a covariável contínua peso, com efeito linear e quadrático. μ é a média geral, b_1, b_2, b_3, b_4 e b_5 são os coeficientes dos efeitos fixos do modelo estatístico a serem estimados, mês*artérias mamárias representa possível interação entre o mês e as artérias mamárias e e_{ijk} é o erro experimental, que são considerados independentes e identicamente distribuídos com média 0 e variâncias iguais a σ^2.

Como não houve diferença estatística para os índices hemodinâmicos, quando comparado a artéria mamária cranial com a caudal, utilizou-se a média de cada variável hemodinâmica como parâmetros representativos de cada animal em cada grupo.

Para estudar a possível relação linear entre os valores médios de IR, IP e DI e desses, com as médias das concentrações plasmáticas dos hormônios mensurados durante o período experimental, foram calculadas correlações não-paramétricas de Spearman, pois as distribuições das concentrações plasmáticas dos hormônios dosados foram assimétricas. O coeficiente de correlação foi considerado como nulo (r= 0), baixo ($0 < r \leq 0,30$), moderado (r= $0,30 < r \leq 0,70$) e forte ($0,70 < r \leq 1$), segundo Levine et al. (2012).

Para investigar a eventual relação não linear existente entre a influência quadrática da média do PC e as variáveis hemodinâmicas de cada grupo, ajustou-se um modelo de regressão não linear múltipla: $\hat{Y}i = \beta_0 + \beta_1 peso + \beta_2 peso^2 i + \beta_3 mês + ei$, em que $\hat{Y}i$ representa uma variável hemodinâmica (IR, IP ou DI), β_0 o valor do intercepto, β_1 o coeficiente de regressão da média do peso, β_2 coeficiente de regressão da média do peso quadrático, β_3 coeficiente de regressão do mês e ei o erro experimental.

Para cada grupo experimental, foram geradas equações de predição de IR, IP e DI em função da média do PC, utilizando os dados que apresentaram diferença significativa para a relação do PC com as características hemodinâmicas.

RESULTADOS

Nos grupos 1 e 2, houve variação dos índices hemodinâmicos do primeiro ao último mês de avaliação, apresentando redução de IR e IP ($P<0,0001$) e aumento do DI ($P<0,0001$) (Fig. 3).

No grupo 1, os índices vasculares correlacionaram-se significativamente uns com outros, sendo que o IR correlacionou-se forte e positivamente com o IP (r= 0,94; P<0,0001) e negativamente com o DI (r= -0,98; P<0,0001). Do mesmo modo, o IP teve correlação forte e negativa com o DI (r= -0,98; P<0,0001). Nas fêmeas do grupo 2, houve correlação significativa e forte, sendo essa, positiva entre IR e IP (r= 0,99; P<0,0001) e negativa, entre o IR e DI (r= -0,95; P<0,0001), bem como entre o IP e o DI (r= -0,98; P<0,0001) (Tabela 1).

Além disso, foi constatado, no grupo 1, que os parâmetros Doppler estudados correlacionaram-se significativamente com as concentrações plasmáticas de IGF-I, GH e P_4 (P<0,05), sendo observado, correlação forte e negativa do IR e IP com o IGF-I e moderada e positiva, com o GH e a P_4. Já a correlação do DI com o IGF-I, foi forte e positiva e com o GH e a P_4, foi moderada e negativa (Tabela 1). No grupo 2, as correlações entre o IR, IP e DI com o IGF-I e P_4, foram predominantemente fortes. Contudo, a correlação do IR e IP com o IGF-I foi positiva e do DI com a IGF-I foi negativa. Já o IR e IP, apresentou correlação positiva com a P_4 e correlação negativa do DI com a P_4 (Tabela 1). A média da concentração plasmática dos hormônios dosados de cada grupo em cada mês está apresentado na Fig. 4.

No grupo 1, assim como no 2, os coeficientes de regressão do PC com os índices hemodinâmicos, foram na maioria significativos, sendo observado aumento do peso acompanhado por decréscimo no IR e ampliação do DI. A média do peso corporal de cada grupo em cada mês está apresentada na Fig. 5.

No grupo 1, detectou-se efeito linear do PC sobre IR (R^2= 0,97; P= 0,0054) e o DI (R^2= 0,97; P= 0,0069), sendo observado redução de 0,00082596 do IR e acréscimo de 0,00033865 do DI para cada aumento de 1 kg de PC das bezerras. No grupo 2, o PC teve influência quadrática sobre o IR (R^2= 0,97; P= 0,0116) e o DI (R^2= 0,97; P= 0,0001) (Fig. 6).

No grupo 1, a equação gerada para predizer IR a partir do PC foi $\hat{Y}i$= 0,86934 - 0,00082596(Peso) - 0,00366(Mês) e para predizer o DI em função do PC foi $\hat{Y}i$= 0,06619 +

0,00033865(Peso) + 0,00388(Mês). Para o grupo 2, a equação obtida para predição do IR em função do PC foi: $\hat{Y}i= 1,27419 - 0,00216(Peso) + 0,00003689(Peso^2) + 0,00392(Mês)$, e para estimar o DI a partir do PC, a equação foi: $\hat{Y}i= -0,39927 + 0,00336(Peso) - 0,00000486(Peso^2) + 0,00240(Mês)$.

Quanto a qualidade do ajuste do modelo da ação quadrática do PC sobre as variáveis hemodinâmicas, nota-se que no grupo 1, a proporção da variância do IR e DI que pode ser explicada pela variável peso, é de 97,61% e 97,56%, respectivamente. Enquanto que no grupo 2, o efeito quadrático do PC explica 97,12% e 97,74% da variação em IP e DI, respectivamente.

DISCUSSÃO

Em ambos os grupos houve diminuição gradativa de IR e IP e aumento do DI, com a progressão da idade dos animais, o que implica em redução da resistência vascular e aumento contínuo da perfusão sanguínea, assim como, do lúmen arterial, decorrentes do aumento do aporte sanguíneo e da prevista ampliação da demanda de nutrientes e oxigênio em resposta ao desenvolvimento do tecido mamário aguardado para esse período. O que corroboraram com Prosser et al. (1996) que afirmam que o fluxo sanguíneo mamário e o desenvolvimento da glândula estão diretamente relacionados.

A avaliação do IR também fornece informações relacionadas ao estado metabólico dos órgãos, onde valores decrescentes de IR sugerem aumento de metabolismo (Carvalho et al., 2008). Assim, a diminuição contínua do IR observada no presente estudo, nos dois grupos, está relacionada com o aumento da atividade metabólica no tecido, consequentes do desenvolvimento mamário previsto para o período em que os animais foram avaliados, havendo coerência entre as fases de cria e recria. O que está em conformidade com Huth (1995), que afirma que o fornecimento de sangue para a glândula mamária ocorre de acordo com a intensidade de seu metabolismo.

Os resultados obtidos referentes ao IP evidenciam informações quantitativas da perfusão sanguínea da glândula, durante um ciclo cardíaco completo (Carvalho et al., 2008). Assim, a redução do IP, além de sugerir vasodilatação, também indica aumento do débito cardíaco. Contudo, os dados do IP observados em ambos os grupos, sugerem que o aumento da quantidade de sangue transferido para a glândula mamária durante o período experimental, foi moderado, o que implica em ausência de sobrecarga do sistema circulatório.

Do mesmo modo, o aumento do DI das artérias mamárias dos animais dos dois grupos ao longo do presente estudo, provavelmente contribuiu para o aumento do aporte sanguíneo mamário e dessa forma favoreceu o desenvolvimento do tecido mamário.

Nos dois grupos, as características hemodinâmicas correlacionaram significativamente entre si, sendo observado expressiva equivalência entre o IR e o IP, visto que a diminuição de uma variável ocorreu estreitamente associada a redução da outra, repercutindo assim, o aumento da perfusão sanguínea intramamária que ocorreu em virtude do seu desenvolvimento estrutural. Além disso, a diminuição do IR e IP esteve relacionada ao acréscimo correspondente do DI, sugerindo que o aumento do fluxo sanguíneo mamário está atribuído ao aumento do lúmen arterial, devido ao desenvolvimento mamário, sendo, portanto, bons parâmetros para análise da regulamentação sanguínea local.

Em ambos os grupos, a relação entre as mensurações hemodinâmicas e as variações das concentrações plasmáticas dos hormônios dosados, sugere forte associação entre elas, já que a maioria das correlações foram de magnitude moderada a forte. Nos grupos 1 e 2, o aumento das concentrações plasmáticas de IGF-I relacionou-se inversamente com o IR e IP, e, diretamente com o DI. Assim, o aumento do volume sanguíneo e do calibre arterial mamário, foi acompanhada pelo aumento das concentrações plasmáticas de IGF-I.

O que está de acordo com o período de desenvolvimento mamário avaliado, uma vez que o IGF-I apresenta importante função no processo de mamogênese de bezerras e novilhas,

atuando no desenvolvimento dos ductos mamários, permitindo maior ramificação e infiltração no interior da glândula, formando uma ampla rede de canais e tubos contínuos (Akers et al., 2000). Deste modo, mudanças nas concentrações plasmáticas de IGF-I foram refletidas, de forma consistente, na variação dos parâmetros Doppler mamários avaliados.

No grupo 1, a diminuição do IR e IP e aumento do DI, foi concomitante a redução da concentração plasmática do GH e da P_4. Assim, quanto menores os valores do IR e IP e maiores os valores de DI, e, por conseguinte, maior o aporte sanguíneo e lúmen arterial mamário, mais baixo foram as concentrações plasmáticas do GH e P_4.

O efeito do GH sobre o crescimento mamário é mediado indiretamente através do IGF-I, promovendo intensa proliferação ductal, acompanhada por evolução do estroma, bem como aumento da vascularização e do fluxo sanguíneo (AKERS et al., 2000). Contudo, seus níveis plasmáticos diminuem com o progredir da idade dos animais, pois os mecanismos que controlam a liberação do GH são mais ativos nos animais mais jovens, em crescimento (WAŃKOWSKA et al., 2010). Portanto, os resultados encontrados no presente estudo evidenciaram esperada relação mútua e de complementariedade entre o GH e o IGF-I.

A relação entre os parâmetros hemodinâmicos e as concentrações plasmáticas de P_4 observadas no grupo 1, foi de moderada magnitude. Isto pode ter ocorrido devido a idade dos animais avaliados, pois quanto mais jovens, mais baixos são os níveis plasmáticos desse hormônio (HAFEZ, 2004), atenuando assim a dependência entre as variáveis correlacionadas.

No grupo 2, a redução do IR e IP e o incremento do DI, também esteve relacionado com a diminuição da concentração plasmática de P_4. No entanto, tal fato possivelmente pode estar relacionado com o início da puberdade nas fêmeas desse grupo, durante o período experimental. As concentrações plasmáticas de P_4 variam ao longo das diferentes fases do ciclo estral (HAFEZ, 2004), consequentemente, alguns dias da coleta de sangue podem ter coincidido com as fases do ciclo em que a concentração plasmática desse hormônio é baixa.

