

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES
ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE**

Gabriela Facholi Bomfim

Zootecnista

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES
ENTRE ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE**

Gabriela Facholi Bomfim

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Zootecnia**

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Bomfim, Gabriela Facholi
B713p Produção de leite em cabras Sannen: relações entre estresse, IGF-1 e apoptose / Gabriela Facholi Bomfim. – – Jaboticabal, 2016
xix, 78 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: João Alberto Negrão

Banca examinadora: Luís Felipe Prada e Silva, Lenira El Faro Zadra, Kênia Cardoso Bicego , Marcia Helena Machado da Rocha Fernandes

Bibliografia

1. Cabra em Lactação. 2. Célula Epitelial Mamária. 3. Cortisol. 4. IGF-1 I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 637.12:636.39

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



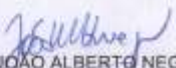
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE

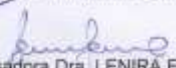
AUTORA: GABRIELA FACHOLI BOMFIM

ORIENTADOR: JOÃO ALBERTO NEGRÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOÃO ALBERTO NEGRÃO
Departamento de Ciências Básicas / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Prof. Dr. LUIS FELIPE PRADA E SILVA
FMVZ - USP - Pirassununga/SP


Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA
IZ - Sertãozinho/SP


Profa. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal / SP


Pesquisadora Dra. MARCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de novembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIELA FACHOLI BOMFIM – nascida em 05 de Novembro de 1986 em Barra do Garças – MT, Brasil, filha de Maria Inês Facholi Bonfim e Hermelino Pereira Bonfim. Ingressou na Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Campo Grande/MS, no curso de graduação em Zootecnia em Agosto de 2004, concluindo-o em Agosto de 2008. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da PROAP (Pró-reitoria de assuntos comunitários e políticas): de Agosto de 2005 a Março 2008, sob orientação da Profa. Dra. Maria da Graça Moraes. Iniciou sua atividade profissional como supervisora da garantia da qualidade no frigorífico JBS/SA, de Outubro de 2008 a Junho de 2009. Foi bolsista de treinamento técnico do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, de Julho de 2009 a Fevereiro de 2010, sob orientação da Profa. Dra. Izabelle A. M. A. Teixeira. Iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Zootecnia na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP em Março de 2010, sendo bolsista em Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior: CAPES, sob orientação do Prof. Dr. João Alberto Negrão, obtendo o título de Mestre em Novembro de 2012. Ingressou no curso de doutorado pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal em Março de 2013 com bolsa no Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, sob orientação do Prof. Dr. João Alberto Negrão, submetendo-se a defesa da Tese em Setembro de 2016.

**“Para tudo o que for fazer na vida tenha Paciência, Fé que terá sua
Recompensa”.**

Livro de Jó

DEDICO

Aos meus pais, **Maria Inês Facholi Bonfim e Hermelino Pereira Bonfim**, pela confiança, apoio e ensinamentos durante todo meu caminho.

Ao meu companheiro de vida, **Tarley Araujo Barros**, por sempre estar ao meu lado nas horas boas e ruins, por sempre estar me mostrando o caminho a seguir e que diariamente me doa seu amor, carinho e respeito.

As minhas irmãs, **Graziely Facholi Bonfim, Gisele Facholi Bonfim e Thais Araújo Barros** pelo apoio, pelos momentos divertidos e pela torcida sempre.

Aos meus sobrinhos, **Felipe, Luisa e Rafaela** que são minha razão de sorrir.

A minha filha de coração **Duda** que me ensina a amar ao próximo sem ver a quem.

A minha querida e amada avó **Italina Itália Ferrari Facholi** que mesmo longe sempre orou por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo pela oportunidade e pelas conquistas até hoje me foram proporcionadas.

Agradeço a UNESP e a USP pela oportunidade em cursar o doutorado e em ceder o espaço para realização do meu experimento.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão pela oportunidade, pelos anos de convivência agradáveis e pelos ensinamentos.

Aos meus mestres de faculdade Gumerindo Lorian Franco, Charles Kiefer e Maria da Graça Moraes, pelos ensinamentos, direção e por confiarem em meu potencial.

A Prof. Dra. Izabelle A. M. A. Teixeira pela amizade, pelos ensinamentos, pelas broncas e pela convivência sempre agradável e divertida.

Aos professores que participaram da minha qualificação, Prof. Dra. Kênia Cardoso Bicego e Izabelle A. M. A. Teixeira, Prof. Dr. Renato Luís Furlane Mauro Dal Secco de Oliveira, pelos ensinamentos, pelos esclarecimentos e pelo direcionamento.

A técnica de laboratório Giovana Krempel Fonseca Merighe pela parceria, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação e pelas risadas.

Aos funcionários e estagiários do laboratório de fisiologia animal: Sandra Aparecida de Oliveira, Antonio Fernandes dos Santos Júnior (China), Fernando Carlos Rohwedder Filho, Iago Carraschi e Flávia Mallaco Moreira, obrigada pelo apoio, pela dedicação e pelos momentos agradáveis. Aos pós-graduandos Henrique Hooper e Priscila Silva pelo agradável convívio.

A minha querida sogra Ivone Maria Araujo que me apoiou durante todo esse momento conturbado me dando teto e momentos agradáveis.

A querida dona Maria Araújo pelos crochês, pelas conversas animadas e pelo todo carinho.

Aos meus cunhados queridos e amados Alan, Douglas e Adilson que sempre foram muito parceiros e divertidos e que aguentam minhas irmãs.

As tias e tio de consideração mais animados que alguém pode ter: Zélia, Sônia, Marlene, Nonô e Valter muito obrigada por sempre me animarem, apoiarem e me entenderem mesmo que nos momentos mais conturbados.

A minha família Facholi e Bomfim que sempre me apoiaram e me proporcionaram momentos agradáveis.

Aos meus amigos de infância Laís e Diego por sempre estarem disponíveis quando eu preciso e sempre me apoiarem.

Aos meus parceiros de faculdade Ibrahim, Marcela e Ricardo por sempre estarem por perto e pelas parcerias.

A querida Carolina Tobias por sempre me dar força e apoiar quando precisei.

Aos amigos de Pirassununga, Xibungo, Tais, Cadu, Frodo, Novilha, Nataly, Caio e a todos os outros que serem estiveram presentes e sempre nos divertimos muito.

As minhas queridas e amadas amigas de Jaboticabal Pomba e Mel que sempre estão comigo em todos os momentos e me proporcionam momentos muito divertidos. Ao Faiado que sempre foi um grande amigo e companheiro.

SUMÁRIO	Páginas
PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE	xiii
RESUMO	xiii
MILK PRODUCTION IN GOATS SAANEN: STRESS RELATIONS, IGF-1 AND APOPTOSIS	xiv
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 –Considerações Gerais.....	01
1.INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO GERAL	01
2.1 Objetivos específicos.....	02
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	02
3.1 Cabra leiteira.....	02
3.2 Glândula mamária.....	04
3.3 Ciclo lactacional.....	07
3.4 Células epiteliais e produção de leite.....	08
3.5 Qualidade do leite	09
3.6 Microbiologia e contagem das células somáticas (CCS).....	11
3.7 Importância do IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e seu receptor na glândula mamária.....	13
3.8 Proteínas ligantes ao IGF (IGFBPs).....	14
3.9 Apoptose e proliferação celular.....	17
3.10 Estresse animal e cortisol.....	19
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2 –Relações entre cortisol e IGF-1 sobre a expressão de genes e as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais in vivo e in vitro aos 60 dias de lactação.....	32
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33

MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS.....	43
DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 3 - Relações entre cortisol e IGF-1 sobre a expressão de genes e as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> no final da lactação.	56
RESUMO.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS	59
RESULTADOS.....	67
DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

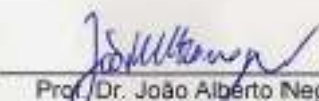
Pirassununga, 29 de agosto de 2009.

Assunto: Parecer da Comissão de Ética da FZEA.

A quem possa interessar,

Tendo por base os princípios estabelecidos no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, informo que o projeto de pesquisa "Respostas Zootécnicas e Fisiológicas em cabras e cabritas Saanen submetidas a diferentes situações de manejo consideradas estressantes" coordenado pelos Docentes do Laboratório de Fisiologia Animal recebeu parecer favorável de um pesquisador que atua na área de experimentação animal. Desta modo, a Comissão de Ética em Experimentação Animal da FZEA considerou-o **aprovado**.

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Alberto Negrão
Presidente da Comissão de Ética

Ao Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA
Departamento de Ciências Básicas
FZEA/USP

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Produção de leite nas últimas 3 décadas no mundo e produção de leite mundial por espécies (FAO, 2015).....	3
Figura 2. Composição da glândula mamária da cabra, adaptado de GENETICS, 2012.....	5
Figura 3. Estrutura interna da glândula mamária dando ênfase ao alvéolo e as células epiteliais responsáveis pela secreção do leite, adaptado de LEDIC e ALMEIDA, 2015.....	6
Figura 4. Estrutura interna do alvéolo e observação microscópica das células epiteliais, adaptado de LEDIC e ALMEIDA, 2015.....	6
Figura 5. Representação de 2 populações celulares. Os círculos brancos representam as populações iniciais de células, as novas células formadas por proliferação de células são representadas por círculos com sombreado ondulado, e as células que morrem durante este período são representadas por círculos pretos (CAPUCO et al., 2001).	9
Figura 6. Esquema que ilustra como o GH sintetiza o IGF-1 no estroma da glândula mamária (MARSHMAN e STREULI, 2002).	14
Figura 7. Esquema que demonstra a relação das IGFBPs com o IGF na matriz extracelular do alvéolo, bem como sua ação no receptor de IGF (JAMES BEATTIE et al., 2006)	16
Figura 8. Esquema ilustrando que as células do estroma originam IGF-1e células epiteliais originam IGFBP-5, elas interagem para regular a função da célula epitelial mamária durante a lactação (BEATTIE et al., 2006).....	17
Figura 9. Esquema da regulação da apoptose das células epiteliais mamárias, adaptado Zarzynska e Motyl, 2008.	18
Figura 10. Esquema ilustrando a ação do cortisol sobre a Bax na mitocôndria da célula epitelial e a ação do IGF-1 que mantém o balanço entre as proteínas Bax e Bcl-2	189
Figura 11. Esquema de como acontece e em que lugar ocorre a sinalização do cortisol quando um indivíduo é submetido ao estresse.	21

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Os maiores efetivos rebanhos caprino no mundo e sua participação no rebanho mundial de caprinos, 2014.....	4
Tabela 2. Composição do leite de diferentes espécies	11

PRODUÇÃO DE LEITE EM CABRAS SAANEN: RELAÇÕES ESTRESSE, IGF-1 E APOPTOSE

RESUMO - O aumento da produção leiteira no início de lactação depende do número e capacidade de síntese das células epiteliais mamárias. Porém, alguns estudos indicam que a partir do pico da lactação, o processo de apoptose das células mamárias aumentam gradualmente até o final da lactação, reduzindo progressivamente o número de células epiteliais bem como sua capacidade de síntese de leite. Alguns estudos sugerem que as alterações metabólicas causadas pelo estresse durante a lactação, podem via ação do cortisol, intensificar o processo de apoptose na glândula mamária. Inicialmente presumimos que o cortisol reduz a liberação de IGF-1 (que tem sido visto como hormônio anti-apoptótico, prolongando assim a lactação) e acelera o processo apoptose das células epiteliais. Neste contexto, o estudo da liberação do cortisol e sua relação com o IGF-1 são ferramentas importantes para avaliar o efeito do estresse na apoptose das células mamárias durante a lactação. Ao estudar via respostas zootécnicas e fisiológicas a associação entre o cortisol e IGF-1 será possível entender as relações entre a apoptose e proliferação celular durante a lactação. Utilizando como modelo experimental cabras Saanen em lactação, esse projeto propõe estudar se o aumento de cortisol reduz a liberação de IGF-1 acelerando a apoptose das células epiteliais bem como, se o IGF-1 realmente possui efeito anti-apoptótico nas células epiteliais. Os estudos foram realizados *in vivo* (Experimento I) e *in vitro* (Experimento II). Para tanto, as cabras experimentais foram desafiadas via administração exógena de ACTH (estresse fisiológico padrão).

Palavras-chave: Cabra em Lactação, célula epitelial mamária, cortisol, IGF-1

MILK PRODUCTION IN GOATS SAANEN: STRESS RELATIONS, IGF-1 AND APOPTOSIS

ABSTRACT - The increase in milk production in early lactation depends on the number and capacity of synthesis of mammary epithelial cells. However, some studies indicate that from the peak of lactation the process of apoptosis of mammalian cells gradually increases until the end of the same progressively reducing the number of epithelial cells as well as their milk synthesis capability. Some studies suggest that the metabolic alterations caused by stress during lactation can via cortisol action to intensify the process of apoptosis in mammary gland. At first, we assume that cortisol reduces the release of IGF-1 (which has been seen as anti-apoptotic hormone, thus prolonging lactation) and accelerates the apoptosis of epithelial cells. In this context, the study of the release of cortisol and its relationship with the IGF-1 are important tools to evaluate the effect of stress on apoptosis of mammalian cells during lactation. By studying via zootechnical and physiological responses to the association between cortisol and IGF-1, it will be possible to understand the relationship between apoptosis and cell proliferation during lactation. Using an experimental Saanen goats lactating model, this project proposes to study the increase of cortisol reduces the release of IGF-1 accelerating the apoptosis of epithelial cells as well as IGF-1 actually has anti-apoptotic effect on epithelial cells, studies will be conducted in vivo (Experiment I) and in vitro (Experiment II). Therefore, the experimental goats will be challenged via exogenous administration of ACTH (standard physiological stress).

Keywords: Dairy goat, mammary epithelial cell, cortisol and IGF-1

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Embora boas práticas de criação tenham por objetivo propiciar o bem-estar dos animais (MORMEDE et al., 2007), algumas atividades de manejo (por exemplo: secagem, desmame, vacinação, vermifugação, pesagem, mudança de instalações, entre outros), podem ser consideradas estressantes, sendo inclusive associadas à redução da produtividade e à qualidade do leite (MAYER e LEFCOURT, 1987; MOBERG, 1987; MACUHOVA et al., 2002).

De fato, o aumento do metabolismo animal causado pelo estresse, aumenta a formação de células reativas de oxigênio e acelera o processo de oxidação de diferentes células (STEFANON et al., 2002; SU et al., 2002). Aparentemente, estas alterações resultantes do estresse são mediadas pela ação do cortisol, hormônio que acelera o metabolismo celular e aumenta a taxa de apoptose (HOUGH et al., 2015).

Atualmente postula-se que o IGF-1 protege as células epiteliais evitando sua apoptose (STEFANON et al., 2002; MURNEY et al., 2015). Alguns trabalhos demonstraram que o IGF-1 acelera a diferenciação e proliferação das células epiteliais mamárias (MCGRATH et al., 1991; ACCORSI et al., 2002; TE PAS et al., 2004). Além disso, o aumento dos níveis de IGF-1 durante o período seco aumentou significativamente a produção na lactação seguinte (FLINT et al., 2005).

Em seu conjunto, as informações anteriores permitem atestar que o IGF-1 pode reduzir o efeito do estresse sobre a apoptose das células epiteliais mamárias. Neste contexto, o estudo da liberação do cortisol e sua relação com o IGF-1 são ferramentas importantes para avaliar o efeito do estresse sobre a apoptose das células epiteliais mamárias e do IGF-1 sobre a proliferação das mesmas durante a lactação.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do cortisol sobre: o IGF-1, a proliferação e taxa de apoptose das células epiteliais mamárias de cabras.