Os resultados também mostraram de forma significativa, em ambos os grupos, que a relação do PC com os índices vasculares, foi relevante, denotando forte evidência de associação entre as variáveis estudadas. Contudo, a influência do PC sobre os parâmetros hemodinâmicos foi diferente entre os grupos, sendo do tipo linear nas bezerras e quadrática nas novilhas. Isto ocorreu, possivelmente porque a velocidade de crescimento é mais intensa, do nascimento até a metade do peso adulto, desacelerando conforme aproximam da puberdade, e posteriormente diminuindo progressivamente até atingirem a maturidade fisiológica (OWENS et al., 1995).

Assim, a variação do PC ocorreu aliada ao aumento da perfusão sanguínea e do calibre das artérias mamárias, sendo, portanto, mecanismos adaptativos importantes que, provavelmente, contribuíram com a manutenção do estado dinâmico da glândula, à medida em que os animais se tornavam adultos, refletindo assim, o estreitamento da relação entre o ganho de PC, arquitetura vascular, perfusão sanguínea e desenvolvimento mamário, mostrando assim potenciais implicações para a seleção de animais jovens com características leiteiras.

CONCLUSÃO

Os índices hemodinâmicos das artérias mamárias refletem a ação hormonal estudada e podem ser considerados preditores da progressão do desenvolvimento mamário basal de búfalas mestiças Murrah sadias durante os dois primeiros anos de vida.

REFERÊNCIAS

Akers, R. M. 2002. Lactation and the mammary gland. 1th. ed. Blackwell Publishing, Desmoines, IA.

Barbagianni, M. S., P. G. Gouletsou, I. Valasi, I. G. Petridis, I. Giannenas, e G. C. Fthenakis. 2015. Ultrasonographic findings in the ovine udder during lactogenesis in healthy ewes or ewes with pregnancy toxaemia. J Dairy Res. 82:293-303. doi: 10.1017/S0022029915000382

333 Carvalho, C. F., M. C. Chammas, e G. G. Cerri. 2008. Princípios físicos do Doppler em ultra-
334 sonografia: revisão bibliográfica. Cienc Rural. 38:872-879. doi:
335 http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300047
336
337 Feitosa, F. L. F. 2008. Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico. In: Feitosa, F. L. F. editor,
338 Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico. Roca, São Paulo, SP. p. 353-352.
339
340 Ginther, O. J. 2007. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler
341 Ultrasonography. 4th ed. Equiservices Publishing, Cross Plains, WI.
342
343 Hafez, E.S. 2004. Fisiologia da reprodução. 7th. ed. Manole, São Paulo, SP. p. 513.
344
345 Huth, F. W. 1995. Die Laktation des Rindes: Analyse, Einfluβ, Korrektur, 1th ed. Verlag Eugen
346 Ulmer, Stuttgart, BW, Germany.
347
348 Levine, D. M, Berenson, M. L. e Stephan, D. 2012. Estatística: Teoria e Aplicações. 6th ed.
349 LTC, Rio de Janeiro, RJ.
350
351 Owens, F. N., D. R. Gill, D. S. Secrist e S. W. Coleman. 1995. Review of some aspects of
352 growth and development of feedlot cattle. J. Anim. Sci. 73:3152-3172. doi:
353 10.2527/1995.73103152x
354
355 Petridis, I. G., P. G. Gouletsoua, M. S. Barbagiannia, G. S. Amiridisa, C. Brozosa, I. Valasia, e
356 G. C. Fthenakis. 2014. Ultrasonographic findings in the ovine udder during involution. J
357 Dairy Res. 81:288-296. doi: 10.1017/S0022029914000223
358
359 Potapow, A., C. Sauter-Louis, S. Schmauder, J. Friker, C. P. Nautrup, D. Mehne, W. Petzl, e
360 H. Zerbe. 2010. Investigation of mammary blood flow changes by transrectal colour
361 Doppler sonography in an Escherichia coli mastitis model. J Dairy Res. 77:205-212. doi:
362 77:205-212. 10.1017/S0022029910000105
363
364 Prosser, C. G., S.R. Davis, V. C. Farr, e P. Lacasse. 1996. Regulation of blood flow in the
365 mammary microvasculature. J Dairy Sci. 7:1184-1197.
366
367 SAS Institute. 2009. Statistical Analysis System 2009. Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary,
368 NC.
369
370 Sejrsen, K. e J. Foldager. 1992. Mammary growth and milk production capacity of replacement
371 heifers in relation to diet energy concentration and plasma hormone levels. Acta Agric.
372 Scand. A Anim. Sci. 42:99-105.
373
374 Sinha, Y. N. e H. A. Tucker. 1969. Mammary development and pituitary prolactin level of
375 heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. J Dairy Sci. 52:507-512.
376
377 Wańkowska M, e J. Polkowska. 2010. The pituitary endocrine mechanisms involved in
378 mammalian maturation: maternal and photoperiodic influences. Reprod Biol. 10:3-18.
379
380

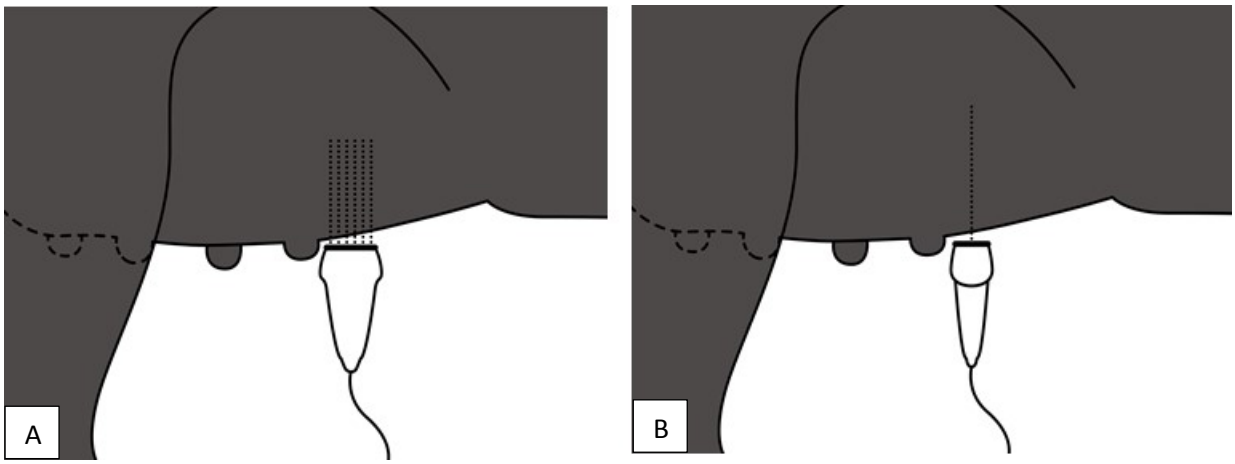


Figura 1. Posicionamento do transdutor sobre a superfície cranial da glândula mamária, paralelamente à teta (ultrassonografia transcutânea), e o registro das imagens realizado em planos sagital (A) e transversal (B)

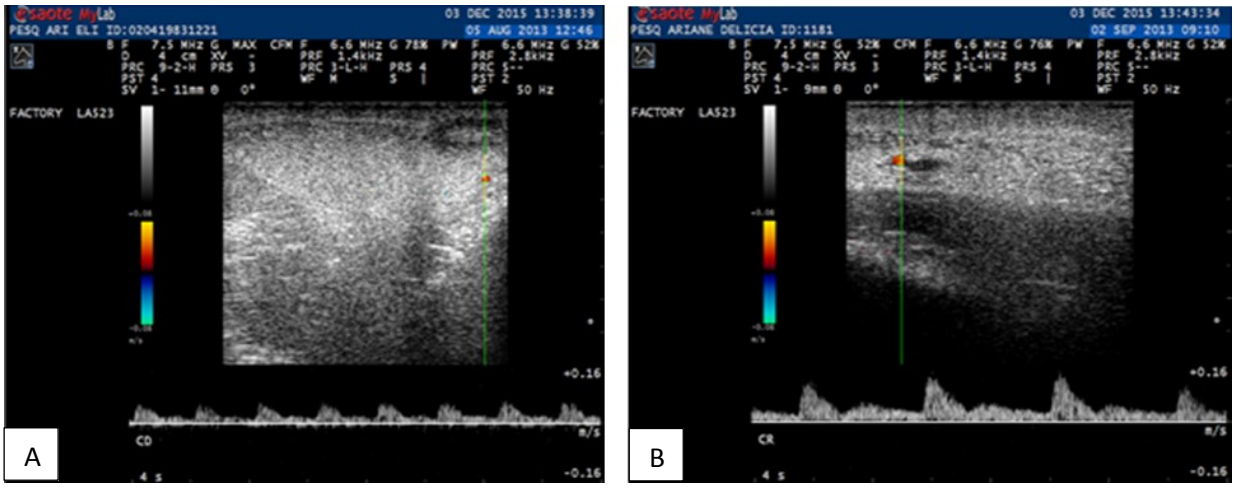


Figura 2. Morfologia da curva espectral de ondas de mesma amplitude sistólica e diastólica, obtidas de três ciclos cardíacos consecutivos das artérias mamárias esquerdas de bezerras (A) e novilhas (B) mestiças Murrah, avaliadas durante o experimento

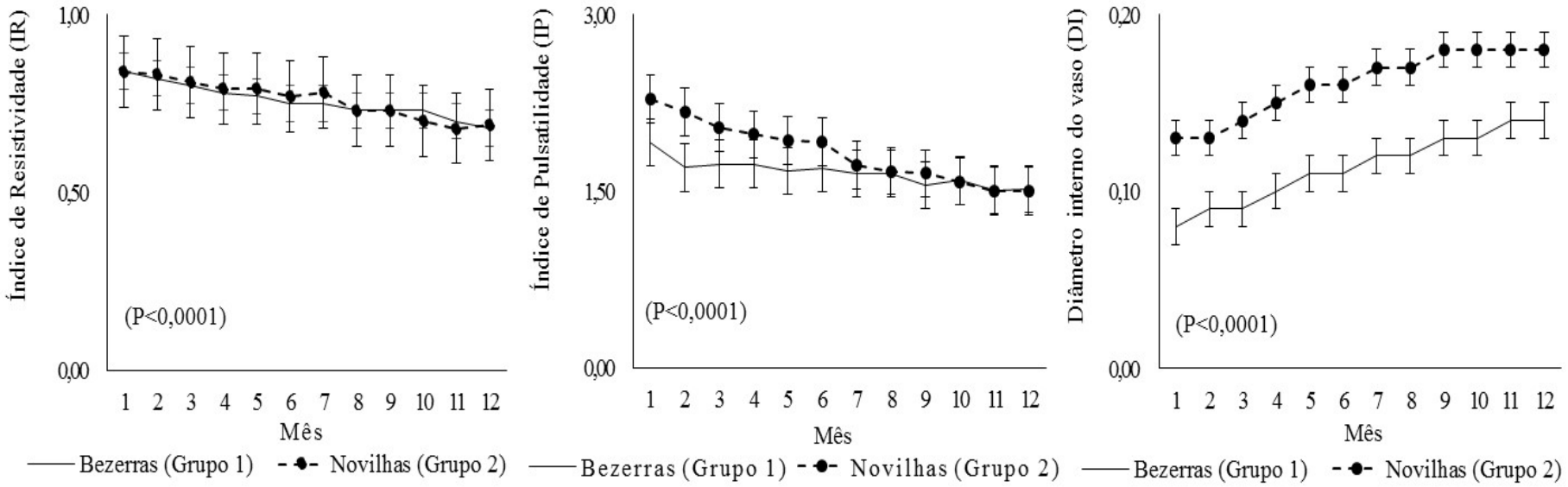


Figura 3. Médias do índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B) e diâmetro interno (C) das artérias mamárias de bezerras (Grupo 1) e novilhas (Grupo 2) mestiças Murrah, avaliadas durante 12 meses