2.1 Objetivos específicos

Estudar se a indução dos animais a um estresse pontual (aumento na concentração de cortisol) *in vivo*, possui efeito na apoptose das células epiteliais mamárias.

Estudar se o IGF-1 tem um efeito de proliferação e sobrevivência nas células epiteliais mamárias quando há administração de ACTH, prolongando assim a lactação.

Estudar o efeito de diferentes concentrações de IGF-1 (0 e 100 ng/mL) e Cortisol (0; 10; 100 e 1000 µg/mL) na apoptose e proliferação de células epiteliais mamárias *in vitro*.

Estudar a relação entre a expressão relativa de RNAm do: Bax, Bcl-2, IGFBP-3; IGFBP-5; IGF-1; GHR e IGF-1R na apoptose e proliferação das células epiteliais mamárias *in vivo* (tecido) *in vitro* (células epiteliais).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cabra leiteira

Nas últimas 3 décadas houve um aumento exponencial na produção de leite mundial principalmente na Ásia que é considerado o continente que mais produz. Este aumento deve-se ao crescente consumo de leite seja *in natura* ou de produtos lácteos. Neste contexto vale ressaltar o crescimento na produção de leite caprino, que corresponde a 2% da produção mundial de leite (Figura 1), (FAO, 2015)

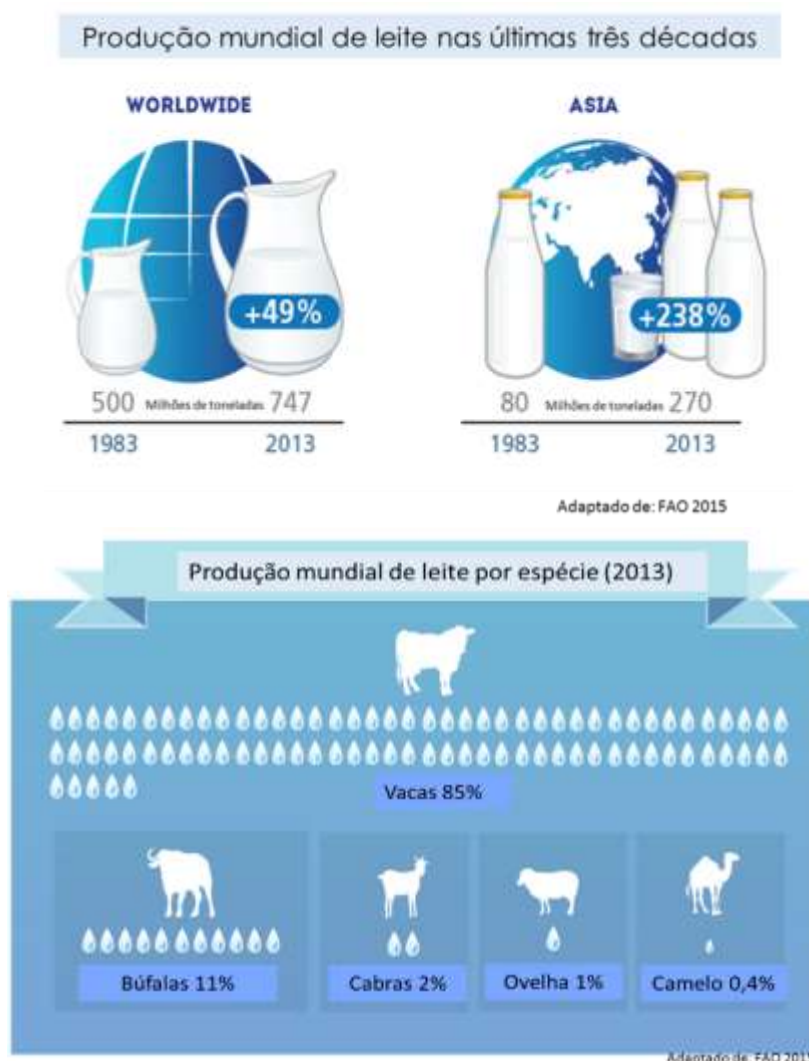


Figura 1. Produção de leite nas últimas 3 décadas no mundo e produção de leite mundial por espécies (FAO, 2015).

A criação de cabras leiteiras está em expansão, principalmente nos continentes africano e asiático (Tabela 1). Isso porque a cabra é um animal de fácil manejo, pequeno porte, possui excelente produtividade leiteira, além disso, sua curva de lactação tende a ser mais persistente em relação a espécie bovina (CHADANet al., 1992; KNIGHTS e GARCIA, 1997; CONIet al., 1999).

Tabela 1. Os maiores efetivos rebanhos caprino no mundo e sua participação no rebanho mundial de caprinos, 2014.

País	Cabeças	Participação (%)
China	187.869.000	19,00%
Índia	133.000.000	13,00%
Nigéria	71.000.000	7,00%
Paquistão	66.660.000	6,60%
Bangladesh	55.900.000	5,60%
Sudão	31.029.000	3,00%
Etiópia	29.112.963	2,90%
Kenya	25.430.058	2,50%
Irã	22.120.000	2,20%
Mongólia	22.008.896	2,20%
Brasil	9.850.000	1,3%
Mundo	1.006.785.725	100,00%

Fonte: FAOSTAT (2015)

O leite de cabra também tem um importante papel nutricional, tendo alta digestibilidade, alcalinidade característica de elevada capacidade tampão, poder anti-inflamatório e atividade imuno moduladora em medicina e nutrição humana (CAMPOSet al., 2003; CEBALLOSet al., 2009; LIet al., 2013; JIRILLO e MAGRONE, 2014).

2.2 Glândula mamária

A glândula mamária é constituída por uma rede de canais de ramificação e um epitélio túbulo-alveolar. Esse epitélio é constituído por diversas células como: fibroblastos, adipócitos, células mioepiteliais e células endoteliais, compostas principalmente por células epiteliais organizadas em alvéolos (BOUTINAUDet al., 2004; SHACKLETONet al., 2006), Figura 2.

Os alvéolos são formados por uma camada única de células epiteliais secretoras, eles se organizam em unidades conhecidas como lóbulos, cada um deles envolvidos por um septo distinto de tecido conjuntivo recobertos por células contráteis de natureza mioepiteliais que respondem ao reflexo de ejeção do leite (DEBNATH et al., 2002; RILEY et al., 2008), (Figuras 3 e 4).

As propriedades da glândula mamária são diferentes de uma espécie para outra. A da cabra possui as seguintes características: 1) a proliferação das células mamárias não cessa no parto, ela continua no início da lactação (KNIGHT e WILDE, 1987; WILDE e KNIGHT, 1989) e 2) a regressão da glândula mamária e a queda na produção de leite das cabras estão associadas com o decréscimo da capacidade de síntese das células epiteliais secretoras (KNIGHT e PEAKER, 1984; CAPUCO et al., 2001).

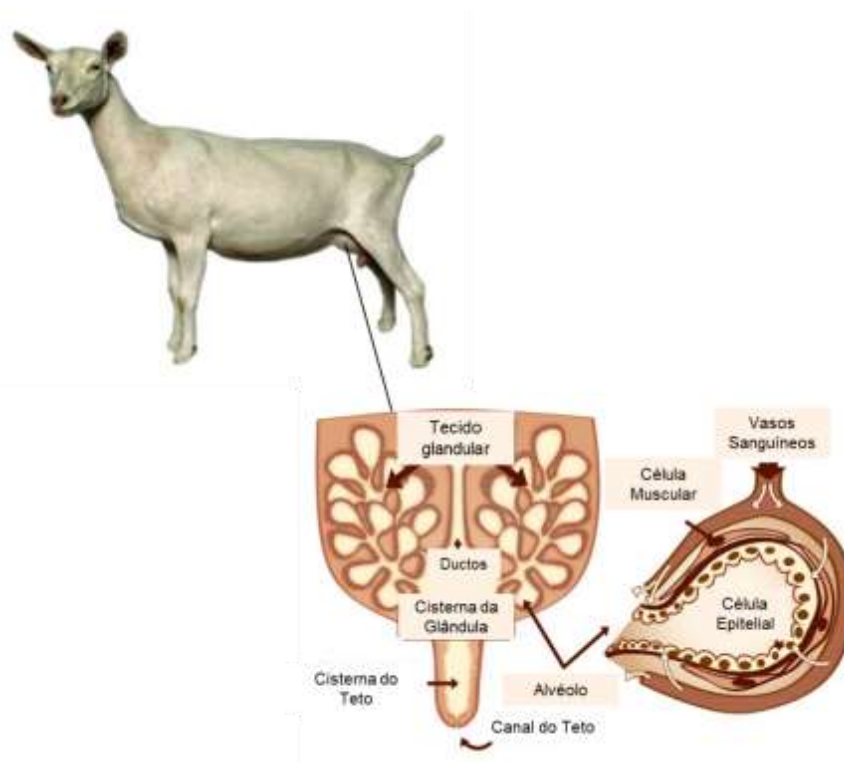


Figura 2. Composição da glândula mamária da cabra, adaptado de GENETICS, 2012.

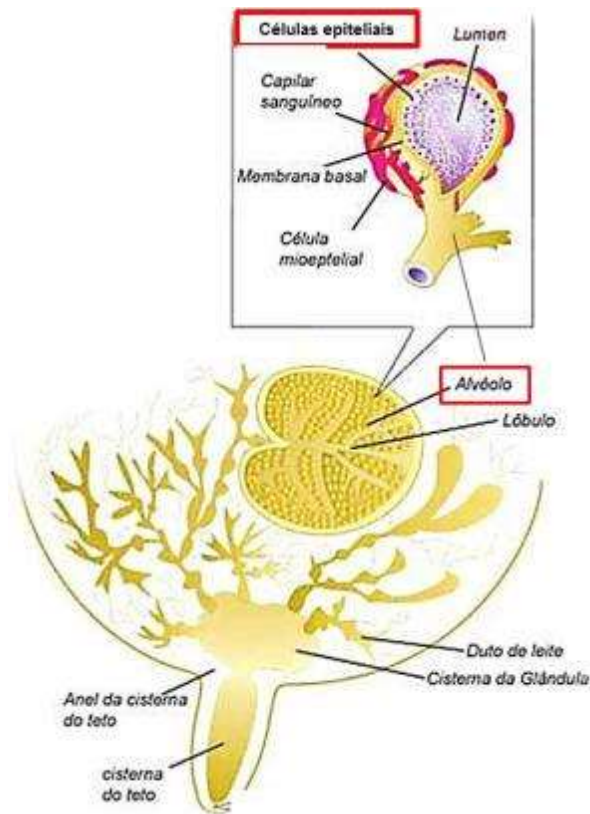


Figura 3. Estrutura interna da glândula mamária dando ênfase ao alvéolo e as células epiteliais responsáveis pela secreção do leite, adaptado de LEDIC e ALMEIDA, 2015

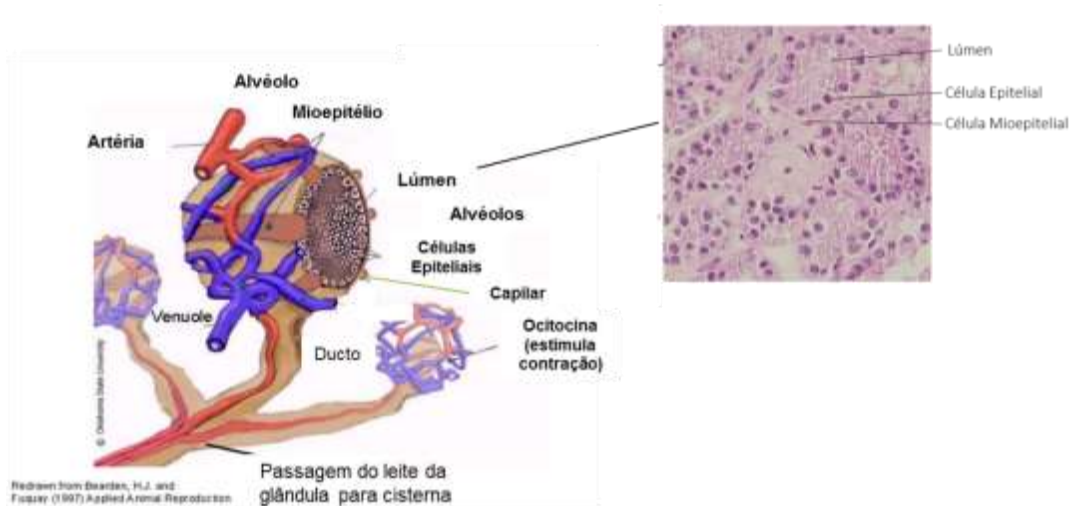


Figura 4. Estrutura interna do alvéolo e observação microscópica das células epiteliais, adaptado de LEDIC e ALMEIDA, 2015.

3.3 Ciclo lactacional

O ciclo lactacional é dividido em: mamogênese; lactogênese; galactopoiese e involução da glândula mamária(PANTSCHENKOet al., 2000).

A mamogênese é considerada a fase de desenvolvimento da glândula mamária. Ela tem um papel fundamental para que as outras etapas ocorram de forma satisfatória (BRISKENet al., 1999; HOVEYet al., 2002). O desenvolvimento inicial da glândula acontece no período fetal, porém na segunda gestação é quando ela atinge sua completa capacidade funcional, bem como a completa diferenciação das células epiteliais mamárias (PANTSCHENKOet al., 2000).

Até o final dessa fase, a glândula mamária terá se transformado em uma estrutura cheia de células alveolares que sintetizam e secretam ativamente o leite. O crescimento acelerado durante a gestação está relacionado ao estradiol, progesterona, hormônio do crescimento (GH), prolactina, hormônio da tireoide e lactogênio placentário (NEVILLEet al., 2002);

A lactogênese tem como principal função a síntese do leite, e, nessa fase estão presentes as etapas: **1)** alongamento dos ductos mamários, início da substituição do alvéolo pelo estroma (adipócitos); os hormônios envolvidos nessa etapa são o estradiol; hormônio do crescimento e glicocorticoide (PANTSCHENKOet al., 2000); **2)** desenvolvimento acentuado do lóbulo/alvéolo e desenvolvimento, diferenciação e início da secreção das células epiteliais (nessa etapa estão presentes os hormônios estradiol; progesterona; prolactina; GH e glicocorticoide)(ACCORSIet al., 2002); **3)** secreção láctea, sendo os hormônios ocitocina, prolactina, GH e IGF-1, os principais hormônios presentes nessa etapa (FLINTet al., 2005; LEIBOWITZet al., 2013).

A galactopoiese representa a capacidade de manter o ciclo lactacional(FLINT e KNIGHT, 1997). O processo requer reflexos neuroendócrinos e endócrinos (por meio principalmente do GH; prolactina; ACTH; cortisol; TSH; T3; T4, estradiol e IGF-1) para que ocorra a conservação do número de células alveolares, uma intensa atividade de síntese celular e eficácia do reflexo de ejeção do leite (PANTSCHENKOet al., 2000; NEVILLEet al., 2002).

A involução da glândula mamária é uma importante fase do ciclo lactacional, quando ocorre uma regressão e remodelação da glândula para subsequente lactação (ACCORSI et al., 2002). Ela é caracterizada por dois fatores: redução no número de células epiteliais e degradação proteolítica da matriz extracelular (ACCORSI et al., 2002; FLINT et al., 2005). Durante essa regressão, a remoção de células ocorre através da morte celular programada ou apoptose (JAGGI et al., 1996; YAMAUCHI et al., 2006). Alguns autores têm relatado que essa queda do número de células epiteliais pela apoptose deve-se ao decréscimo de prolactina, GH e IGF-1 (SVENNERSTEN-SJAUNJA e OLSSON, 2005).