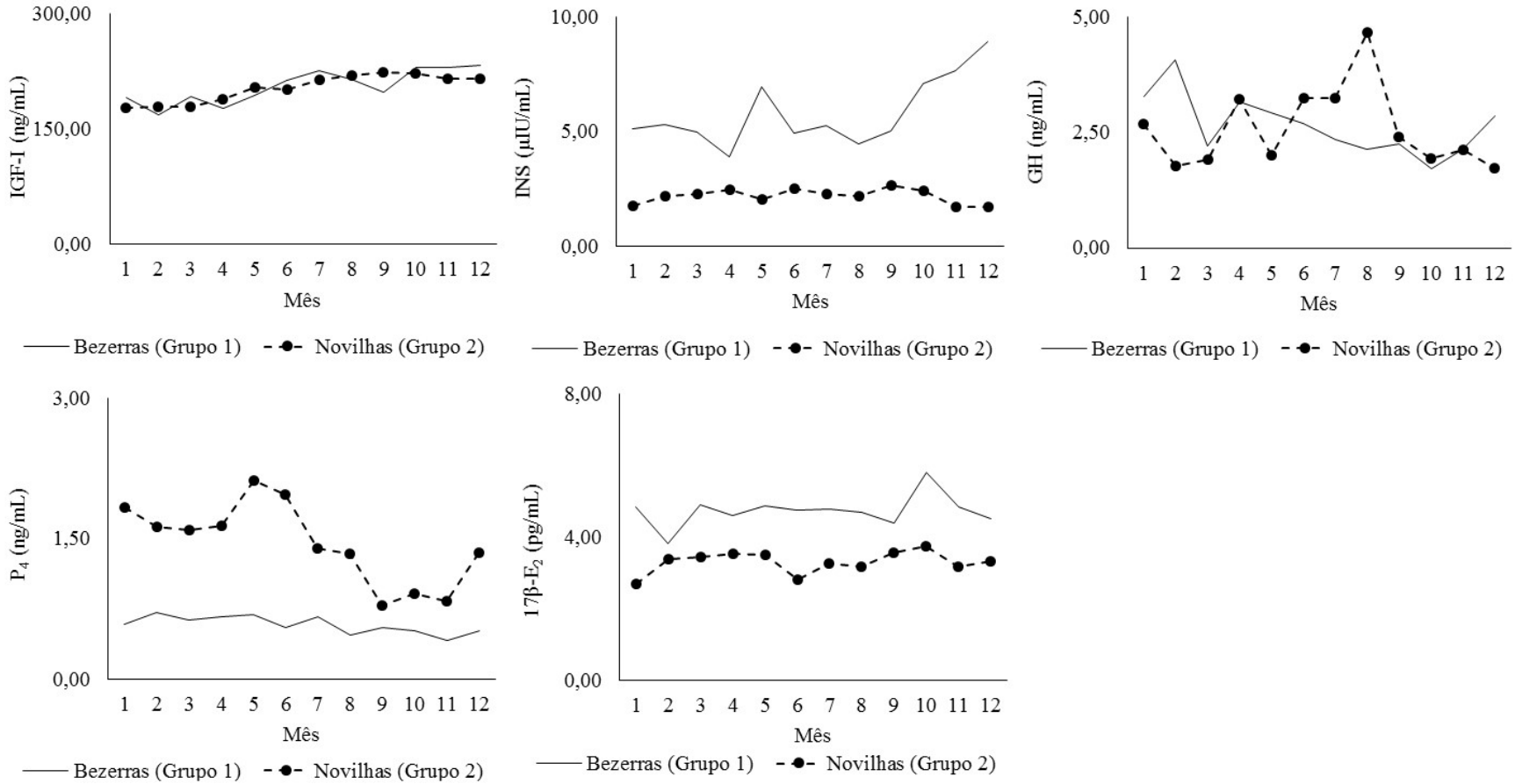


Figura 4. Média da concentração plasmática dos hormônios dosados de cada grupo em cada mês

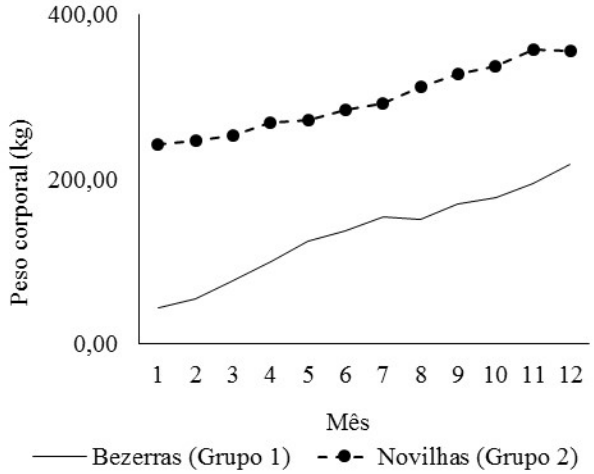
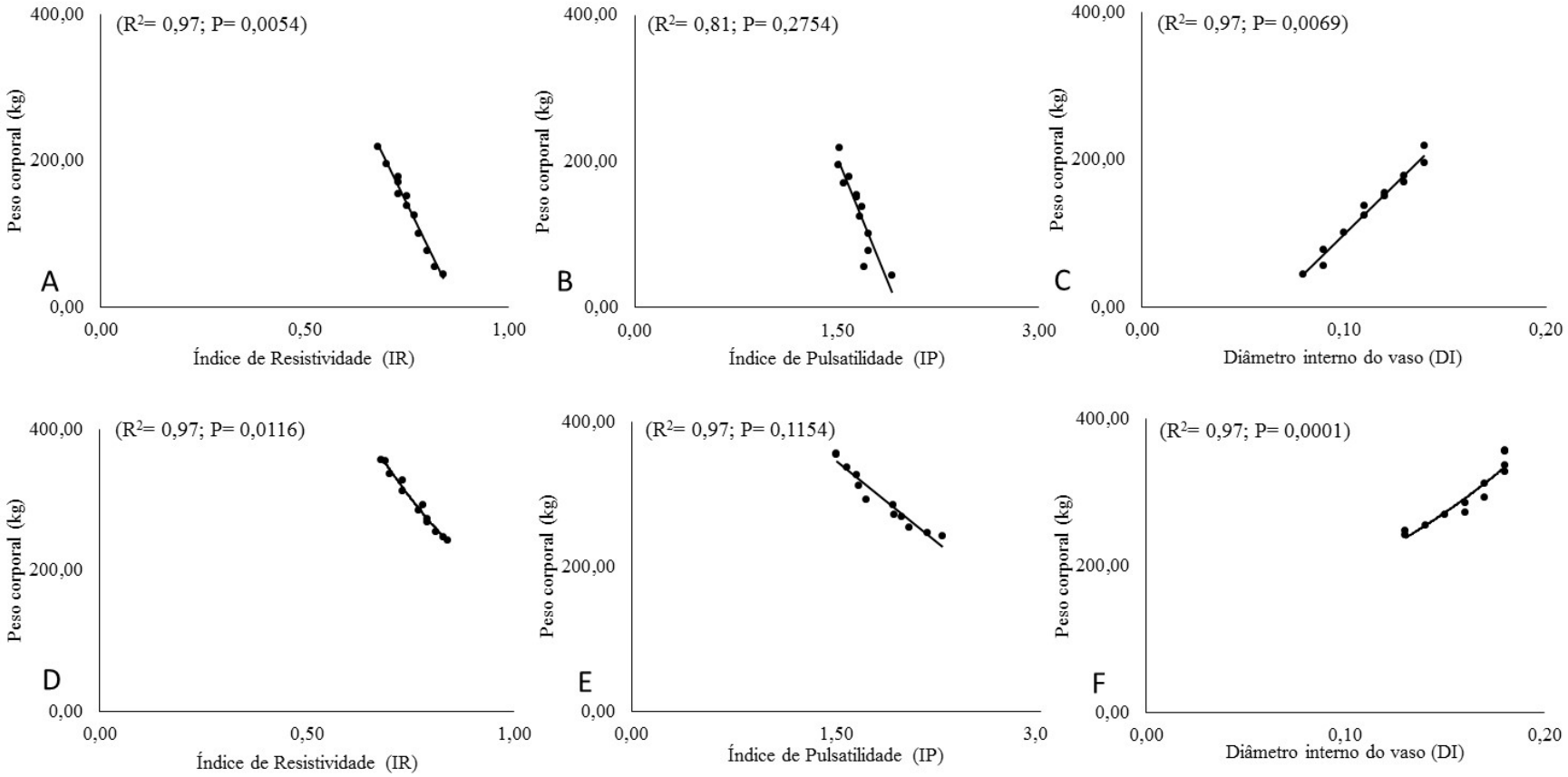


Figura 5. Evolução do peso das fêmeas dos grupos 1 e 2 em cada pesagem durante todo experimento

Tabela 1. Coeficientes de correlação Spearman e os níveis de significância obtidos entre os parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias e com as concentrações plasmáticas dos hormônios dosados em bezerras (Grupo 1) e novilhas (Grupo 2) mestiças Murrah, durante a fase de crescimento

Bezerras (Grupo 1)								
	IR	IP	DI	IGF-I	INS	GH	P_4	17β-E_2
IR	1,000	0,94* <0,0001	-0,98* <0,0001	-0,90* <0,0001	-0,42 0,1783	0,63* 0,0277	0,65* 0,0046	0,12 0,7023
IP	0,94* <0,0001	1,000	-0,98* <0,0001	-0,85* 0,0004	-0,59 0,0537	0,57* 0,0438	0,62* 0,0320	0,14 0,6715
DI	-0,98* <0,0001	-0,98* <0,0001	1,000	0,89* <0,0001	0,52 0,0841	-0,60* 0,0408	-0,67* <0,0168	-0,10 0,7517
Novilhas (Grupo 2)								
	IR	IP	DI	IGF-I	INS	GH	P_4	17β-E_2
IR	1,000	0,99* <0,0001	-0,95* <0,0001	-0,85* <0,0005	0,12 0,7038	0,01 0,9654	0,72* <0,0084	-0,09 0,7860
IP	0,99* <0,0001	1,000	-0,98* <0,0001	-0,87* <0,0002	0,14 0,6561	0,06 0,8454	0,74* <0,0059	-0,14 0,6715
DI	-0,95* <0,0001	-0,98* <0,0001	1,000	0,92* <0,0001	-0,04 0,9121	-0,03 0,9295	-0,77* <0,0035	0,23 0,4626

*Estatisticamente significativas quando P<0,05.