3.4 Células epiteliais e produção de leite

Por muitos anos acreditava-se que existia uma relação positiva entre o tamanho do úbere e a produção de leite (LINZELL, 1966). No entanto, após algumas décadas foi comprovado que ao invés do tamanho do úbere, a capacidade de produção de leite da glândula mamária e o formato da curva de lactação são determinados pelo número de células epiteliais mamárias e por sua atividade de secreção (KNIGHT e PEAKER, 1984; CAPUCO et al., 2003; BOUTINAUD et al., 2004).

O crescimento mamário e a proliferação celular nas cabras se inicia quando a fêmea ainda é feto. Na puberdade há um aumento no desenvolvimento da glândula mamária, sendo mais intenso durante a gestação, sendo que este continua, menos intensamente, até no início da lactação podendo chegar até a 2ª semana de lactação. O crescimento da glândula só se dá por completo quando a fêmea está na segunda lactação (KNIGHT e PEAKER, 1984; CAPUCO et al., 2001).

As células epiteliais mamárias possuem atividade mitótica mais intensa durante a gestação. Durante a lactação há proliferação celular, porém de forma menos intensa. O maior volume de produção de leite no pico da lactação se deve ao aumento na atividade de síntese das células epiteliais e baixa taxa de apoptose. Porém, após o pico há um aumento na taxa de apoptose e redução da proliferação celular bem como da atividade de síntese das células epiteliais, figura 5 (KNIGHT e WILDE, 1987).

Após o pico da lactação, a manutenção da lactação e posterior declínio na produção de leite, podem ser reguladas por dois fatores: pela regulação na atividade

de síntese das células epiteliais mamárias e pela regulação na apoptose de células epiteliais secretoras (CAPUCOet al., 2003; BOUTINAUDet al., 2004; BEN CHEDLYet al., 2009; SIGLet al., 2012).

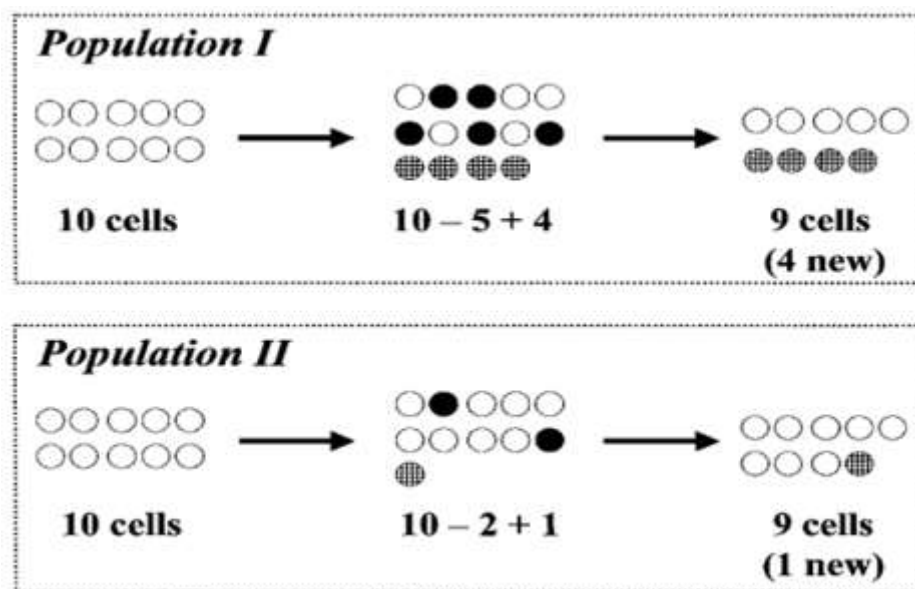


Figura 5. Representação de 2 populações celulares. Os círculos brancos representam as populações iniciais de células, as novas células formadas por proliferação de células são representadas por círculos com sombreado ondulado, e as células que morrem durante este período são representadas por círculos pretos (CAPUCOet al., 2001).

2.5 Qualidade do leite

A qualidade do leite é influenciada por diversos fatores como: espécie, raça, sazonalidade, número de partos, meio ambiente, manejo e número de ordenhas (JENKINS e MCGUIRE, 2006).

O leite de cabra possui algumas características sensoriais diferentes de outras espécies, como aparência mais branca. Isso se deve à ausência de β -caroteno, pois, essa espécie converte todo esse componente em vitamina A (PARKet al., 2007). Já o sabor acentuado do leite de cabra é devido ao alto teor de ácidos graxos de cadeia curta (quando comparado a outras espécies) em especial à presença do ácido cáprico (10,0%), caprílico (2,7%), capróico (2,4%) e láurico (5,0%) (GOUDJILet al., 2004).

Algumas características físico-químicas do leite de cabra podem ganhar destaque como o equilíbrio entre a concentração de gordura, de proteína e de

lactose. A gordura é a fonte de energia mais importante no leite de cabra e sua concentração está em torno de 4,0% em média (Tabela 2) e os glóbulos de gordura possuem tamanho menor (3,5 μM) quando comparado ao das vacas (4,5 μM), o que facilita a digestibilidade do leite (CHADANet al., 1992; BRUHN, 1996; KNIGHTS e GARCIA, 1997; CEBALLOSet al., 2009).

Em sua composição há uma maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA), e triglicerídeos de cadeia média (MCT) (BOYAZOGLU e MORAND-FEHR, 2001). Sendo mais elevado os ácidos: butírico (C4: 0), capríco (C6: 0), caprílico (C8: 0), cáprico (C10: 0), láurico (C12: 0), mirístico (C14: 0), palmítico (C16: 0), linoleico (C18: 2), mas menor em esteárico (C18: 0), e ácido oleico (C18: 1) (HAENLEIN, 2004).

Quanto à proteína, o leite caprino tem concentrações maiores de nitrogênio não proteico e menores de nitrogênio ligado à caseína do que o leite de ovelha e de vaca (GUO, 2003). Em sua composição cinco proteínas merecem destaque: β -lactoglobulina; α -lactoalbumina; κ -caseína; β -caseína e α -caseína (JORDANOet al., 1995). Elas possuem estruturas menores o que facilita a sua digestão e absorção, principalmente de β -caseína (ZENG, 1996; KUMARet al., 2012).

Um fator relevante no leite é a presença da α - caseína que se divide em duas porções: α_{s1} - caseína e α_{s2} - caseína. No leite de cabra a concentração de α_{s1} -caseína é quase nula, o que o torna menos alergênico e melhora sua digestibilidade(JENNESS, 1980; AMBROSOLiet al., 1988; MARTINet al., 2002; THUMet al., 2015).

A lactose é o principal carboidrato do leite da maioria dos mamíferos; sua concentração no leite de cabras é cerca de 5% menor que no leite de vaca, o que é bom para pessoas alérgicas a lactose(CHADANet al., 1992). A lactose é um dos principais agentes responsáveis pela pressão osmótica, do modo que, o volume de leite é determinado pela sua síntese (BOUTINAUDet al., 2008). O precursor para síntese de lactose é a glicose. Na glândula mamária de cabras leiteiras de alta produção é utilizada 60-80% de toda a glicose disponível no organismo para a síntese de leite (SWAISGOOD, 1996).

Tabela 2. Composição do leite de diferentes espécies

Composição	Mulher	Vaca	Búfala	Cabra	Ovelha
Energia (kcal)	70,0	62,0	99,0	66,0	100,0
Água (g)	87,5	87,8	83,2	87,7	82,1
Proteína total (g)	1,0	3,3	4,0	3,4	5,6
Gordura total (g)	4,4	3,3	7,5	3,9	6,4
Lactose (g)	6,9	4,7	4,4	4,4	5,1
Minerais	0,2	0,7	0,8	0,8	0,9

Adaptado de: (FAO, 2012; KUMAR et al., 2012)

2.6 Microbiologia e Contagem de células somáticas (CCS)

A glândula mamária da fêmea pode ser um ambiente adequado para proliferação e concentração de bactérias (ALLARD et al., 2006), sendo considerado um ótimo meio para desenvolver microrganismos patógenos e deteriorantes (VITTORI et al., 2008). O controle e a prevenção do crescimento dessas bactérias é realizado por uma correta higienização do ambiente onde as fêmeas são ordenhadas, bem como a higiene dos tetos. Estes cuidados são essenciais para saúde do animal, e qualidade do leite.

A falta de limpeza das instalações da ordenha e higiene da glândula mamária podem causar infecções intramamárias que são um enorme problema para saúde do animal e significam altas perdas econômicas para o produtor (STUHR e AULRICH, 2010). A prevalência de infecção intramamárias é proporcional à taxa de incidência e duração da infecção (MCDOUGALL et al., 2014). As bactérias que causam infecções intramamárias são classificadas por quantidade de aparecimento em maiores e menores incidências, sendo as de menor incidência: *Staphylococcus coagulase negativa* (principalmente: *Staph. caprae*, *Staph. epidermidis*, *Staph. chromogenes* and *Staph. Simulans*); *Corynebacterium* spp. as de maior incidência: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus dysgalactiae*; *Streptococcus uberis* (LERONDELLE e POUTREL, 1984; HARMON, 1994; SILANIKOV et al., 2014). Os principais patógenos que causam mastite são: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* (CONTRERAS et

al., 1999; LEITNER et al., 2004; PAAPE et al., 2001). Essas bactérias, quando em alta concentração, podem causar infecções subclínicas e clínicas no úbere da cabra (PAAPE et al., 2001).

Em pequenos ruminantes criados em ambiente devidamente salubre a incidência de mastite é menor que 5%, porém em ambientes pouco higienizados 15-40% dos animais do rebanho tem mastite (CONTRERAS et al., 2007; SILANIKOV et al., 2010). A mastite causa uma redução percentual de gordura, lactose e caseína, além de propiciar um aumento de cloretos e de soro proteínas. Quando isso ocorre, a composição do leite tende a se aproximar da composição do sangue (WAGNER et al., 2009).

Um dos métodos utilizados para diagnóstico de mastite é a cultura bacteriana, que consiste na determinação do número de microrganismos aeróbios em desenvolvimento, a uma temperatura de 30° a 37°C e é expresso como um número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL (STUHR E AULRICH, 2010). Este teste é relativamente barato, pode ser realizado com apenas uma amostra de leite e possui uma boa eficiência (96,2%) e alta especificidade (96,1%) (CONTRERAS et al., 2007).

A Federação Internacional do Leite estabeleceu que valores acima de 100.000 UFC mL⁻¹ no leite é considerado indicador de mastite no úbere, o que resulta em uma redução na produção e nas propriedades do leite (KÄSTLI, 1967; HAMANN et al., 2002).

Outra opção para o diagnóstico de mastite é a contagem de células somáticas (CCS) (PAAPE et al., 2001). Nos Estados Unidos as infecções intramamárias são estabelecidas pela Food and Drug Administration para CCS no leite de vacas é de 750.000 mL⁻¹ e para cabras e ovelhas é de 1.000.000 mL⁻¹ (PAAPE et al., 2001).

Essa diferença de CCS entre as espécies caprina e bovina pode ser influenciada por alguns fatores, tais como: 1) em vacas existe uma correlação positiva entre a mastite e a CCS o que não é demonstrado nas cabras (EBERHART et al., 1982; MCDOUGALL et al., 2014); 2) altos valores da CCS bem como sua persistência durante a lactação se deve a presença de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* (BERGONIER et al., 2003;

MCDUGALL et al., 2014); 3) o avanço no estágio da lactação e consequentemente a queda na produção de leite também propicia o aumento da CCS (SANCHEZ et al., 1999); 4) outros fatores como estro, vacinação, mudanças na dieta, mudança na rotina da ordenha, podem causar decréscimo na produção de leite e aumento da CCS (PAAPE et al., 2001) e por fim 5) infecções por lenti vírus *Artrite Encefalite Caprina Virus* (CAE) também podem levar a uma maior CCS em cabras (STUHR e AULRICH, 2010).

2.7 Importância do IGF-1 (fator de crescimento semelhante insulina tipo 1) e seu receptor na glândula mamária

O GH regula a produção de IGF no fígado, sendo esta glândula a principal fonte de IGF circulante. Porém, recentes estudos revelaram que o IGF também pode ser produzido, localmente principalmente no estroma mamário (MARSHMAN e STREULI, 2002; FLINT et al., 2005; MURNEY et al., 2015).

O IGF possui duas proteínas ligantes 1 e 2, sendo estas, compostas por polipeptídeos de cadeia simples e, 62% da sua sequência de aminoácidos são equivalentes e eles podem se ligar e ativar o receptor de insulina (BAUMRUCKER e ERONDU, 2000; MARSHMAN e STREULI, 2002). Os IGFs desempenham papel crucial na homeostasia do tecido mamário e regulam a proliferação e diferenciação celular durante a lactogênese (SAKAMOTO et al., 2007). IGFs também possuem efeitos imediatos; por exemplo, aumentam a absorção celular de aminoácidos e glicose, bem como, tem impacto de longo prazo aumentando a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (MARSHMAN e STREULI, 2002).

No estroma da glândula mamária o GH ativa o seu receptor (GHR) dentro do fibroblasto ou adipócitos, induzindo assim a expressão de IGF-1, o qual em seguida atua sobre o seu receptor (IGF-1R) que fica no epitélio mamário (RUAN et al., 1992; MARSHMAN e STREULI, 2002) figura 6. Expressão de RNAm de IGF-1 foi observada em tecidos mamários tanto na gestação quanto na lactação, principalmente no período de galactopoiese, ou seja, há evidências de que o IGF-1 auxilia na manutenção da lactação (SHARMA et al., 1994; BAUMRUCKER e ERONDU, 2000; CAPUCO et al., 2003).

Com base nessas informações, alguns estudos tanto *in vitro* como *in vivo* sugerem que o IGF-1 possui um papel na regulação da sobrevivência da célula mamária, (FLINTet al., 2005). Ele tem um efeito estimulador sobre a síntese de DNA e a proliferação das células mamárias (fibroblastos e células epiteliais), a expressão de genes de caseína e o transporte de glicose (MCGRATHet al., 1991). Além disso, o IGF-1 pode atuar como um fator de sobrevivência, inibir a apoptose induzida em células de cultura (MURNEYet al., 2015). Estudos foram realizados e constataram que o IGF-1 pode promover a sobrevivência de células epiteliais mamárias *in vitro* em culturas primárias ao final da lactação(FARRELLYet al., 1999; MARSHMAN e STREULI, 2002).

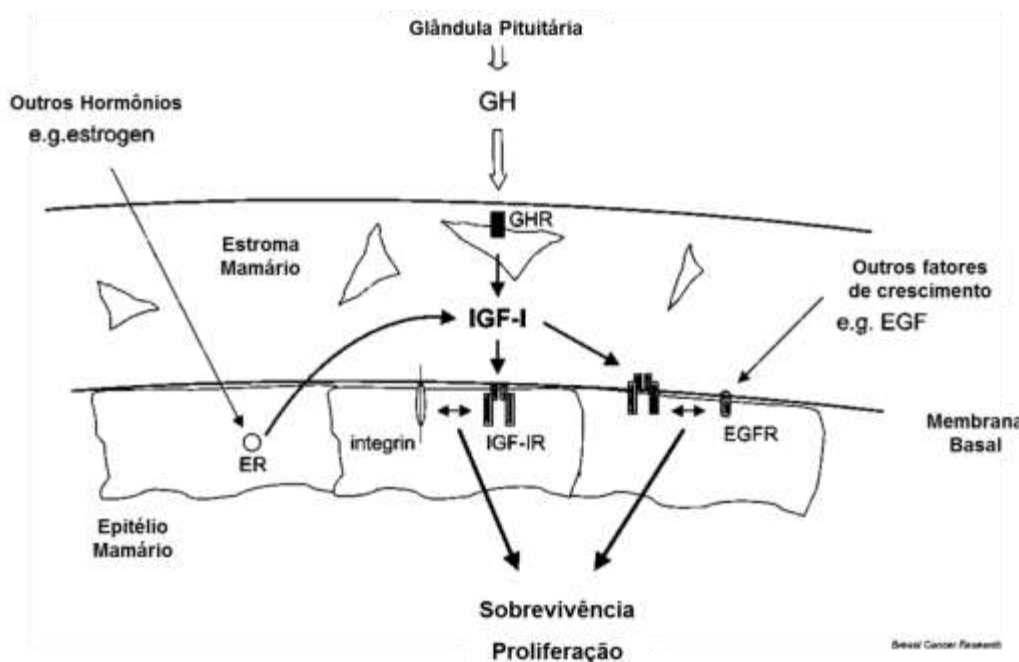


Figura 6. Esquema que ilustra como o GH sintetiza o IGF-1 no estroma da glândula mamária (MARSHMAN e STREULI, 2002).

2.8 Proteínas ligantes ao IGF-1 (IGFBPs)

Na matriz extracelular da glândula mamária há pouca concentração de IGF-1 livre, grande quantidade se une a proteínas de ligação de elevada afinidade que passam a atuar como proteínas de transporte e podem modular a atividade biológica de várias formas (JONES e CLEMMONS, 1995). IGFBPs interagem com a matriz extracelular, elas são sintetizadas e secretadas pelo epitélio da célula mamária (BAUMRUCKER e ERONDU, 2000). Desta maneira IGFs livres se associam a

IGFBP para posterior proteólise e assim o IGF provoca a fosforilação do receptor do substrato de insulina (IRS) que ativa a proteína Akt que por consequência irá desempenhar o papel sobre as células epiteliais mamárias (WERNER e LEROITH, 1996; BAUMRUCKER e ERONDU, 2000).

Existem 6 IGFBPs que apresentam alta afinidade com o IGF-1 (IGFBP 1 a 6). Na cultura primária de células epiteliais bovinas, foi constatada a secreção das IGFBPs 2; 3; 4 e 5, que por análise de peso molecular, são consideradas idênticas às presentes no leite bovino (GIBSON et al., 1999; SAKAMOTO et al., 2007; MURNEY et al., 2015).

Das proteínas citadas acima, entretanto, as mais predominantes nas células epiteliais primárias são duas, as IGFBPs 3 e 5. A IGFBP- 3 é considerada a de maior concentração no leite e nas células mamárias e aumenta durante a involução da glândula mamária (GIBSON et al., 1999; BAUMRUCKER e ERONDU, 2000). A ação efetiva dessa proteína em conjunto ao IGF-1 até o momento é muito obscura, porém, postula-se que ela age inibindo a ação do IGF-1 sobre o seu receptor (IGF-1R). Dessa forma, o IGF-1 não consegue transpor a membrana basal, o que consequentemente, inibe a proliferação celular (IMA et al., 2000; RICORT e BINOUX, 2001). Outros autores relataram que independente da IGFBP-3 estar ou não ligada ao IGF-1 ela tem capacidade de influenciar no crescimento celular, bem como induzir a apoptose (OH et al., 1993; VALENTINI et al., 1995; RAJA et al., 1997; RICORT e BINOUX, 2001).

A IGFBP-5 está envolvida nas fases iniciais de apoptose por inibição da sobrevivência de células de IGF-1, pois há indícios que a IGFBP-5 serve como um regulador negativo da ação do IGF-1, em virtude da sua capacidade de se ligar ao IGF-1 e reduzir a sua atividade de promover sobrevivência celular (ACCORSI et al., 2002; CAPUCO et al., 2003; FLINT et al., 2005). Em ratos foi observado um aumento na concentração da proteína IGFBP-5 logo após os filhotes serem desmamados, propiciando o início da apoptose (TONNER et al., 1997). Há evidências de que alguns hormônios podem alterar a concentração da IGFBP-5. A prolactina é capaz de inibir a síntese dessa proteína e o GH reprime a expressão de RNA dessa proteína

no corpo da matriz extra celular (TONNER et al., 1997; SAKAMOTO et al., 2007) Figura 7 e 8.

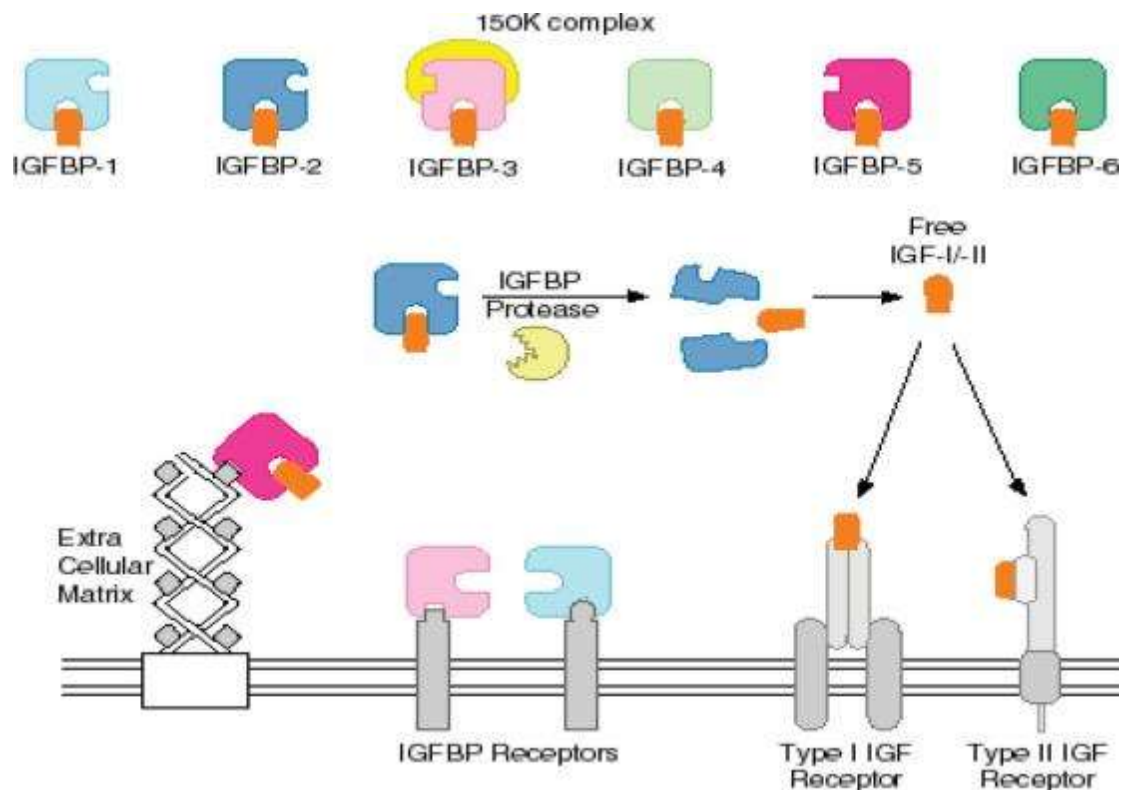


Figura 7. Esquema que demonstra a relação das IGFBPs com o IGF na matriz extracelular do alvéolo, bem como sua ação no receptor de IGF (JAMES BEATTIE et al., 2006)

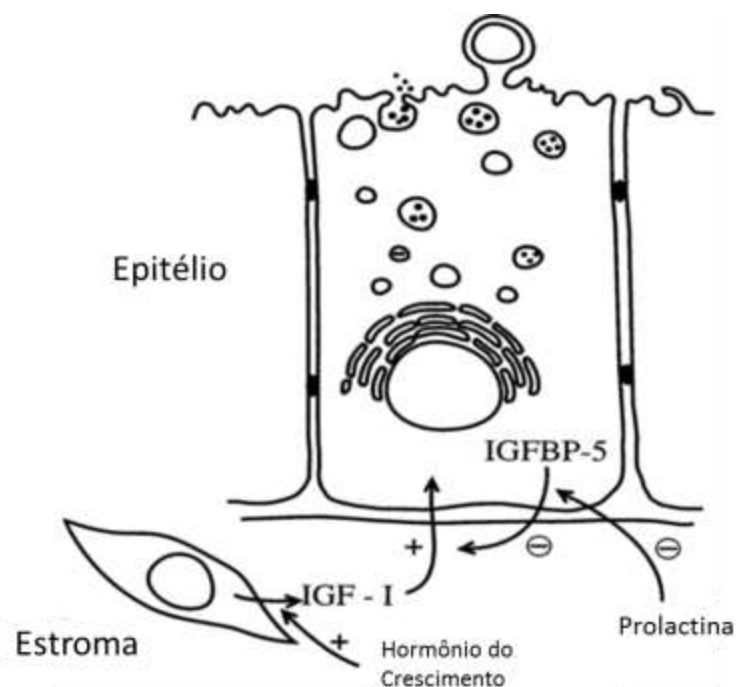


Figura 8. Esquema ilustrando que as células do estroma originam IGF-1e células epiteliais originam IGFBP-5, elas interagem para regular a função da célula epitelial mamária durante a lactação (BEATTIEet al., 2006).

2.9 Apoptose e proliferação celular

A capacidade de produção de leite pela glândula mamária é determinada pela população de células epiteliais mamárias e sua eficiência de síntese, bem como o balanço entre as taxas de proliferação e apoptose na produção de leite e persistência da lactação (RILEYet al., 2008).

O aumento na produção de leite durante a fase crescente da curva de lactação é resultado do aumento no número de células mamárias, seguido por um aumento na atividade secretora das mesmas (CAPUCOet al., 2003). Após o pico da lactação, a secreção das células epiteliais mamárias é reduzida, em paralelo com o decréscimo na produção destas células e aumento na apoptose(BOUTINAUDet al., 2004). O local de maior incidência da apoptose não é muito bem estabelecido no úbere, alguns autores citam que ela acontece no epitélio alveolar (CAPUCOet al., 1997; WILDEet al., 1997), outros têm observado presença de apoptose no estroma celular (Llet al., 1999; BALDIet al., 2002).

A diminuição no número de células epiteliais mamárias por apoptose ocorre em maior proporção no final da lactação e tem correlação com o declínio de prolactina (PRL), do hormônio do crescimento (GH), do hormônio de fator de

crescimento como a insulina 1 (IGF-1) e com o aumento de proteínas ligadas ao IGF-1 (IGFBPs) (CAPUCOet al., 2001; ACCORSIet al., 2002).

Há evidências que a apoptose pode ocorrer em três níveis: 1º)alguns fatores externos (como nutrição inadequada e manejo lactacional) e internos (como status reprodutivo e os principais hormônios responsáveis pela galactopoiese) podem interferir na sobrevivência celular pela ação de alguns inibidores de proliferação celular; 2º) os inibidores da proliferação celular agem especificamente através da interação com a superfície apical da célula epitelial mamária a fim de reduzir a eficiência secretória pela inibição do IGF-1 através das proteínas ligadas a ele (IGFBPs) e 3º) na regulação das proteínas intracelulares, por exemplo, a proteína da família Bcl-2 que tem um efeito anti-apoptótico (Figura 9), enquanto a Bax possui um efeito apoptótico(WILDEet al., 1999; BAUMRUCKER e ERONDU, 2000; TONNERet al., 2002; ZARZYNSKA e MOTYL, 2008).

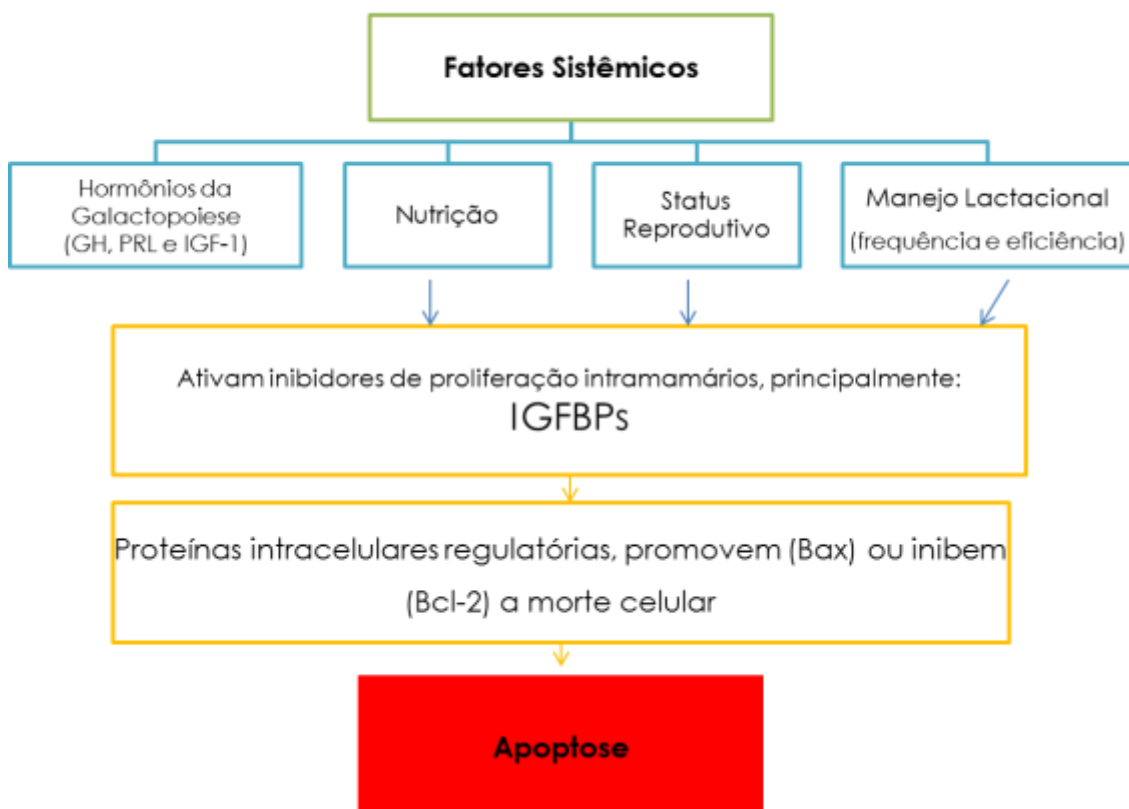


Figura 9. Esquema da regulação da apoptose das células epiteliais mamárias, adaptado Zarzynska e Motyl, 2008.

As proteínas Bax e Bcl-2 se mantêm em equilíbrio (Figura 10) em torno da mitocôndria da célula epitelial sendo que, nós acreditamos que o cortisol possa ativar a proteína Bax e essa por sua vez rompe o canal do citocromo C, liberando o mesmo no interior da célula, ativando as caspases e desencadeando uma cascata de clivagens de proteínas até ocorrer a fragmentação do núcleo celular (VALENTIJN e GILMORE, 2004, JIN e EL-DEIRY, 2005, KATZ e STREULI, 2007).