405
406 **Figura 6.** Relação entre o peso corporal e o índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B) e o diâmetro interno (DI) das artérias
407 mamárias de bezerras (Grupo 1) e o índice de resistividade (D), índice de pulsatilidade (E) e o diâmetro interno (F) das artérias mamárias de
408 novilhas (Grupo 2) mestiças Murrah, avaliadas durante o estudo

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2. Avaliação por ultrassonografia Doppler da artéria mamária de búfalas mestiças Murrah e aspectos endócrinos durante a gestação e lactação

(Artigo redigido segundo as normas da Journal of Dairy Research, ISSN 0022-0299, fator de impacto: 2,573. Disponível em http://assets.cambridge.org/DAR/DAR_ifc.pdf)

Avaliação por ultrassonografia Doppler da artéria mamária de búfalas mestiças Murrah e aspectos endócrinos durante a gestação e lactação

A. Dantas,*[1] V. M. V. Machado,* M. G. S. Charlier,† R. A. Oliveira,‡ A. J. Mendes, § E. Oba,*
*Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu,
†Departamento de Diagnóstico por Imagem, Universidade de Uberaba, Uberaba, ‡Departamento de Bioestatística, Universidade Estadual Paulista, Botucatu,
§Departamento de Produção Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu

[1]Autor correspondente: dantas.vet@gmail.com

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias e relacioná-los com os principais hormônios envolvidos na mamogênese de búfalas gestantes e lactantes. Utilizou-se 12 fêmeas mestiças Murrah, distribuídas em dois grupos (n= 6): grupo 1 (gestantes) e grupo 2 (lactantes), com idades iniciais de 24 e 48 meses, respectivamente, mantidas sob sistema de manejo extensivo. Foram realizadas ultrassonografias Doppler das artérias mamárias esquerdas a cada 28 dias durante 10 meses e determinados os índices de resistividade (IR), pulsatilidade (IP) e o diâmetro interno do vaso (DI). Adicionalmente realizou-se a pesagem dos animais (kg) e a colheita de sangue para dosagem das concentrações plasmáticas da progesterona, fator semelhante a insulina tipo I (IGF-I), insulina (IN), hormônio do crescimento e estradiol (17β-E_2). Os dados de cada grupo foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas ao longo do tempo, correlação de Spearman e regressão múltipla, sendo considerado o nível de significância igual 0,05. Nos dois grupos, a artéria mamária caudal foi a que apresentou os valores hemodinâmicos estatisticamente mais significativos, sendo observado no grupo 1, menor IR ($P<0,0001$) e maior DI ($P<0,0001$), nos cinco e três meses finais do estudo, respectivamente; e no grupo 2, maior DI durante os sete primeiros meses do experimento ($P<0,0001$). Houve correlação do IR com o IP, tanto no grupo

1 (r= 0,98; P<0,0001) quanto no grupo 2 (r= 0,91; P= 0,0002), bem como do IR com o DI no grupo 1 (r= -0,98; P<0,0001) e no grupo 2 (r= -0,95; P<0,0001). Houve também correlação entre o IP e o DI, no grupo 1 (r= -0,98; P<0,0001) e no grupo 2 (r= -0,82; P<0,0034). Em ambos os grupos, o IR, IP e o DI correlacionaram-se fortemente com a IN, IGF-I e o 17β-E_2, sendo que apenas no grupo 1, o IR, IP e o DI correlacionaram-se também com a P_4 (P<0,05). O peso corporal apresentou apenas efeito quadrático, sendo esse, exclusivamente sobre o DI, no grupo 1 (R^2= 0,99; P<0,0001) e no grupo 2 (R^2= 0,95; P= 0,0002). Conclui-se que os índices hemodinâmicos evidenciam a ação dos hormônios avaliada e variam de acordo com o estado fisiológico, podendo ser considerados referência para a espécie avaliada.

Palavras-chave: búfala leiteira, mamogênese, fluxo sanguíneo mamário, Doppler, regulação hormonal

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da glândula mamária inicia-se antes mesmo do nascimento e persiste ao longo de toda a vida reprodutiva do animal. O desenvolvimento mamário é dinâmico e compreendido por etapas bem definidas, onde ocorrem a formação de diferentes componentes em distintas intensidades de crescimento (Sinha e Tucker, 1969).

A maior parte do desenvolvimento estrutural da glândula mamária ocorre durante a primeira gestação, sendo que ao final do período gestacional, a glândula passa de uma estrutura composta principalmente de tecido adiposo para uma estrutura repleta de células alveolares aptas a sintetizar e secretar leite (Dyce et., 2010).

O desenvolvimento mamário acelerado e a funcionalidade adquirida durante a gestação e lactação são regulados principalmente pela ação endócrina. Assim, o comprometimento da atividade hormonal durante esses períodos pode interferir no desenvolvimento mamário normal e na subsequente lactação (Svennersten-Sjaunja; Olsson, 2005). Desta forma, o suprimento

sanguíneo da glândula mamária é de extrema importância, pois é responsável pelo fornecimento de oxigênio, hormônios e nutrientes à glândula, sendo a artéria mamária o principal vaso de irrigação sanguínea da glândula mamária em ruminantes (Prosser et al., 1996).

O uso da ultrassonografia Doppler para avaliação da perfusão sanguínea da glândula mamária de vacas, ovelhas e cabras foi previamente relatada na literatura e tem mostrado ser particularmente interessante, pois permite a avaliação *in vivo*, de forma não invasiva e em tempo real de informações hemodinâmicas relacionadas ao estado funcional e saúde da glândula (Potapow et al., 2010; Petridis et al., 2014). Deste modo, a investigação da vascularização arterial mamária, mostra-se necessária, principalmente em búfalas mestiças Murrah, as quais são fêmeas que apresentam considerável potencial leiteiro e cujo tema não foi ainda abordado.

Os objetivos deste estudo foram avaliar, por meio de exame ultrassonográfico, os principais índices Doppler, o estado dinâmico arterial mamário, bem como sua relação com o desempenho ponderal e os principais hormônios envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária de búfalas gestantes e lactantes sadias.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, Brasil (CEUA-79/2013).

Delineamento experimental

Animais

O trabalho foi realizado com 12 búfalas mestiças Murrah clinicamente saudáveis, pertencentes ao mesmo rebanho, sendo seis gestantes primíparas (grupo 1) e seis lactantes multíparas não gestantes (grupo 2), com idades iniciais de 24 e 48 meses, respectivamente.

Os critérios de inclusão dos animais no estudo foram: (a) peso corporal compatível com o estado fisiológico; (b) ausência de histórico de doenças reprodutivas ou da glândula mamária; c) inexistência de anormalidades no exame físico geral e da glândula mamária (inspeção e palpação), conforme descrito por Feitosa (2008); (d) constatação da primiparidade gestacional das fêmeas do grupo 1, através da avaliação do histórico reprodutivo de cada animal aliado a idade cronológica (mês), visto que a maior parte do desenvolvimento da glândula mamária ocorre durante a primeira gestação (Dyce et al., 2010); (e) número de lactação igual a 3, para as fêmeas pertencentes ao grupo 2, pois o desenvolvimento fisiológico da glândula mamária, se completa na terceira lactação (Dyce et al., 2010).

Manejo dos animais

As búfalas do grupo 1 foram avaliadas do primeiro até o último mês de gestação e exames ultrassonográficos repetidos mensalmente durante o período experimental foram realizados para confirmar a manutenção da gestação.

Já os animais do grupo 2 foram avaliados desde o primeiro até o décimo mês de lactação e não foram submetidos ao manejo de ordenha. Segundo Borghese (2013) búfalas mestiças Murrah apresentam período de lactação com essa duração. As fêmeas desse grupo foram também submetidas a exames ultrassonográficos de mesmo intervalo aos realizados no grupo 1, para constatação da ausência de gestação.

Os grupos 1 e 2 foram mantidos separados em piquetes constituídos por pastagem formada por *Brachiaria Brizantha* cv. Xaraés, além de possuir também bebedouros e cochos cobertos. Os animais foram submetidos ao pastejo rotacionado, sendo fornecido mistura mineralizada *ad libitum* e concentrado comercial (1kg/animal) no final da gestação (último mês) e no início da lactação (primeiro mês), para as fêmeas do grupo 1 e do grupo 2, respectivamente. Ressalta-se que as lactantes (grupo 2) permaneceram com os seus filhotes até o sete mês de lactação, quando a desmama foi realizada.

Durante o período experimental foram realizadas repetidamente avaliações ultrassonográficas para avaliação visual de presença de estruturas anormais na glândula mamária. Na mesma ocasião, exames físicos também foram realizados, com atenção especial para as glândulas mamárias.

Ultrassonografia

A ultrassonografia das artérias mamárias esquerdas foi realizada a cada 28 dias, compreendendo 10 medições por animal durante todo o período experimental. As avaliações foram feitas com uso do aparelho de ultrassom (Mylab 30; Esaote® SpA, Firenze, Itália) equipado de transdutor linear com frequência de imagem de 3,5 MHz.

No presente trabalho preconizou-se a avaliação das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas como parâmetros representativos do animal, devido a observação de ausência de diferença estatística dos principais índices hemodinâmicos da glândula mamária esquerda quando comparada com a direita, em diversos estudos realizados em ruminantes, sendo, portanto, as medições de um lado consideradas representativas de ambos (Potapow et al., 2010; Petridis et al., 2014).

Os exames foram realizados sempre no período da manhã e executadas pelo mesmo operador, assistente e no local em que os animais foram condicionados durante fase de adaptação realizada antes do início do projeto, permitindo que as avaliações fossem feitas com animais em estação e não anestesiados e com duração entre 10 e 15 minutos para cada animal.

As fêmeas dos dois grupos foram submetidas a um período de adaptação, cujo objetivo foi condicioná-las ao manejo que seria realizado durante o experimento e consistiu na ambientação dos animais, ao local, as pessoas e as atividades realizadas nos exames ultrassonográficos. Iniciou-se três meses antes do período experimental e foi caracterizado pela manipulação semanal dos animais.