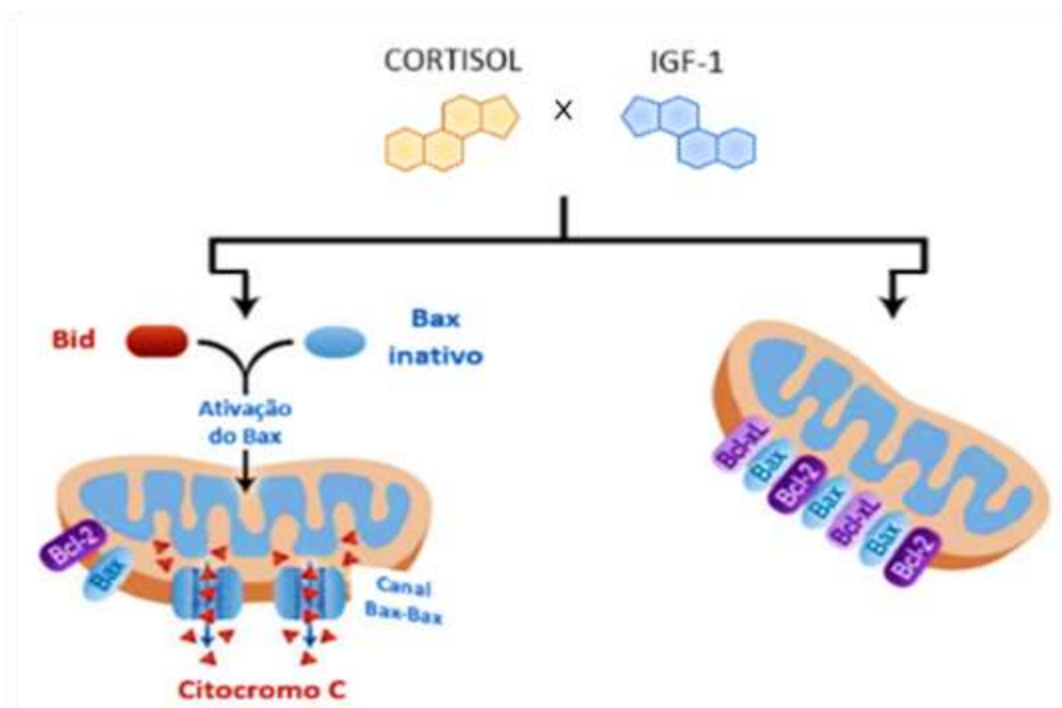


Figura 10. Esquema ilustrando a ação do cortisol sobre a Bax na mitocôndria da célula epitelial e a ação do IGF-1 que mantêm o balanço entre as proteínas Bax e Bcl-2.

2.10 Estresse animal e Cortisol

Condições de manejo ideais bem como bem-estar dos animais são fatores que vêm ganhando destaque com o passar dos anos. A União Européia, por exemplo, vem buscando unificar regulações nacionais e internacionais para obter um controle melhor e promover pesquisa vinculada ao bem-estar dos animais (BONAFOSet al., 2010). O estresse pode ser definido como um evento ou condição externa que produz uma “tensão” no sistema biológico do animal (COLLIERet al., 2006).

O animal sob estresse libera e secreta CRH (hormônio corticotrofina) no hipotálamo, que modula a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) no

lóbulo anterior da hipófise, estimulando a secreção de cortisol pela adrenal, que é um hormônio glicocorticoide da família dos esteroides e age em resposta ao estresse (HOUGH et al., 2015), Figura 11.

O estresse é um importante fator estimulante de cortisol na corrente sanguínea (SEVI, 2009). O cortisol, além de essencial à vida pelo papel no metabolismo glicídico e proteico, tem sido associado a diferentes fatores que causam estresse, incluindo condições climáticas (OLSSON e DAHLBORN, 1989; GUDEV et al., 2005); quantidade e tipo de alimento fornecido (MARSICO et al., 2009); tipo de instalação (OLMO et al., 2009); transporte (CANAES et al., 2009); ordenha (NEGRAO et al., 2004); desmame (NEGRAO, 2008); fatores relacionados aos animais, tais como fisiologia da glândula mamária (FOX et al., 1981; HOCKETT et al., 2000); lactação (TREVISI et al., 2009); raça (NEGRAO, 2008); número de parição (VAN REENEN et al., 2002) e produção de leite (SEVI et al., 2001).

O estresse pode interferir na involução da glândula mamária, pela ação do cortisol nas células, fazendo com que ocorra um alto grau de apoptose e fim da secreção de leite (MALINOWSKI, 2005). Essa ação ocorre em conjunto à proteína Bax, pois o estresse pode induzir sinais intracelulares, pró-apoptóticos na mitocôndria, que origina um “estresse oxidativo”, ou seja, o estresse promove uma falha dos mecanismos de defesa antioxidantes de aliviar os efeitos nocivos das espécies reativas ao oxigênio (GU et al., 2015; TAO et al., 2015).

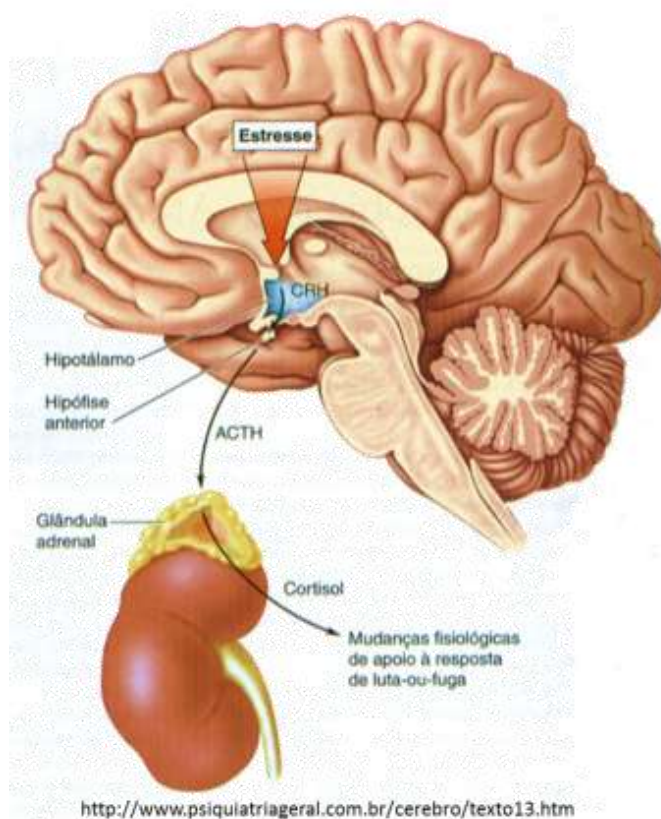


Figura 101. Esquema de como acontece e em que lugar ocorre a sinalização do cortisol quando um indivíduo é submetido ao estresse.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v. 85, n. 3, p. 507-513, Mar 2002.

ALLARD, M. et al. Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1679-1690, Jun 2006.

AMBROSOLI, R.; DISTASIO, L.; MAZZOCCO, P. CONTENT OF ALPHA-S1-CASEIN AND COAGULATION PROPERTIES IN GOAT MILK. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 24-28, Jan 1988.

BALDI, A. et al. Bovine somatotropin administration to dairy goats in late lactation: Effects on mammary gland function, composition and morphology. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1093-1102, May 2002.

BAUMRUCKER, C. R.; ERONDU, N. E. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 1, p. 53-64, Jan 2000.

BEATTIE, J., GORDON J. A., LOCHRIE, J. D., FLINT, D. J. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis. **Biochemical Journal**, v. 395, p. 1-19, 2006.

BEN CHEDLY, H. et al. Cell junction disruption after 36 h milk accumulation was associated with changes in mammary secretory tissue activity and dynamics in lactating dairy goats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 105-111, Oct 2009.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 689-716, Sep-Oct 2003.

BONAFOS, L.; SIMONIN, D.; GAVINELLI, A. Animal Welfare: European Legislation and Future Perspectives. **Journal of Veterinary Medical Education**, v. 37, n. 1, p. 26-29, Spr 2010.

BOUTINAUD, M. et al. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 988-998, Mar 2008.

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENT, J.; JAMMES, H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, n. 5, p. 499-508, Sep-Oct 2004.

BOYAZOGLU, J.; MORAND-FEHR, P. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality - A critical review. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 1, p. 1-11, Apr 2001.

BRISKEN, C. et al. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. **Developmental Biology**, v. 210, n. 1, p. 96-106, Jun 1999.

BRUHN, J. C. **Dairy goat milk composition**. Daves: The dairy research & information center 1996.

CAMPOS, M. S. et al. Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. **British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 1, p. 61-67, Jul 2003.

CANAES, T. S. et al. Physiologic and productive responses of Alpine goats submitted to transportation to a new dairy location. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 935-940, Aug 2009.

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**, v. 80, n. 3, p. 477-487, Mar 1997.

CAPUCO, A. V., D. L. WOOD, R. BALDWIN, K. MCLEOD, AND M. J. PAAPE. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p.2177-2187. 2001.

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

CEBALLOS, L. S. et al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 322-329, Jun 2009.

CHADAN, R. C.; ATTAIE, R.; SHAHANI, K. M. **Nutritional Aspects of goat Milk and its Products.V International Conference on Goats**. New Delhi, India: Pre-Conference ProceedingsInvited Papers,. 2: 399-420 p. 1992.

COLLIER, R. J. et al. Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stresstolerance at the cellular level in cattle. **Journal Animal Science**, v. 84, p. E1 - E13, 2006.

CONI, E.; BOCCA, B.; CAROLI, S. Minor and trace element content of two typical Italian sheep dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 4, p. 589-598, Nov 1999.

CONTRERAS, A.; PAAPE, M. J.; MILLER, R. H. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, v. 31, n. 3, p. 203-208, Feb 1999.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 145-153, Mar 2007.

DEBNATH, J. et al. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini (vol 111, pg 29, 2002). **Cell**, v. 111, n. 5, p. 757-757, Nov 2002.

EBERHART, R. J.; HUTCHINSON, L. J.; SPENCER, S. B. RELATIONSHIPS OF BULK TANK SOMATIC-CELL COUNTS TO PREVALENCE OF INTRA-MAMMARY INFECTION AND TO INDEXES OF HERD PRODUCTION. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 12, p. 1125-1128, 1982.

FAO. **Milk availability: Trends in production and demand and medium-term outlook.** Agricultural Development Economics Division - Food and Agriculture Organization of the United Nations. SKOET, S. G. A. J. Rome, Italy. 12-01 2012.

FARRELLY, N. et al. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 6, p. 1337-1347, Mar 1999.

FLINT, D. J.; KNIGHT, C. H. Interactions of Prolactin and Growth Hormone (GH) in the Regulation of Mammary Gland Function and Epithelial Cell Survival. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 2, n. 1, p. 41-48, Jan 1997.

FLINT, D. J. et al. Insulin-like growth factor binding proteins initiate cell death and extracellular matrix remodeling in the mammary gland. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 274-282, Aug 2005.

FOX, L. K. et al. Concentrations of glucocorticoids, bovine serum-albumin, and somatic-cells in mastitic milk. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 11, p. 2258-2261, 1981.

GENETICS, A. **Cómo se desarrolla la mastitis en la ubre?** Peru 2012.

GIBSON, C. A.; STALEY, M. D.; BAUMRUCKER, C. R. Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 6, p. 1547-1557, Jun 1999.

GOUDJIL, H. et al. Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. **Lait**, v. 84, n. 5, p. 473-482, Sep-Oct 2004.

GU, X. et al. In Vivo Studies of Molybdenum-Induced Apoptosis in Kidney Cells of Caprine. **Biological Trace Element Research**, v. 165, n. 1, p. 51-58, May 2015.

GUDEV, D. et al. **Endocrine changes in two behavioural types of cows exposed to heat.** **Biotechnology in animal husbandry**, v. 21, p. 45-51, 2005.

GUO, M. **Goat's milk.** Encyclopedia of food sciences and nutrition. PRESS, A. London: 2944-2949 p. 2003.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 2, p. 155-163, Feb 2004.

HAMANN, J.; IDF. Relationships between somatic cell count and milk composition. **Bulletin of the International Dairy Federation No 372/2002: a Fresh Perspective for Managing Milk-Borne Diseases**, p. 56-59, 2002.

HARMON, R. J. SYMPOSIUM - Mastitis and genetic evaluation for somatic-cell count - physiology of mastitis and factors affecting somatic-cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, Jul 1994.

HOCKETT, M. E. et al. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 3-4, p. 241-251, Mar 15 2000.

HOUGH, D. et al. Relative contribution of P450c17 towards the acute cortisol response: Lessons from sheep and goats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 408, n. C, p. 107-113, Jun 15 2015.

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**, v. 7, n. 1, p. 17-38, Jan 2002.

IMAI, Y. et al. Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and-5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18188-18194, Jun 16 2000.

JAGGI, R. et al. Regulation of a physiological apoptosis: Mouse mammary involution. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1074-1084, Jun 1996.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1302-1310, Apr 2006.

JENNESS, R. COMPOSITION AND CHARACTERISTICS OF GOAT MILK - REVIEW 1968-1979. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 10, p. 1605-1630, 1980.

JIRILLO, F.; MAGRONE, T. Anti-inflammatory and Anti-Allergic Properties of Donkey's and Goat's Milk. **Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 27-37, Mar 2014.

JIN, Z. Y. AND W. S. EL-DEIRY. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Therap.* 4(2):139-163.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth-factors and their binding-proteins - biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-34, Feb 1995.

JORDANO, R. et al. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and

molds in foods. **Acta Microbiologica et immunologica hungarica**, v. 42, p. 255-259, 1995.

KATZ, E. AND C. H. STREULI. 2007. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.* 39(4):715-726.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 69, n. 2, p. 331-338, 1984.

KNIGHT, C. H.; WILDE, C. J. Mammary growth during lactation - implications for increasing milk-yield. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 9, p. 1991-2000, Sep 1987.

KNIGHTS, M.; GARCIA, G. W. The status and characteristics of the goat (*Capra hircus*) and its potential role as a significant milk producer in the tropics: A Review. **Small Ruminant Research**, v. 26, n. 3, p. 203-215, Dec 1997.

KUMAR, S. et al. Nutritional features of goat milk - A review. **Indian Journal Dairy Science**, v. 65 (4), p. 266-273, 2012.

KÄSTLI, P. Definition of mastitis **Bull IDF**, v. 34, n. 3, p. 1-5, 1967.

LEDIC, I. L.; ALMEIDA, T. **Sistema Mamário**. Lecheria. <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/articulos/sistema-mamario-t7271/p0.htm> 2015.

LEIBOWITZ, B. J. et al. IGF binding protein-3 mediates stress-induced apoptosis in non-transformed mammary epithelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 4, p. 734-742, Apr 2013.

LEITNER, G. et al. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 46-52, Jan 2004.

LERONDELLE, C.; POUTREL, B. CHARACTERISTICS OF NON-CLINICAL MAMMARY INFECTIONS OF GOATS. **Annales De Recherches Veterinaires**, v. 15, n. 1, p. 105-112, 1984.

LI, P. et al. Modulation of mammary development and programmed cell death by the frequency of milk removal in lactating goats. **Journal of Physiology-London**, v. 519, n. 3, p. 885-900, Sep 1999.

LI, X.; LUO, J.; ZHU, J. J. Effect of different diet energy and protein level on lactation performance of xiongzong Saanen dairy goats. **Acta Ecologiae Animalis Domastici**, v. 3, p. 30-35, 2013.

LINZELL, J. L. MEASUREMENT OF UDDER VOLUME IN LIVE GOATS AS AN INDEX OF MAMMARY GROWTH AND FUNCTION. **Journal of Dairy Science**, v. 49, n. 3, p. 307, 1966.

MACUHOVA, J. et al. Inhibition of oxytocin release during repeated milking in unfamiliar surroundings: the importance of opioids and adrenal cortex sensitivity. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 1, p. 63-73, Feb 2002.

MALINOWSKI, E. Mammary gland involution in cows. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 61, n. 9, p. 968-971, Sep 2005.

MARSHMAN, E.; STREULI, C. H. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 231-239, 2002.

MARSICO, G. et al. Evaluation of animal welfare and milk production of goat fed on diet containing hydroponically germinating seeds. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, p. 625-627, 2009.

MARTIN, P. et al. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 5, p. 433-459, Sep-Oct 2002.