Antes de cada avaliação foi realizada a tricotomia do úbere e aplicação de gel de carboximetilcelulose (Carbogel - ULT, Carbogel Ind. e Com. Ltda) como meio de contato, para realização da condutividade ultrassônica. O transdutor foi posicionado sobre a superfície cranial da glândula mamária, paralelamente à teta (ultrassonografia transcutânea) e as imagens foram registradas em planos sagital e transversal em MODO B (Fig. 1).

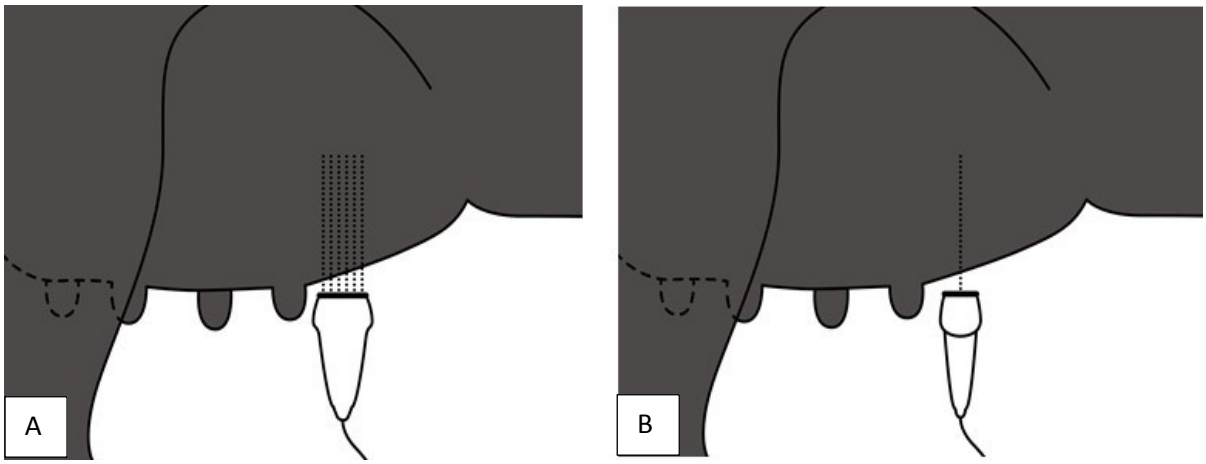


Figura 1. Demonstração do posicionamento do transdutor sobre a superfície cranial da glândula mamária, paralelamente à teta (ultrassonografia transcutânea) e as imagens foram registradas em planos sagital (A) e transversal (B)

A artéria mamária cranial esquerda foi identificada pelo Colour Doppler e em seguida com uso do Doppler espectral, o cursor foi posicionado sobre a artéria avaliada com ângulo de insonação ajustado em valores não superior a 60° e foram registradas imagens das secções transversais da porção inicial da mesma artéria e a conformação das ondas espectrais formadas. Todas as avaliações feitas na artéria mamária cranial esquerda foram posteriormente repetidas na artéria mamária caudal esquerda.

As imagens ultrassonográficas foram analisadas por três observadores, e seus resultados, comparados, sendo aprovados, somente com consentimento dos três avaliadores. As avaliações quantitativas foram realizadas com uso do software MyLab (MyLab®Desk software, Esaote, Genova, Italy) e baseou-se na modulação espectral das ondas de mesma amplitude sistólica e diastólica obtidas de três ciclos cardíacos consecutivos e no cálculo dos índices de resistividade (**IR**) e pulsatilidade (**IP**) de cada vaso (Figura 1), conforme as seguintes fórmulas: IR= (PVS-

VDF)/PSV e PI= (PVS-VDF)/MTVM, onde o PVS é o pico da velocidade sistólica, VDF a velocidade diastólica final e MTVM a média de tempo da velocidade máxima (Ginther, 2007). Além disso, o diâmetro interno (**DI**) de cada vaso foi calculado e os resultados expressos em cm.

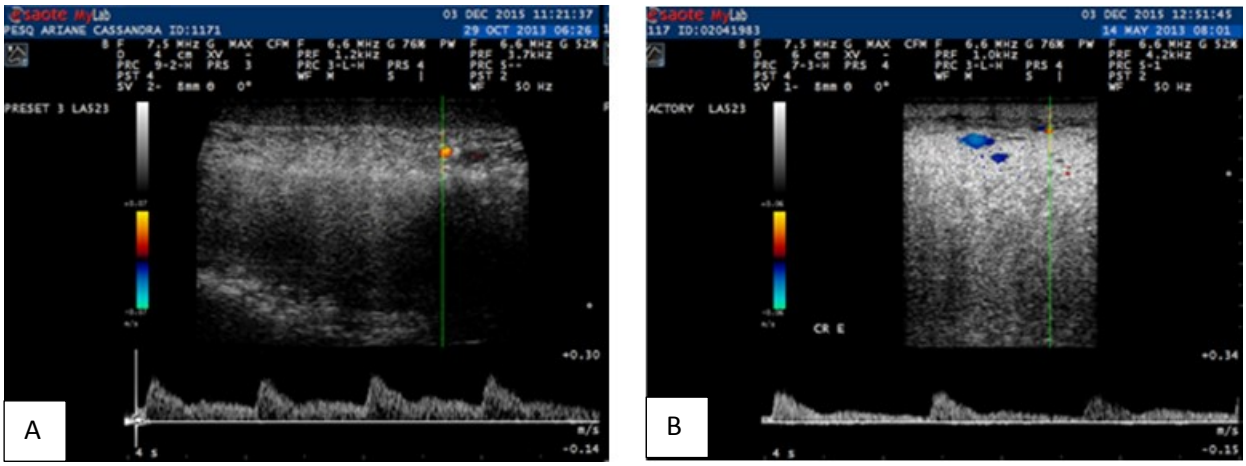


Figura 2. Demonstração da modulação espectral das ondas de mesma amplitude sistólica e diastólica obtidas de três ciclos cardíacos consecutivos das artérias mamárias esquerdas de búfalas mestiças Murrah gestantes (A) e lactantes (B), avaliadas durante o estudo.

Avaliação hormonal e pesagem dos animais

Amostras de sangue foram colhidas imediatamente após o final de cada exame, por punção da veia jugular usando tubos comerciais com 158 unidades USP de heparina sódica (Vacutainer, 10 mL; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugadas (2.500 × g por 30 min) para obtenção do plasma. As amostras de plasma foram armazenadas em alíquotas de 1mL em microtubos de polietileno identificados e congeladas a -20°C até serem analisadas.

Foram determinadas, por radioimunoensaio (RIA), as concentrações plasmáticas de progesterona (**P_4**), fator semelhante a insulina tipo I (**IGF-I**), insulina (**IN**), hormônio do crescimento (**GH**) e também estradiol (**17β-E_2**), sendo apenas este último hormônio avaliado por ensaio imunoenzimático (EIA).

Para determinação das concentrações plasmáticas de P_4 foi utilizado o RIA Progesterone IM1188 (Immunotech, Beckman Coulter, Prague, Czech Republic), para o IGF-I usou-se o IRMA IGF-I A15729 (Immunotech, Beckman Coulter, Prague, Czech Republic), a IN foi

avaliada utilizando o Insulin IRMA Kit IM3210 (Immunotech, Beckman Coulter, Prague, Czech Republic), o GH através da metodologia proposta por National Hormone e Peptide Program, Harbor (Unisersity of California, Torrance, CA, USA), e o 17β-E_2 foi dosado usando o Estradiol EIA Kit (n° 582251, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA).

Foram seguidas as instruções de cada fabricante e os valores das concentrações da P_4, IGF-I e GH determinados em nanograma por mililitro (ng/mL), a IN em microunidades internacionais por mililitro (μIU/mL) e o 17β-E_2 apresentado em picograma por mililitro (pg/mL).

Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo os coeficientes de variação intra-ensaio de 8,2, 1,96, 5,80, 15,0 e 3,4 para a P_4, IGF-I, IN, GH e 17β-E_2, respectivamente e o coeficiente de variação inter-ensaio de 10,3, 2,98, 8,93, 17,0 e 7,5 para a P_4, IGF-I, IN, GH e 17β-E_2, respectivamente. Após a colheita de sangue, os animais foram pesados em balança digital e o peso corporal (PC) expresso em quilogramas (kg).

Análise estatística

Todos os dados obtidos de cada grupo foram analisados pelo procedimento PROC GLM do software SAS® (Statistical Analysis System, 2009) e gráficos, com os principais resultados, foram gerados para facilitar a análise exploratória das variáveis.

Para avaliar as médias das variáveis IR, IP e DI (artérias mamárias cranial e caudal) durante a gestação e lactação, foi aplicado análise de variância (ANOVA), com medidas repetidas no tempo, sendo considerado como co-variáveis os grupos experimentais (1 e 2) e nível de significância quando $P<0,05$. Também foi estudado os efeitos fixos dos meses e dos pesos, considerando os efeitos lineares e quadráticos, segundo o modelo estatístico empregado:

$$Y_{ijk} = \mu + b_1 Mês_j + b_2 Peso + b_3 Peso^2 + b_4 artérias\ mamárias_k + b_5 Mês*artérias\ mamárias + e_{ijk},$$

em que Y_{ijk} representa a variável estudada em função do i-ésimo indivíduo, no j-ésimo mês, para um determinado peso linear e quadrático (covariável contínua), no k-ésimo grupo da artéria mamária.

μ é a média geral, b_1, b_2, b_3, b_4 e b_5 são os coeficientes dos efeitos fixos do modelo estatístico e e_{ijk} é o erro experimental, que são considerados independentes e identicamente distribuídos com média 0 e variâncias iguais a σ^2.

Para estudar a possível relação linear e qual o grau dessa relação, entre as variáveis IR, IP e DI de cada animal e com as concentrações plasmáticas dos hormônios dosados, dentro de cada grupo, durante o período experimental, foram determinadas correlações não-paramétricas de Spearman, uma vez que as concentrações plasmáticas hormonais estudadas não apresentaram uma distribuição estatisticamente normal. O coeficiente de correlação foi classificado como nulo (r=0), baixo ($0 < r \leq 0,30$), moderado ($r= 0,30 < r \leq 0,70$) e forte ($0,70 < r \leq 1$), conforme Levine et al. (2005).

Para verificar uma possível relação não linear do PC com as características hemodinâmicas, de cada animal, dentro de cada grupo, foi gerado o seguinte modelo de regressão não linear múltipla: $\hat{Y}i= \beta_0 + \beta_1 peso + \beta_2 peso^2 i + \beta_3 mês + ei$, em que $\hat{Y}i$ representa uma variável hemodinâmica (IR, IP ou DI), β_0 o valor do intercepto, β_1 o coeficiente de regressão do peso, β_2 coeficiente de regressão do peso quadrático, β_3 coeficiente de regressão do mês e ei representa o erro experimental, sendo admitido coeficientes de determinações superiores a 70% (Levine et al., 2012). Uma vez constatada relação significativa entre o PC e os índices Doppler, foram desenvolvidas equações para predição do IR, IP e DI, para cada grupo experimental, a partir do valor médio do PC.