MAYER, H. K.; LEFCOURT, A. M. Failure of cortisol injected prior to milking to inhibit milk ejection in dairy-cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 54, n. 2, p. 173-177, May 1987.

MCDUGALL, S.; MALCOLM, D.; PROSSER, C. G. Prevalence and incidence of intramammary infections in lactating dairy goats. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 62, n. 3, p. 136-145, May 2014.

MCDUGALL, S.; VOERMANS, M. Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 378-383, Feb 2002.

MCGRATH, M. F. et al. The direct invitro effect of insulin-like growth-factors (igfs) on normal bovine mammary cell-proliferation and production of igf binding-proteins. **Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 671-678, Aug 1991.

MOBERG, G. P. A MODEL FOR ASSESSING THE IMPACT OF BEHAVIORAL STRESS ON DOMESTIC-ANIMALS. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 5, p. 1228-1235, Nov 1987.

MORMEDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 3, p. 317-339, Oct 2007.

MURNEY, R. et al. The effects of milking frequency on insulin-like growth factor I signaling within the mammary gland of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5422-5428, Aug 2015.

NEGRAO, J. A. Hormone release and behavior during suckling and milking in Gir, Gir x Holstein, and Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 13, p. 21-26, Mar 2008.

NEGRAO, J. A. et al. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1713-1718, Jun 2004.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 49-66, Jan 2002.

OH, Y. M. et al. Insulin-like growth-factor (igf)-independent action of igf-binding protein-3 in hs578t human breast-cancer cells - cell-surface binding and growth-inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14964-14971, Jul 1993.

OLMOS, G. et al. Peripartum health and welfare of Holstein-Friesian cows in a confinement-TMR system compared to a pasture-based system. **Animal Welfare**, v. 18, n. 4, p. 467-476, Nov 2009.

OLSSON, K.; DAHLBORN, K. FLUID BALANCE DURING HEAT-STRESS IN LACTATING GOATS. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences**, v. 74, n. 5, p. 645-659, Sep 1989.

PAAPE, M. J. et al. **Milk somatic cells and lactation in small ruminants**: Journal of Dairy Science. 84: 237-244 p. 2001.

PANTSCHENKO, A. G. et al. Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line (CMEC). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 36, n. 1, p. 26-37, Jan 2000.

PARK, Y. W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 88-113, Mar 2007.

RAJAH, R.; VALENTINIS, B.; COHEN, P. Insulin like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 12181-12188, May 1997.

RICORT, J. M.; BINOUX, M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits type 1 IGF receptor activation independently of its IGF binding affinity. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 108-113, Jan 2001.

RILEY, L. G. et al. The role of native bovine alpha-lactalbumin in bovine mammary epithelial cell apoptosis and casein expression. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 3, p. 319-325, Aug 2008.

RUAN, W. F.; NEWMAN, C. B.; KLEINBERG, D. L. Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-like growth factor-i induce mammary-gland differentiation and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 10872-10876, Nov 1992.

SAKAMOTO, K. et al. Growth hormone suppresses the expression of IGFBP-5, and promotes the IGF-I-induced phosphorylation of Akt in bovine mammary epithelial cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 32, n. 4, p. 260-272, May 2007.

SANCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C. Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. **Small Ruminant Research**, v. 31, n. 3, p. 197-201, Feb 1999.

SEVI, A. Animal-based measures for welfare assessment. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, p. 904-911, 2009.

SEVI, A. et al. Effects of solar radiation and feeding time on behavior, immune response and production of lactating ewes under high ambient temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 629-640, Mar 2001.

SHACKLETON, M. et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. **Nature**, v. 439, n. 7072, p. 84-88, Jan 2006.

SHARMA, B. K.; VANDEHAAR, M. J.; AMES, N. K. Expression of insulin-like growth-factor-i in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 8, p. 2232-2241, Aug 1994.

SIGL, T.; MEYER, H. H. D.; WIEDEMANN, S. Gene expression of six major milk proteins in primary bovine mammary epithelial cells isolated from milk during the first twenty weeks of lactation. **Czech Journal of Animal Science**, v. 57, n. 10, p. 469-480, 2012.

SILANIKOVE, N. et al. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p. 110-124, Apr 2010.

SILANIKOVE, N.; MERIN, U.; LEITNER, G. On effects of subclinical mastitis and stage of lactation on milk quality in goats. **Small Ruminant Research**, v. 122, n. 1-3, p. 76-82, Nov 2014.

STEFANON, B. et al. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 1, p. 37-52, Feb 2002.

STUHR, T.; AULRICH, K. Intramammary infections in dairy goats: recent knowledge and indicators for detection of subclinical mastitis. **Landbauforschung**, v. 60, n. 4, p. 267-279, Dec 2010.

SU, W. J. et al. Apoptosis and oxidative stress of infiltrated neutrophils obtained from mammary glands of goats during various stages of lactation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 241-246, Feb 2002.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; OLSSON, K. Endocrinology of milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 241-258, Aug 2005.

SWAISGOOD, H. E. Characteristics of milk. In: R., F. O. e M., D. (Ed.). **Food Chemistry**: New York, p.841-876, 1996.

TAO, S. Y. et al. Activation of cellular apoptosis in the caecal epithelium is associated with increased oxidative reactions in lactating goats after feeding a high-concentrate diet. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 3, p. 278-287, Mar 2015.

TE PAS, M. F. W.; VISSCHER, A. H.; DE GREEF, K. H. Molecular genetic and physiologic background of the growth hormone-IGF-I axis in relation to breeding for growth rate and leanness in pigs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, n. 3, p. 287-301, Oct 2004.

THUM, C. et al. Composition and enrichment of caprine milk oligosaccharides from New Zealand Saanen goat cheese whey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 30-37, Sep 2015.

TONNER, E. et al. Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) induces premature cell death in the mammary glands of transgenic mice. **Development**, v. 129, n. 19, p. 4547-4557, Oct 2002.

TREVISI, E. et al. Adrenal responsiveness to a low-dose ACTH challenge in early and late lactating dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 8, p. 661-663, 2009.

VALENTINIS, B. et al. The human insulin-like growth-factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 3, p. 361-367, Mar 1995.

VAN REENEN, C. G. et al. Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2551-2561, Oct 2002.

VITTORI, J. et al. Microbiological quality of UHT goat milk: research of bacteria *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Clostridium* genus. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 3, p. 761-765, May-Jun 2008.

WAGNER, S. A.; JONES, D. E.; APLEY, M. D. Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 6, p. 796-799, Jun 2009.

WERNER, H.; LEROITH, D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. **Advances in Cancer Research**, Vol 68, v. 68, p. 183-223, 1996.

WILDE, C. J.; KNIGHT, C. H. METABOLIC ADAPTATIONS IN MAMMARY-GLAND DURING THE DECLINING PHASE OF LACTATION. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1679-1692, Jun 1989.

WILDE, C. J. et al. Mammary apoptosis. **Livestock Production Science**, v. 50, n. 1-2, p. 29-37, Oct 1997.

WILDE, C. J.; KNIGHT, C. H.; FLINT, D. J. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 2, p. 129-136, Apr 1999.

YAMAUCHI, K. et al. Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 84, n. 3, p. 291-296, Jun 2006.

ZARZYNSKA, J.; MOTYL, T. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, p. 275-288, Dec 2008.

ZENG, S. S. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 21, n. 3, p. 221-225, Jul 1996.

CAPÍTULO 2 -Relações entre cortisol e IGF-1 sobre a expressão de genes ligados a lactação e as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais *in vivo* e *in vitro* aos 60 dias de lactação.

RESUMO

O IGF-1 atua no processo de proliferação e sobrevivência das células epiteliais mamárias e pode ser regulado pela presença de seu receptor (IGF-1R) e por suas proteínas ligantes (IGFBP-3 e 5). Em contrapartida, o estresse via cortisol altera a homeostase do tecido mamário durante a lactação, podendo alterar a síntese das proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica), provocando assim, a apoptose das células epiteliais mamárias antecipadamente. Deste modo, esse trabalho tem como objetivo estudar a relação entre o cortisol e o IGF-1 sobre a expressão dos genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 e as taxas de proliferação e apoptose das células mamárias *in vivo* (Experimento 1) e *in vitro* (Experimento 2). Neste contexto, trinta cabras Saanen foram submetidas à administração de ACTH (para induzir o aumento da concentração de cortisol) ou Placebo aos 60 dias de lactação. Durante o experimento foram avaliadas a produção, composição (gordura, proteína, lactose, minerais e acidez) e qualidade do leite (Contagem Total de Bactérias, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* e Contagem de Células Somáticas (CCS)). Também foram colhidas amostras de sangue das cabras experimentais para determinação da concentração plasmática de cortisol e IGF-1. Simultaneamente, quatro cabras do grupo Placebo e quatro cabras do grupo ACTH foram submetidas à biópsia da glândula mamária. Parte do tecido mamário foi destinada à histologia para determinação das taxas de proliferação e apoptose; parte do tecido foi destinada à expressão genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2; e finalmente outra parte foi destinada para cultivo celular e posterior administração de tratamentos *in vitro* (adição de cortisol 0, 10, 100 e 1000 µg/mL e IGF-1 0 ou 100 ng/mL ao meio de cultivo). Não houve efeito dos tratamentos *in vivo* sobre a

produção e qualidade do leite, sobre as taxas de apoptose e proliferação, nem sobre a expressão dos genes estudados. Contudo, no estudo *in vitro*, houve efeito significativo na expressão dos genes IGF-1 e IGF-1R em função da adição de cortisol ao meio de cultura. Além disso, houve influência do experimento *in vivo* sobre o efeito dos níveis crescentes de cortisol *in vitro*, neste caso a expressão dos genes GHR e Bax foram significativamente maiores em função dos níveis crescentes de cortisol *in vitro*, para as cabras submetidas ao tratamento Placebo *in vivo*. Os resultados do experimento *in vivo* demonstraram que o aumento pontual do cortisol não influenciou significativamente os diferentes parâmetros estudados. Os resultados do experimento *in vitro* demonstraram que o cortisol teve efeitos opostos, promovendo a expressão dos genes que estimulam a proliferação celular (GHR, IGF-1 e IGF-1R) e apoptose (Bax). Estes efeitos opostos do cortisol explicam por que as taxas de proliferação celular e apoptose não foram significativamente alteradas no presente estudo.

PALAVRAS CHAVE: cabras, células epiteliais mamárias, cortisol, IGF-1 e início da lactação.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da glândula mamária é influenciado pela ação do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), pelo seu receptor IGF-1R e pelas proteínas ligantes ao IGF (IGFBP). Este sistema estimula o crescimento e diferenciação das células epiteliais principalmente no terço final da gestação e início da lactação (Knight & Peaker, 1984, Capuco et al., 2001, Sakamoto et al., 2007, Murney et al., 2015). Porém, a função do IGF-1 durante a galactopoiese e sua influência na proliferação e sobrevivência das células epiteliais mamárias durante a lactação ainda não estão totalmente elucidados.

O IGF-1 pode ser sintetizado tanto no fígado, em resposta ao hormônio do crescimento (GH), como na glândula mamária, sendo sintetizado nos adipócitos e fibroblastos e liberado na matriz extracelular do alvéolo, estimulando assim a sobrevivência das células da glândula mamária (Kleinberg et al., 2000, Accorsi et al., 2002, Katz & Streuli, 2007a). De modo geral, o IGF-1 atua no tecido mamário regulando o metabolismo e o processo de proliferação e sobrevivência das células epiteliais mamárias. Alguns estudos sugerem que o IGF-1, durante a lactogênese, aumenta a capacidade de síntese das células epiteliais em relação a outras fases da lactação (Capuco et al., 2001).

A ação do IGF-1 durante a lactogênese e galactopoiese também pode ser modulada pela sua alta afinidade e interação com as proteínas ligantes 3 e 5 (IGFBP-3 e 5) (Jones & Clemmons, 1995, Baxter, 2000). No terço final da gestação essas proteínas regulam a quantidade de IGF-1 disponível na glândula mamária estimulando a divisão celular (Baumrucker & Blum, 1993, Collier et al., 1995, Collier et al., 2012), aumentando o fluxo sanguíneo (Prosser et al., 1990, Flint & Gardner, 1994, Murney et al., 2015) e o transporte de glicose na glândula mamária (Prosser, 1996, Collier et al., 2006). Contudo, no período de involução mamária há um acúmulo de IGFBP-5, que inibe o IGF-1 de se ligar ao seu receptor, interrompendo a sinalização de sobrevivência nas células e desencadeando a apoptose (Marshman et al., 2003, Green & Streuli, 2004).

Outro fator que pode interferir na galactopoiese, antecipando a morte celular programada (apoptose) é o estresse (Fukasawa et al., 2008, Diaz et al., 2013), sendo o cortisol o indicador mais utilizado para monitorar o eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal durante o estresse. Aparentemente, o cortisol induz a apoptose das células epiteliais, pois, promove uma falha dos mecanismos de defesa antioxidantes levando ao acúmulo das espécies reativas ao oxigênio (Gu et al., 2015, Tao et al., 2015). Dentre as proteínas responsáveis pela regulação

da apoptose estão as proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica), que impedem a liberação de CitocromoC pela mitocôndria da célula e a não ativação das caspases (Vaux & Korsmeyer, 1999, Sharpe et al., 2004) e a proteína Bax (pró-apoptótico), que ao ser ativada forma canais na mitocôndria celular e desencadeia o processo de apoptose das células epiteliais mamárias antecipadamente (Zarzynska & Motyl, 2008).

Porém, não estão claras as funções e relações entre cortisol, IGF-1, Bax, Bcl-2 e as células epiteliais mamárias durante a lactação. Neste contexto, esse trabalho tem como objetivo estudar a relação entre o cortisol e o IGF-1 sobre a proliferação, a apoptose e a expressão dos genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 nas células epiteliais mamária de cabras Saanen *in vivo* e *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cabras e Delineamento Experimental

Trinta cabras da raça Saanen, com peso vivo de $57,5 \pm 1,5$ kg, escore corporal de $3,5 \pm 1,0$, não gestantes, lactantes e saudáveis foram utilizadas para conduzir o experimento na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP – São Paulo/Brasil. As cabras foram alocadas em baias coletivas cobertas, com cocho de alimentação, sal mineral e água. A alimentação foi composta de 60% de concentrado e 40% de volumoso, fornecendo 100% do requerimento do animal (NRC, 2007).

A ordenha foi realizada uma vez ao dia pelo mesmo ordenhador durante todo o período experimental, às 07:00h da manhã, em ordenhadeira mecânica (Westfalia Surge), regulada para manter um nível de vácuo de 48 KPa e taxa de pulsação de 120 ciclos/minuto. A rotina da ordenha foi realizada conforme protocolo padrão do Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP, ou seja: entrada dos animais, pré-dipping, secagem dos tetos, teste da

caneca de fundo preto (verificação da mastite sub clínica), colocação do copo das teteiras, retirada das teteiras, pós-dipping, registro da produção e saída dos animais.

Experimento 1 – *In vivo*

As 30 cabras experimentais foram divididas de maneira homogênea (peso, escore e número de partos) e aleatoriamente sendo que, 15 animais de cada grupo foram submetidos aos tratamentos: 1- desafio com ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) foi administrado via exógena 0,6 UI / kg de peso vivo / por animal e 2- controle com Placebo (soro fisiológico). Estes tratamentos (ACTH x Placebo) foram realizados no 60º dia de lactação.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP. Para determinação dos parâmetros físico-químicos foi utilizado o aparelho Milkoskope Expert Automático para mensuração de: gordura, proteína, lactose e minerais. O método utilizado para análise da acidez do leite foi o Dornic ou acidez titulável, o resultado das amostras foi expresso em percentagem (%). A determinação dos microrganismos presentes no leite foi realizada pela contagem das colônias crescidas em ágar (UFC/mL). Para tanto, 100µL de leite foram semeados e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após incubação foi contado o número total de colônias por placa. Foram utilizados três meios de cultura: Contagem Total de Bactérias (Plate Count Agar); *Estafilococos* (Baird Parker Aga) e *Enterobacterias* (MacConkey Agar).

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada em lâminas, através do método direto, utilizando-se microscópio óptico comum com objetiva de imersão. Após a colheita do leite as lâminas foram confeccionadas através de esfregaço do leite (em duplicata) e posteriormente submetidas ao fixador de Carnoy's; hidratadas com álcool etílico e água destilada; coradas com Verde de metila e pironina Y (PYMG) e imersas em álcool e água

novamente. Foram contados 50 campos por esfregaço de cada animal, totalizando 100 campos por animal.

Amostras de sangue foram colhidas por punção na veia jugular, nos tempos: -30 minutos (30 minutos antes da aplicação de ACTH ou Placebo); 0 minuto (no momento da aplicação) e 60; 120 e 360 minutos (após a aplicação). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm, 4°C, durante 17 minutos. O plasma foi separado, transferido para um microtubo de 1,5 mL e estocado a -20°C para posterior análise dos hormônios cortisol e IGF-1. As análises dos hormônios foram realizadas por meio de ensaios imunoenzimáticos (EIA), utilizando kits comerciais para cortisol (Monobind, Lake Forest, CA, USA) e para IGF-1 (Enzo, Farmingdale, NY USA). As leituras dos resultados das reações foram realizadas no leitor de microplacas de ELISA.

No dia do desafio (60º dia de lactação) também foram realizadas biópsias da glândula mamária de 8 cabras, sendo sorteadas 4 cabras de cada tratamento. A biópsia foi realizada depois do esgotamento total do úbere, na parte superior e medial da glândula mamária 20 minutos após a aplicação de ACTH ou Placebo. Após a tricotomia, assepsia da pele e bloqueio anestésico foi realizada uma incisão na pele, com um bisturi. Em seguida, o equipamento para biópsia foi inserido na incisão numa profundidade de aproximadamente 2,0 cm, ao ser disparado o equipamento secciona e recolhe uma amostra de aproximadamente 2,0 x 0,5 cm de tecido mamário. Foram colhidas 3 amostras de tecido sendo a 1ª destinada a histologia e armazenada em formol 4% até a confecção das lâminas; a 2ª imediatamente armazenada em freezer -80°C para posterior análise da expressão gênica em PCR tempo real e a 3ª foi destinada para cultivo celular e posterior administração de tratamentos *in vitro*.

Para histologia e coloração HE (hematoxilina eosina) o tecido primeiramente foi fixado em formol 4% por um período de 24 horas. Após essa etapa, o tecido foi imerso em

álcool 70%; álcool absoluto; xilol e por fim incluso na parafina para formação de blocos e posterior corte no micrótomo e coloração básica em HE para observação histológica morfofuncional do tecido mamário em microscópio óptico (400x).

A taxa de apoptose foi determinada pela metodologia de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTPnickendlabeling) que identifica *in situ* a fragmentação do DNA característica das células apoptóticas, baseado na incorporação de nucleotídeos marcados nos sítios de fragmentação do DNA pela ação da enzima deoxinucleotidiltransferase terminal. Posteriormente, a inserção dos nucleotídeos é revelada pela reação da peroxidase com a diaminobenzidina conforme as recomendações do kit (In situ celldeathdetection, fluorescein – Roche, Indianapolis, IN, USA). Por fim, a contagem das células nas lâminas foram realizadas em microscopia fluorescente (400x), (Figura 1 A e B).

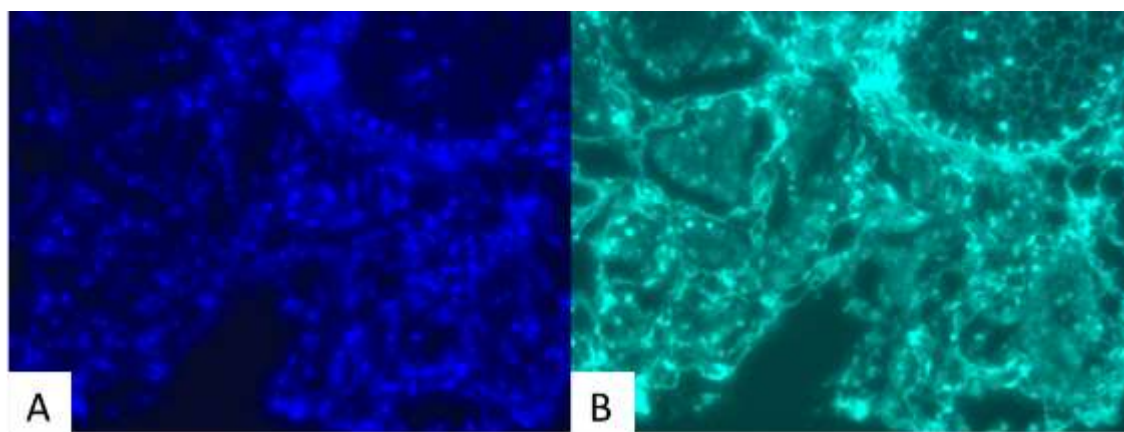


Figura 11 A e B. A: Foto do lóbulo contendo células epiteliais mamárias coradas com HOECHST e visualizadas pelo microscópio (400x), B: Foto do lóbulo contendo células epiteliais mamárias positivas para coloração de TUNEL, visualização em fluorescência da fragmentação do DNA.

A taxa de proliferação celular foi determinada pela metodologia de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), que identifica no núcleo das células proteínas que possuem o papel de iniciar a proliferação celular por intermédio da DNA polimerase. A análise foi realizada seguindo as recomendações do kit (PCNA kit – Invitrogen - Burlington,

Ontario - Canada), a leitura foi realizada em microscópio óptico com lente objetiva 400x para posterior contagem das células, Figura 2.

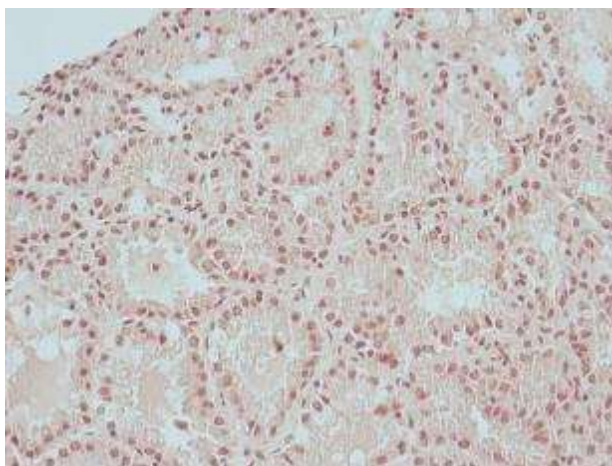


Figura 2. Foto do lóbulo contendo células epiteliais mamárias coradas com reagente do kit de PCNA. Células marcadas o núcleo (marrom intenso) são consideradas positivas, ou seja, células proliferativas, visualizada pelo microscópio Zeiss (400x).

Para expressão gênica do tecido primeiramente foi realizado a extração do RNA através do kit PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies, California, USA). Posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA por transcrição reversa (RT), onde, o RNA total (1,0 µg) foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se o kit Improm II (Promega, Madison, USA). Resumidamente, o protocolo se iniciou com a incubação do RNA com 0,5 µg do oligonucleotídioligo-dT (Invitrogen, California, USA) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação tampão 1 X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa Improm. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C (Merighe et al., 2010). Na sequência as amostras foram submetidas às reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR) e posterior análise dos fragmentos gênicos amplificados. Os níveis de expressão dos genes de interesse foram determinados por PCR-TR usando os genes cujos oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes estudados.

Gene		Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
GAPDH	Direto Reverso	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3' 5'-TGACAATCTTGAGGGTGTG-3'	AJ431207	181
GHR	Direto Reverso	5'-CGTCTCTGCTGGTGAACA-3' 5'-AACGGGTGGATCTGGTTGTA-3'	NM_001285648	148
IGF-1R	Direto Reverso	5'-TTAAAATGGCCAGAACCTGAG-3' 5'-ATTATAACCAAGCCTCCAC-3'	XM_005694951	314
IGF-1	Direto Reverso	5'-TGCTCTCCAGTTCGTGTG-3' 5'-CATCTCCAGCCTCCTCAG-3'	FJ716104	142
IGFBP-3	Direto Reverso	5'-AAAGGTCATGCCAAGGACAG-3' 5'-TGCCCGTACTTATCCACACA-3'	JQ341161	281
IGFBP-5	Direto Reverso	5'-TGCGAGCTGGTCAAGGAG-3' 5'-TCCTCTGCCATCTCGGAG-3'	JF720883	257
BCL-2	Direto Reverso	5'-GATGACCGAGTATCTGAACCG-3' 5'-GACAGCCAGGAGAAATCAAACA-3'	NM_001166486	120
BAX	Direto Reverso	5'-TCGGTCTCAACGGCTACA-3' 5'-CCACTCCAGCCACAAAGA-3'	NM_173894	189

Cada gene foi amplificado em uma reação separada e cada reação foi realizada em duplicata. Cada 20 µL de reação continha 1,0 µL de cDNA das amostras; 0,4µL de primer direto e 0,4µL de primer reverso dos genes analisados: GAPDH (controle), receptor de GH (GHR), receptor de IGF-1 (IGF-1R), IGF-1, Bax, Bcl-2, IGFBP-3 e IGFBP-5; 8,2 µL de água livre de RNA e 10,0 µL de Mix Sybr Green.

Os resultados foram analisados conforme equação proposta por Schmittgen & Livak, 2008, que possibilita a comparação das mudanças no perfil de expressão gênica da amostra de interesse em relação a um calibrador (amostra controle) e entre diferentes amostras. Essa fórmula foi aplicada pois, a eficiência do primer controle e dos demais genes analisados foram testadas e mostraram amplificação normal conforme esperado. O número dois na base da fórmula aritmética representa que a quantidade de material genético da reação é dobrada a cada novo ciclo e o C_T se refere a ciclo “threshold” que é a quantidade de ciclos necessários para que a amostra atinja o limiar de detecção na fase exponencial da amplificação.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \left[\frac{(Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ controle})_{\text{amostra A}}}{-(Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ controle})_{\text{amostra B}}} \right]$$

Experimento 2 – *In vitro*

No 60º dia de lactação os animais experimentais foram tratados com ACTH ou Placebo, neste mesmo dia foi realizada biópsia para obtenção do tecido mamário de 4 cabras de cada tratamento. Posteriormente, parte do tecido obtido da glândula mamária foi destinado para cultivo em meio básico Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture, Gibco by Life (DMEM/F-12) até que as mesmas as células preenchessem o fundo da placa. As células foram coradas com azul de tripan (Trypan Blue Stain – 0,4%) e contadas pelo aparelho Countess Automated Cell Counter (Invitrogen - Waltham, -MA, USA) a fim de garantir que todo tratamento proposto tivesse uma quantidade mínima de $1,0 \times 10^5$ de células epiteliais mamárias vivas. Posteriormente as células foram dispostas em matrigel por 24 horas, para posterior inclusão de cortisol e IGF-1 no meio de cultivo, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos testados por amostra em função dos níveis de cortisol (0, 10, 100 e 1000 µg/mL) em relação as duas contrações de IGF-1 (0 ou 100 ng/mL).

Meio SEM IGF-1 + Cortisol	Meio COM IGF-1 + Cortisol
0 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	0 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1
10 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	10 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1
100 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	100 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1
1000 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	1000 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1

As células epiteliais permaneceram incubadas nestes meios de cultura por 5 dias (Figura 3). Após esse período, as células foram removidas da placa de cultura e centrifugadas até a formação de um pellet que foi estocado a -80°C para posterior extração de RNA, síntese de cDNA e expressão gênica (dos mesmos genes expressos no tecido) por PCR – TR como descrito anteriormente para o *in vivo* (Tabela 1).



Figura 3. Placa de cultivo celular com os 8 tratamentos propostos por animal.

A expressão gênica de IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 das células tratadas (*in vitro*) foram realizadas e analisadas conforme descrito no experimento *in vivo*.

Análise Estatística

Experimento 1 (*in vivo*)

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando o Statistical Analysis System (SAS, 2008). Após a verificação da normalidade do resíduo para o Shapiro-Wilk PROC univariate. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo o procedimento do MIXED do SAS, utilizando o modelo: $Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + e_{ij}$, em que, μ = média total, C = efeito aleatório das cabras ($i = 1$ para 30 cabras), B = efeito fixo para os tratamentos ACTH x Placebo, ($j = 1$) e e = erro residual. Foram considerados como efeito fixo os tratamentos (ACTH x Placebo) e como efeito aleatório os animais (30 cabras).

Experimento 2 (*in vitro*)

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando o Statistical Analysis System (SAS, 2008). Após a verificação da normalidade do resíduo para o Shapiro-Wilk PROC univariate. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo o procedimento GLM do SAS, utilizando o modelo: $Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + e_{ij}$, em que, μ = média total,

C = efeito aleatório das cabras ($i = 1$ para 8 cabras), B = efeito fixo para os tratamentos Cortisol/ IGF-1, ($j = 1$) e e = erro residual. Foram considerados como efeito fixo os tratamentos níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e diferentes concentrações de IGF-1 (0 e 100 ng/mL) e como efeito aleatório da biópsia da glândula mamária dos animais (8 cabras).

RESULTADOS

Experimento 1 – *In vivo*

A produção de leite, composição físico-química (gordura, proteína, lactose, minerais e acidez (%)), análise microbiológica (Contagem Total de Bactérias, *Enterobacterias* e *Estafilococos* (UFC/mL)) e CCS (células/mL) não sofreram efeitos dos tratamentos ACTH x Placebo (Tabela 3).

Tabela 3. Produção (L), composição físico-química (gordura; proteína; lactose; minerais e acidez (%)), microbiologia (UFC/mL: PCA; MC e BPA) e CCS (cells/mL) do leite até os 60 dias de lactação

Parâmetros	Tratamentos		DPM‡	P-valor†
	ACTH Média ± DPM‡	Placebo Média ± DPM‡		
Produção de Leite (L)	1,83 ± 0,03	1,82 ± 0,04	0,03	NS
Gordura (%)	2,98 ± 2,56	3,82 ± 0,11	1,73	NS
Proteína (%)	3,17 ± 0,01	3,19 ± 0,01	0,01	NS
Lactose (%)	4,31 ± 0,02	4,34 ± 0,02	0,02	NS
Minerais (%)	0,64 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,01	NS
Acidez (%)	1,75 ± 0,02	1,74 ± 0,02	0,02	NS
CCS (cells/mL)*	1403,55 ± 234,04	1323,22 ± 137,04	189,34	NS
Contagem Total de Bactérias (UFC/mL)*	6,87 ± 3,76	19,92 ± 6,43	5,34	NS
<i>Enterobacterias</i> (UFC/mL)**	-	-	-	-
<i>Estafilococos</i> (UFC/mL)*	7,15 ± 4,47	24,37 ± 8,85	7,12	NS

* Valores dispostos em 10^3 .

**Não houve contagem suficiente para realizar análise estatística

‡ Desvio Padrão da Média.

† Valor da probabilidade para efeito de tratamento (ACTH e Placebo), $P < 0,05$.