RESULTADOS

No grupo 1, houve diminuição progressiva dos valores de IR e IP e aumento do DI, em ambas as artérias mamárias, desde o primeiro ao último mês do estudo. Contudo, na artéria mamária caudal esquerda foi observado menor IR (P<0,0001) e maior DI (P<0,0001), nos cinco e três meses finais do período experimental, respectivamente (Figura 3).

Foi constatada correlação positiva e alta entre o IR e o IP (r= 0,98; P<0,0001) e negativa e alta do IR com o DI (r= -0,98; P<0,0001), bem como negativa e alta do IP com o DI (r= -0,98; P<0,0001) (Tabela 1). Além disso, o IR, IP e o DI correlacionaram-se também fortemente com a P_4, o IGF-I, a IN e o 17β-E_2 (P<0,05), sendo observado correlação positiva do IR e IP com a P_4 e a IN, e negativa, com o IGF-I e o 17β-E_2. Já o DI, apresentou correlação negativa com a P_4 e a IN e correlação positiva com o IGF-I e o 17β-E_2 (Tabela 1). Na Fig. 4 estão apresentados a média da concentração plasmática dos hormônios dosados de cada grupo em cada mês.

Além disso, o PC teve efeito apenas sobre o DI (R^2= 0,99; P< 0,0001), sendo esse de influência quadrática (Fig. 6). A equação de precisão desenvolvida para estimar o DI em função do PC foi a seguinte: $\hat{Y}i$= 1,17615 - 0,00496(Peso) + 0,00000599($Peso^2$) + 0,00925(Mês). Quanto a interpretação do coeficiente de determinação, constatou-se que 99,74% da variação do DI pode ser explicada pela variação do PC. A média do peso corporal de cada grupo em cada mês está apresentada na Fig. 5.

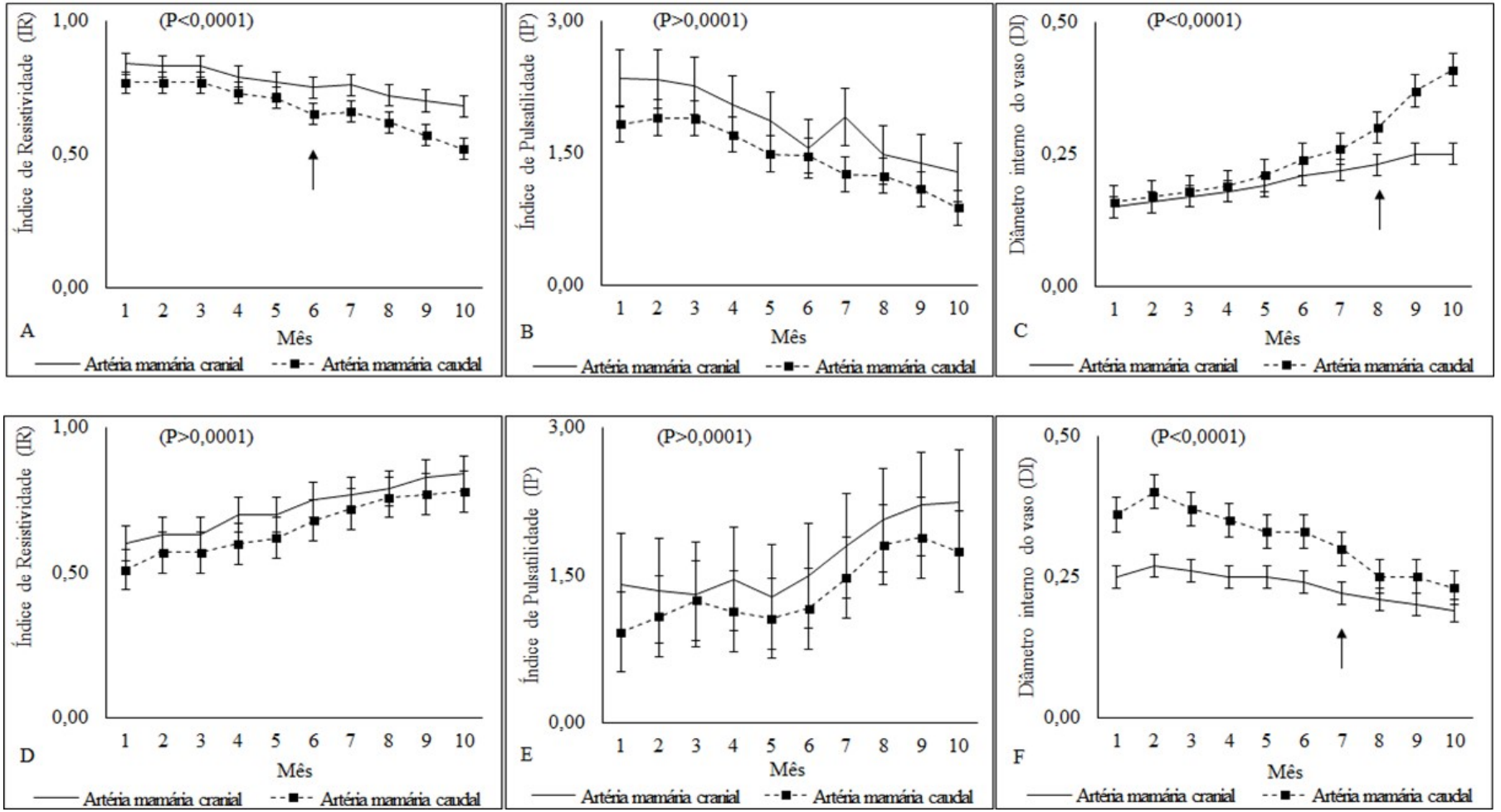


Figura 3. Média do índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B), diâmetro interno (C) das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas de búfalas mestiças Murrah gestantes (Grupo 1). Índice de resistividade (D), índice de pulsatilidade (E), diâmetro interno (F) das artérias mamárias cranial e caudal esquerdas de búfalas mestiças Murrah lactantes (Grupo 2), avaliadas mensalmente, ao longo do estudo. (↑) Indicam menor IR e maior DI, nos cinco e três meses finais da gestação e maior DI nos sete primeiros meses de lactação, apresentados nos quadros (A), (C) e (F), respectivamente

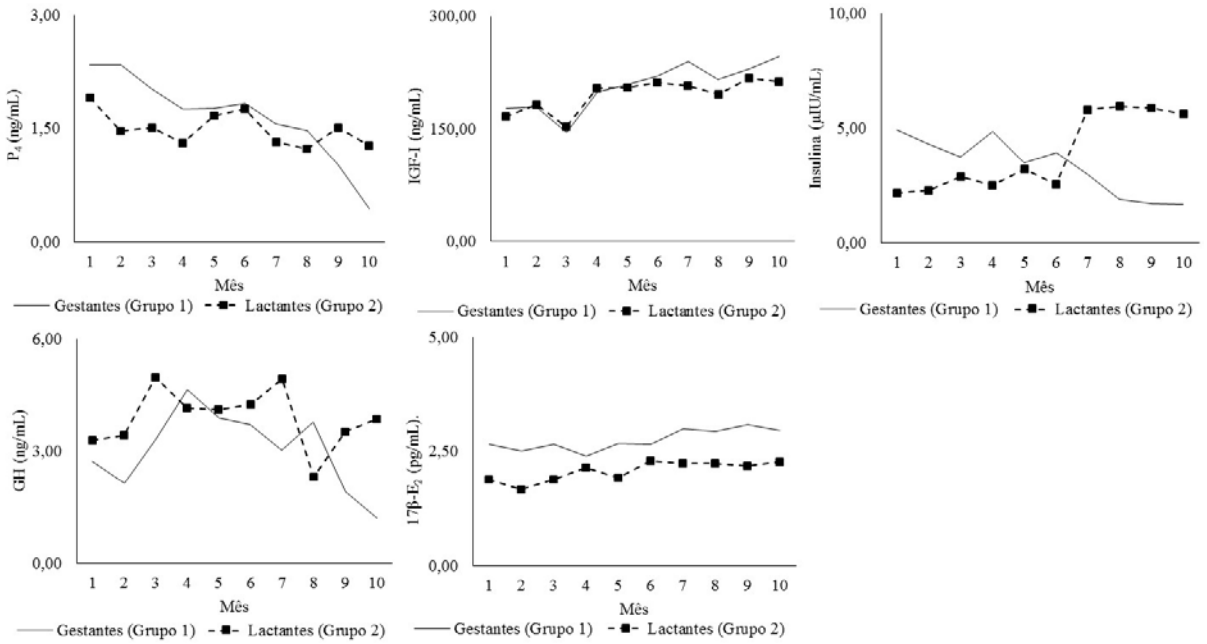


Figure 4. Média da concentração plasmática dos hormônios dosados de cada grupo em cada mês

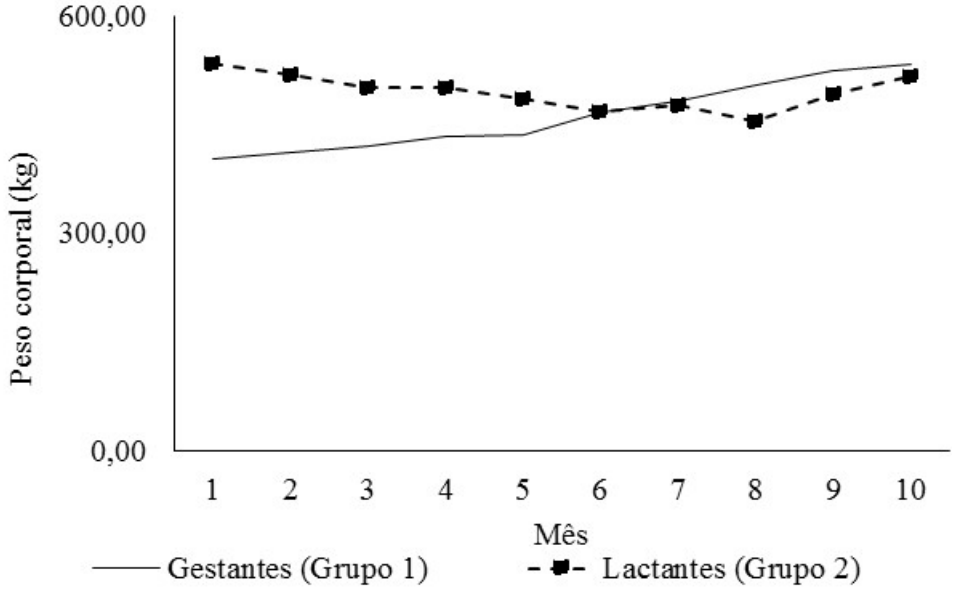


Figura 5. Média do peso corporal de cada grupo em cada mês

No grupo 2, houve aumento gradual dos valores de IR e IP e diminuição do DI, nas duas artérias mamárias, do primeiro ao último mês de avaliação. Entretanto, houve diferença significativa para os índices Doppler das artérias mamárias, sendo observado durante os sete primeiros meses do experimento, maior DI para a artéria mamária caudal esquerda (P<0,0001) (Figura 3).

A correlação entre os índices hemodinâmicos foi forte, sendo positiva, entre o IR e o IP (r= 0,91; P= 0,0002) e negativas, entre o IR e o DI (r= -0,95; P<0,0001), e entre o IP e o DI (r= -0,82; P= 0,0034) (Tabela 1). Houve também forte correlação dos três parâmetros hemodinâmicos com a IN, IGF-I e o 17β-E_2. Contudo, observou-se correlação positiva, do IR e IP com a IN, IGF-I e o 17β-E_2, e negativa, entre o DI e a IN, IGF-I e o 17β-E_2 (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficiente de correlação Spearman e nível de significância verificados entre as variáveis hemodinâmicas das artérias mamárias esquerdas e os níveis plasmáticos dos hormônios estudados em búfalas mestiças Murrah, avaliadas na gestação (Grupo 1) e lactação (Grupo 2)

Gestantes (Grupo 1)								
	IR	IP	DI	P_4	IGF-I	IN	GH	17β-E_2
IR	1,000	0,98* <0,0001	-0,98* <0,0001	0,89* 0,0005	-0,89* 0,0005	0,87* 0,0011	0,24 0,4984	-0,70* 0,0349
IP	0,98* <0,0001	1,000	-0,98* <0,0001	0,92* 0,0002	-0,87* 0,0012	0,85* 0,0016	0,21 0,5663	-0,71* 0,0211
DI	-0,98* <0,0001	-0,98* <0,0001	1,000	-0,94* <0,0001	0,90* 0,0003	-0,92* 0,0002	-0,25 0,4888	0,74* 0,0141
Lactantes (Grupo 2)								
	IR	IP	DI	P_4	IGF-I	IN	GH	17β-E_2
IR	1,000	0,91* 0,0002	-0,95* <0,0001	-0,53 0,1172	0,83* 0,0028	0,84* 0,0024	-0,06 0,8675	0,79* 0,0065
IP	0,91* 0,0002	1,000	-0,82* 0,0034	-0,58 0,0804	0,72* 0,0186	0,78* 0,0075	-0,01 0,9867	0,71* 0,0217
DI	-0,95* <0,0001	-0,82* 0,0034	1,000	0,46 0,1857	-0,77* 0,0085	-0,82* 0,0039	0,16 0,6618	-0,81* 0,0044

*Estatisticamente significativas quando P<0,05.

Os resultados também mostraram influência quadrática do PC, exclusivamente sobre o DI (R^2= 0,95; P=0,0002) (Figura 3). A equação de predição obtida em função do PC para presumir o DI foi: $\hat{Y}i$= -3,39063 + 0,01547(Peso) - 0,00001591($Peso^2$) - 0,01511(Mês). Além disso, a proporção da variância total do DI que pode ser explicada pelo PC, representa 95,72%.

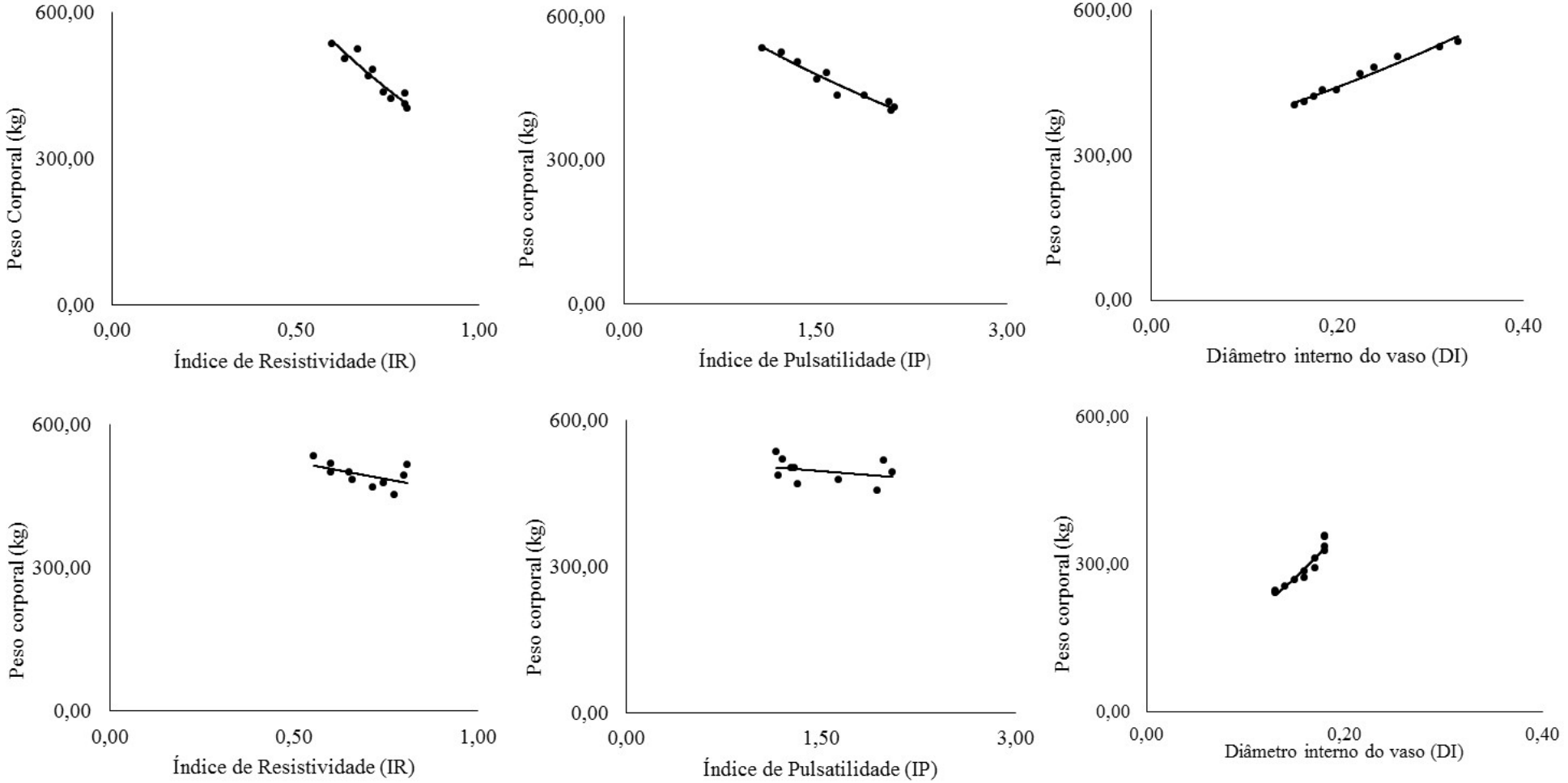


Figura 6. Relação do peso corporal sobre o índice de resistividade (A), índice de pulsatilidade (B) e o diâmetro interno (C) das artérias mamárias esquerdas de búfalas mestiças Murrah gestantes (Grupo 1). Influência linear do peso corporal sobre o índice de resistividade (D), índice de pulsatilidade (E) e diâmetro interno (F) das artérias mamárias de fêmeas bubalinas mestiças Murrah lactantes (Grupo 2), avaliadas durante o período experimental

DISCUSSÃO

No grupo 1, a variação significativa dos parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias esquerdas observada nos últimos meses de gestação indicam aumento do calibre arterial e da perfusão sanguínea, bem como atestam a capacidade desses vasos em adaptar-se a demanda do fluxo de sangue durante a gestação, devido ao acréscimo das exigências da glândula quanto a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, necessários para o desenvolvimento mamário e magnitude da subsequente lactação (Davis e Collier, 1985).

Do mesmo modo, o declínio do IR, mais expressivo no final da gestação, infere no aumento da capacidade de adaptação do sistema vascular a demanda metabólica da glândula, já que quanto menor o valor de IR maior é a intensidade do metabolismo apresentado pelo tecido analisado (Carvalho et al., 2008). Assim, os baixos valores de IR, ao final da gestação, estão em concordância com o desenvolvimento mamário esperado para essa fase, sendo que a maior parte desse desenvolvimento mamário ocorre durante a gestação (~80%), e é mais significativo ao final desse período, atingindo o seu desenvolvimento máximo e a atividade metabólica da glândula é mais intensa (Swanson e Poffenbarger, 1979).

A artéria mamária caudal foi a que apresentou os parâmetros hemodinâmicos (IR e DI) mais significativos nos últimos meses de gestação, indicando o estado hiperdinâmico de fluxo sanguíneo com o avançar da lactogênese, provavelmente devido a importância que esse vaso representa a glândula mamária na posterior lactação, pois a produção de leite é maior nos quartos mamários traseiros, quando comparados aos dianteiros (Tančin et al., 2006).

Verificou-se também que o IR e IP são positivamente relacionados entre si, demonstrando ser altamente confiáveis neste período. Entre o IR e DI houve significativa correlação negativa, assim a redução do IR ocorreu em consequência e a dilatação do lúmen arterial, devido ao aumento do volume do fluxo sanguíneo da glândula mamária, principalmente no final da gestação.

Houve notória correlação entre os parâmetros Doppler e a ação hormonal avaliada, demonstrando a coerência da relação entre a dinâmica do fluxo sanguíneo mamário e a concentração plasmática hormonal. Dessa forma, a redução do IR e IP e aumento do DI e consequentemente da ampliação do fluxo sanguíneo e do calibre arterial mamário, ocorreu juntamente com a diminuição das concentrações plasmáticas do P_4 e IN e aumento do IGF-I e do 17β-E_2.

Com a instalação da gestação e durante a maior parte do período gestacional, várias mudanças anatomofisiológicas que ocorrem na glândula mamária são atribuídas às alterações hormonais, principalmente da P_4 e do 17β-E_2, visto que a P_4 induz a hiperplasia lobular, bem como contínua involução do estroma e sob a influência do 17β-E_2, ocorre intensa proliferação ductal, acompanhada por aumento da vascularização e do fluxo sanguíneo (Svennersten-Sjaunja; Olsson, 2005).

Durante a gestação, há secreção contínua de P_4 pelo corpo lúteo e placenta, sendo fundamental na manutenção da gestação, contudo, com a proximidade do parto, seus níveis plasmáticos diminuem, enquanto, que as concentrações plasmáticas do 17β-E_2 aumentam (Senger, 2005), convergindo assim, com os resultados obtidos no presente estudo.

A redução das concentrações plasmáticas de IN ao longo da gestação ocorreu acompanhada da variação dos índices vasculares, devido a redução da responsividade e sensibilidade dos tecidos extra-hepáticos maternos a esse hormônio, o que permite maior egresso de nutrientes para o desenvolvimento da glândula mamária e crescimento fetal (Lucy, 2004).

A interação das concentrações plasmáticas do IGF-I com o desenvolvimento mamário durante a gestação, refletem a importância desse hormônio na preparação da glândula mamária para lactação. O IGF-I atua promovendo a proliferação celular e sua ação sinérgica com o 17β-E_2 potencializa ainda mais a diferenciação celular (Lucy, 2004).

No grupo 2, a variação dos parâmetros hemodinâmicos durante a lactação, caracteriza redução do calibre arterial e da perfusão sanguínea e do fluxo diastólico, à medida em que avança a involução do tecido mamário. Segundo Stelwagen et al. (1994) a redução do fluxo sanguíneo mamário ocorre devido o declínio da demanda por metabólitos, em consequência da diminuição da síntese de leite.

A diminuição da perfusão sanguínea que aconteceu na glândula mamária durante a lactação, foi gradual, sendo compatível com Prosser et al., (1996) que afirma que nos primeiros meses de lactação há um reparticionamento do fluxo de sanguineo, priorizando a entrada de sangue na glândula mamária devido a ativação da síntese e secreção de leite.

O aumento progressivo do IR também indica diminuição da atividade metabólica da glândula em consequência, supostamente, do declínio da produção de leite. De acordo com Prosser et al. (1996) durante o curso normal da lactação, o volume do fluxo sanguíneo e a atividade metabólica mamária estão intimamente associados, assim a redução de uma característica leva a diminuição da outra.

As alterações nos índices hemodinâmicos são influenciadas diretamente pela importância da contribuição sanguínea que o vaso exibe em relação a um determinado órgão (Paniagua et al., 2001). A artéria mamária caudal esquerda foi a que apresentou valores estatísticos de DI mais significativos, durante os primeiros meses de lactação (7 meses), possivelmente o volume do fluxo sanguíneo nesse vaso foi maior, sendo correspondente ao papel fisiológico que esse vaso representa a glândula, uma vez que os quartos traseiros são mais desenvolvidos e produzem mais leite que os quartos dianteiros (60 e 40%, respectivamente), necessitando perfusão de sangue mais intensa (Tančin et al., 2006).

A ausência de diferença significativa para os parâmetros hemodinâmicos das artérias mamárias cranial e caudal esquerda, observada nos últimos três meses de lactação, pode ter ocorrido devido a desmama dos filhotes realizada no sétimo mês de lactação. A cessação do

estímulo de sucção ou de amamentação intensifica a involução do tecido mamário, concordando com Linzell (1974) que afirma que a produção de leite e o suprimento sanguíneo da glândula mamária obedecem à relação linear.

O IR e IP foram alta e positivamente correlacionados e reproduziram a queda fisiológica do volume de fluxo sanguíneo com o avanço da lactação. Entre o IR e DI a correlação negativa, implica em redução do volume do fluxo sanguíneo com consequente diminuição da amplitude do vaso, características associadas a involução mamária e declínio da produção de leite durante a lactação.

Foi observado que no período de alta demanda de nutrientes pela glândula mamária, tal como no início da lactação, onde a produção de leite é intensa, maior foram o IR e IP e menor DI, e, por conseguinte, menores foram os níveis plasmáticos de IN. O que está de acordo com o período de desenvolvimento mamário avaliado, uma vez que baixas concentrações plasmáticas de IN permite maior redirecionamento da glicose sanguínea para a glândula, possibilitando maior produção de leite durante essa fase (Lucy, 2004).

As concentrações plasmáticas de IGF-I também evidenciaram como os indicadores do fluxo sanguíneo ajustaram-se a variação hormonal avaliada. O GH estimula a secreção do IGF-I, que em situações fisiológicas normais, altas concentrações plasmáticas de IGF-I e do próprio GH inibem a sua liberação. No entanto, em situações de alta demanda de nutrientes, como no pós-parto, a inibição da liberação de GH pelo IGF-I não ocorre, culminando na diminuição das concentrações plasmáticas de IGF-I durante esse período (Lucy, 2004).

Com o avanço da lactação o desenvolvimento da glândula mamária regride progressivamente, passando a um estado não-secretor. Paralelamente a esse processo houve aumento do IR e IP e diminuição do DI, sendo acompanhado também pelo aumento gradual dos níveis plasmáticos de 17β-E_2. Tal fato corrobora o estágio do desenvolvimento mamário estudado, uma vez que o aumento das concentrações plasmáticas de 17β-E_2 promove a

renovação celular da glândula e reestabelecimento das suas funções fisiológicas para que, posteriormente, uma nova lactação possa acontecer (Svennersten-Sjaunja; Olsson, 2005).

Além disso, nos dois grupos experimentais, a relação do PC com os parâmetros hemodinâmicos, foi expressiva, bem como predominantemente quadrática, sendo o DI, a variável melhor relacionada ao peso. Desse modo, as diversas modificações relacionadas ao *status* metabólico que ocorrem em consequência da dinâmica de eventos fisiológicos observados durante a gestação e lactação, é fator determinante para a alteração do lúmen arterial e da perfusão sanguínea mamária.

As alterações no PC durante a gestação e lactação apresentaram variações esperas, sendo observado aumento mais efetivo no final da gestação, devido ao maior desenvolvimento fetal e perda de peso mais expressiva nos primeiros meses na lactação, em virtude da produção de leite, que é mais intensa nesse período (Senger, 2005). Assim, ressalta-se a importância de pesagens regulares e adequação do manejo nutricional de fêmeas gestantes e lactantes, visto que a variação do desempenho corporal pode ser repercutida no aporte sanguíneo mamário.

CONCLUSÃO

A ultrassonografia Doppler dos índices hemodinâmicos das artérias mamárias corrobora a ação hormonal avaliada, assim como podem inferir como indicativos basais de estágio evolutivo da mamogênese em búfalas sadias durante a gestação e lactação.

REFERENCIAS

Borghese, A. 2013. Buffalo livestock and products in Europe. Sci. Bulletin Esc. 7:47-73.

Davis, S. R., e R. J. Collier. 1985. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. J Dairy Sci. 68:1041-1058.

Carvalho, C. F., M. C. Chammas, e G. G. Cerri. 2008. Physical principles of Doppler ultrasound: Literature Review. Cienc Rural. 38:872-879. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300047.

Dyce, K. M., W. O. Sack, e C. J. G. Wensing. 2010. Pelvis and reproductive organs of ruminants. In: Dyce, K. M., W. O. Sack, e C. J. G. Wensing. Treaty of Veterinary Anatomy. 4th ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ.

Feitosa, F. L. F. 2008. Semiotics of the mammary gland of ruminants. In: Feitosa, F. L. F. Veterinary semiotics: The art of diagnosis. 2th ed. Roca, São Paulo, SP.

Ginther, O. J. 2007. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography. 4th ed. Equiservices Publishing, Wisconsin, WY.

Levine, D. M, M. L. Berenson, e D. Stephan. 2012. Estatística: Teoria e Aplicações. 6th ed. LTC, Rio de Janeiro, RJ.

Linzell, J. L. 1974. Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursors of milk. In: Larson, B., e V. R. Smith. Lactation. 1th ed. Academic Press, New York, NY.

Lucy, M. C. 2004. Mechanisms linking the somatotropic axis with insulin: Lessons from the postpartum dairy cow. Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod. 64:19-23. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72124-5

Paniagua, O. A., M. B. Bryant, e J. A. Panza. 2001. Role of endothelial Nitric Oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: Diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. Circulation. 103:1752-1758.

Petridis, I. G., P. G. Gouletsoua, M. S. Barbagiannia, G. S. Amiridisa, C. Brozosa, I. Valasia, e G. C. Fthenakis. 2014. Ultrasonographic findings in the ovine udder during involution. J Dairy Res. 81:288-296. 10.1017/S0022029914000223.

Potapow, A., C. Sauter-Louis, S. Schmauder, J. Friker, C. P. Nautrup, D. Mehne, W. Petzl, e H. Zerbe. 2010. Investigation of mammary blood flow changes by transrectal colour Doppler sonography in an Escherichia coli mastitis model. J Dairy Res. 77:205-212. 77:205-212. 10.1017/S0022029910000105.

Prosser, C. G., S. R. Davis, V. C. Farr, e P. Lacasse. 1996. Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. J Dairy Sci. 79:1184-1197.

Senger, P. L. 2005. Pathways to Pregnancy and parturition. 2th. ed. Current Conceptions, Pullman, DC.

Sinha, Y. N., e H. A. Tucker. 1969. Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. J Dairy Sci. 52:507-512.

Statistical Analysis System 2009 Version 9.2, SAS Institute, Cary NC, USA.

Stelwagen, K., S. R. Davis, V. C. Farr, C. G. Prosser, e R. A. Sherlock. 1994. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. J Dairy Sci. 77:426-432.

454 Svennersten-Sjaunja, K., Olsson, K. Endocrinology of milk production. Domest. Anim.
455 Endocrinol. 2005;29:241–258.
456
457 Swanson, E. W., e J. I. Poffenberger. 1979. Mammary development of dairy heifers during their
458 first gestation. J Dairy Sci. 62:702-14.
459
460 Tančin, V., B. Ipema, P. Hogewerf, e J. Mačuhova. 2006. Sources of variation in milk flow
461 characteristics at udder and quarter levels. J Dairy Sci. 89:978-
462 988. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72163-4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variação do fluxo sanguíneo das artérias mamárias acompanhou a dinâmica de crescimento corporal e o estado fisiológico dos animais avaliados, favorecendo presumivelmente a manutenção do desenvolvimento mamário. Do mesmo modo, a correlação dos parâmetros hemodinâmicos com as concentrações plasmáticas dos hormônios dosados, implica que a variação do fluxo sanguíneo das artérias estudadas pode ser predominantemente influenciada pelo fator semelhante a insulina tipo I, a insulina, o hormônio do crescimento, estradiol e a progesterona, podendo ser utilizada como parâmetro de estudo da mamogênese de búfalas mestiças Murrah em diferentes status de desenvolvimento.

Portanto, pode-se afirmar que este estudo atingiu seus objetivos, pois permitiu determinar características hemodinâmicas da principal via de suprimento sanguíneo da glândula mamária de búfalas, assim como melhor entender a biologia do crescimento mamário de fêmeas em diferentes faixas etárias.

Desse modo, acredita-se que os valores hemodinâmicos obtidos por este estudo vão facilitar o planejamento de futuros estudos destinados a elucidar mais profundamente os mecanismos e fatores determinantes no desenvolvimento mamário de búfalas mestiças Murrah em diferentes estágios fisiológicos, permitindo a expansão dos métodos desenvolvidos no presente trabalho.

Além disso, poderão servir como base de consulta para comparações entre animais saudáveis e doentes, permitindo melhor assistência prestada a fêmeas leiteiras, bem como futuramente poderá ter valor preditivo para o potencial de produção de leite de cada animal e dessa forma, ser parâmetro para a seleção de animais jovens com características leiteiras ou para acompanhamento clínico complementar de casos onde se observa atraso ou falhas de lactação.