NS: Não significativo

Não houve efeito de tratamento, de tempo de coleta e interação tratamento/tempo de coleta sobre a concentração plasmática de IGF-1 (Figura 4). Porém, houve interação entre tratamento e tempo para concentração plasmática de cortisol, sendo que, 60 minutos após a aplicação de ACTH a concentração de cortisol foi significativamente superior (43,34 ng/mL) ao grupo placebo (8,73 ng/mL). Contudo a concentração de cortisol voltou para níveis basais no tempo 120 minutos, (Figura 4).

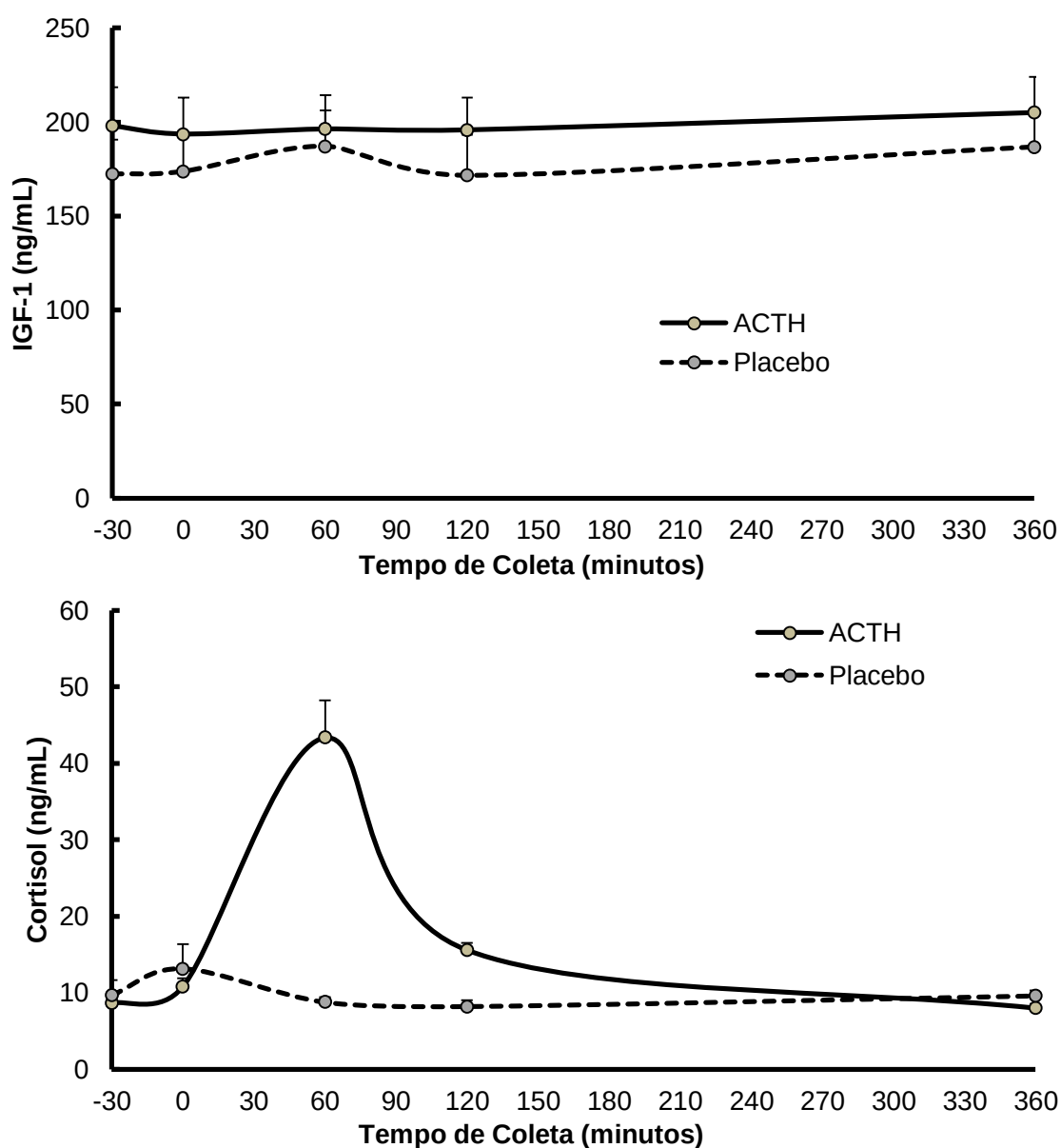


Figura 4. Concentração plasmática de IGF-1 (ng/mL) e cortisol (ng/mL) no 60º dia de lactação em função dos tratamentos ACTH e Placebo.

Ao avaliar a expressão dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 também não foram observados efeitos dos tratamentos ACTH ou Placebo no tecido da glândula mamária (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, do tecido da glândula mamária no 60º dia de lactação para os tratamentos ACTH e Placebo.

Parâmetros	Tratamentos		DPM ‡	P-valor †
	ACTH Média ± DPM‡	Placebo Média ± DPM‡		
GHR	1,46 ± 0,22	1,21 ± 0,11	0,16	NS
IGF-1	1,44 ± 0,39	1,40 ± 0,24	0,19	NS
IGF-1R	1,17 ± 0,26	1,48 ± 0,27	0,10	NS
IGFBP-3	0,85 ± 0,18	1,09 ± 0,08	0,10	NS
IGFBP-5	2,44 ± 1,28	1,69 ± 0,49	0,68	NS
Bax	1,2 ± 0,19	1,48 ± 0,39	0,20	NS
Bcl-2	1,7 ± 0,32	2,39 ± 1,03	0,53	NS

‡ Desvio padrão da média.

NS: Não significativo

† Valor da probabilidade para efeito de tratamento (ACTH e Placebo), $P < 0,05$.

Também não houveram efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos (ACTH x Placebo) sobre as taxas de proliferação (PCNA) e apoptose (TUNEL) celular, no tecido da glândula mamária (Figura 5).

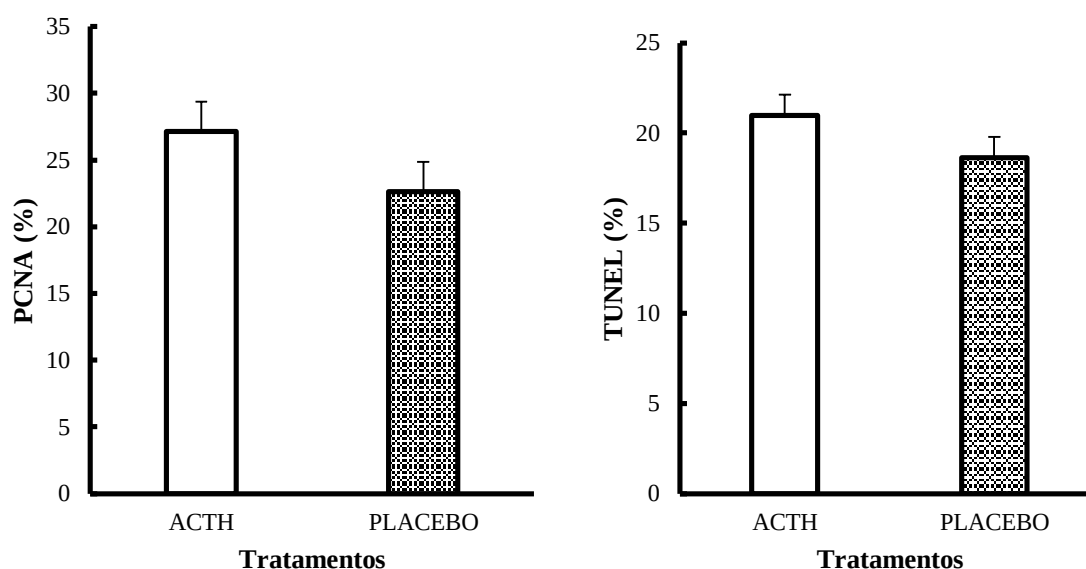


Figura 5. Percentual de proliferação celular (PCNA) e apoptose (TUNEL) celular no tecido da glândula mamária de cabras tratadas com ACTH ou Placebo no 60º dia de lactação.

Experimento 2 – *In vitro*

Não houve efeito significativo do IGF-1 (100 ng/mL) nem interação do IGF-1 com os níveis crescentes de cortisol na expressão dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, nas células epiteliais mamárias *in vitro* (Tabela 5).

Tabela 5. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, de células epiteliais mamária cultivadas em meio com ou sem IGF-1 (0 e 100 ng/mL) no meio de cultivo.

	IGF-1 (ng/mL)		DPM ‡	P-valor†
	0	100		
	Média ± DPM‡	Média ± DPM‡		
GHR	1,32 ± 0,25	1,14 ± 0,22	0,24	NS
IGF-1	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,10	0,18	NS
IGF-1R	1,53 ± 0,22	1,54 ± 0,14	0,18	NS
IGFBP-3	1,48 ± 0,24	1,13 ± 0,14	0,19	NS
IGFBP-5	1,41 ± 0,34	1,37 ± 0,33	0,33	NS
Bax	1,52 ± 0,18	1,38 ± 0,15	0,82	NS
Bcl-2	1,14 ± 0,19	1,01 ± ,017	0,89	NS

‡ Desvio padrão da média.

NS: Não Significativo

† Valor da probabilidade para efeito células epiteliais cultivadas com ou sem IGF-1 (0 e 100 ng/mL), P<0,05.

Contudo, ao analisar o efeito da inclusão dos níveis crescentes de cortisol (µg/mL) no meio de cultivo houve efeito significativo sobre a expressão dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R e Bax. Exceto para IGF-1, as maiores expressões foram observadas quando se adicionou 1000 µg/mL de cortisol ao meio de cultivo, (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 6. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, de células epiteliais mamárias cultivadas no 60º dia de lactação com níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 µg/mL) no meio de cultivo.

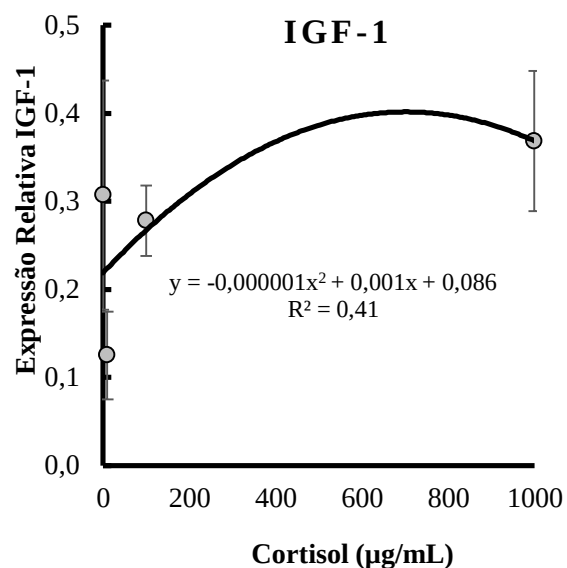
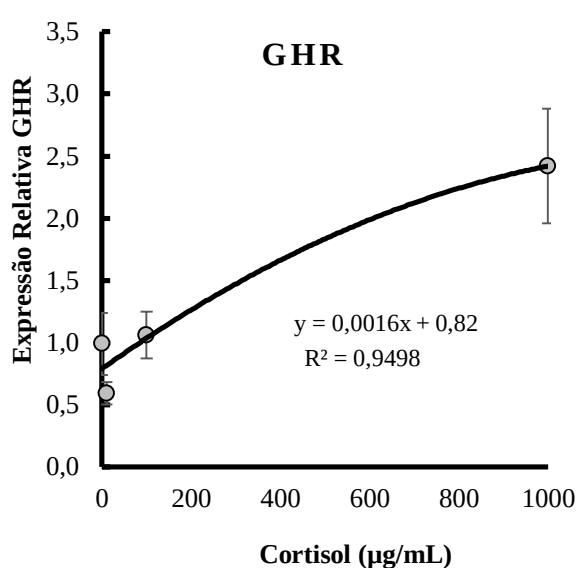
	Cortisol (µg/mL)				DPM [‡]	P-valor [†]
	0	10	100	1000		
	Média ± DPM [‡]	Média ± DPM [‡]	Média ± DPM [‡]	Média ± DPM [‡]		
GHR	0,99 ± 0,25 ^{bc}	0,59 ± 0,09 ^c	1,06 ± 0,19 ^b	2,42 ± 0,46 ^a	0,25	0,01
IGF-1	0,30 ± 0,13 ^a	0,12 ± 0,05 ^b	0,27 ± 0,04 ^a	0,36 ± 0,08 ^a	0,09	0,01
IGF-1R	1,43 ± 0,17 ^b	1,02 ± 0,14 ^b	1,38 ± 0,15 ^b	2,30 ± 0,36 ^a	0,22	0,01
IGFBP-3	1,43 ± 0,26	1,53 ± 0,41	1,23 ± 0,23	1,03 ± 0,19	0,27	NS
IGFBP-5	1,51 ± 0,60	1,46 ± 0,58	1,29 ± 0,37	1,30 ± 0,31	0,47	NS
Bax	1,08 ± 0,13 ^b	0,85 ± 0,08 ^b	1,22 ± 0,13 ^b	2,56 ± 0,21 ^a	0,15	0,01
Bcl-2	1,46 ± 0,33	0,64 ± 0,17	0,94 ± 0,18	1,25 ± 0,27	0,23	NS

[‡] Erro padrão da média.

[†] Valor da probabilidade para efeito dos níveis crescentes de cortisol no meio de cultivo (0, 10, 100 e 1000 µg/mL), P<0,05.

NS: Não Significativo

^{a-bc} Médias na mesma linha, seguidas por letra diferente, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



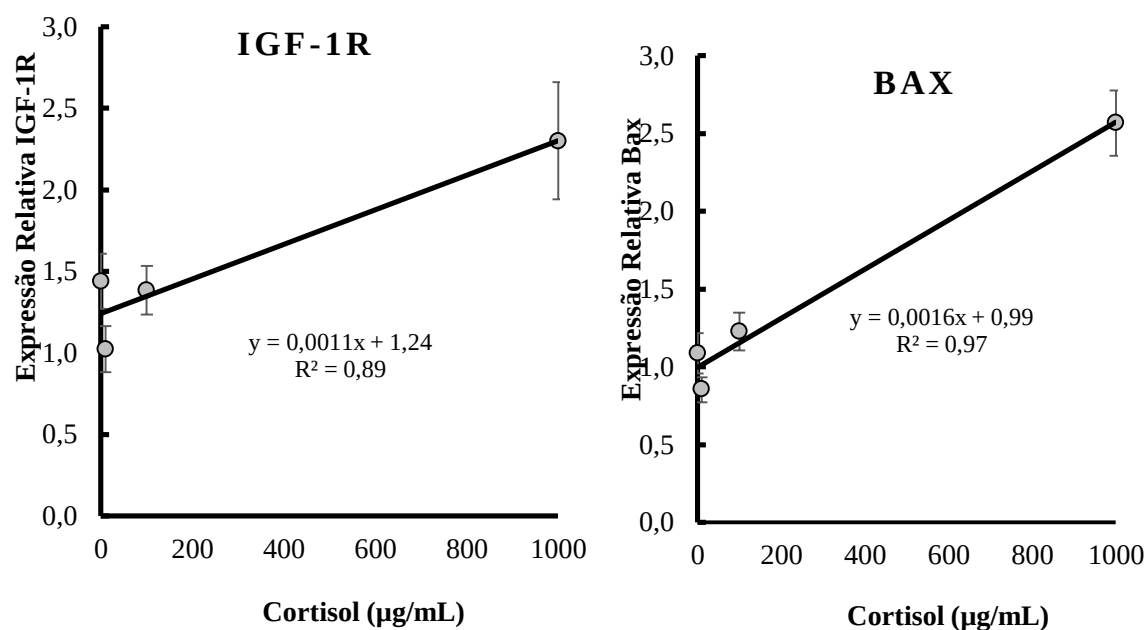
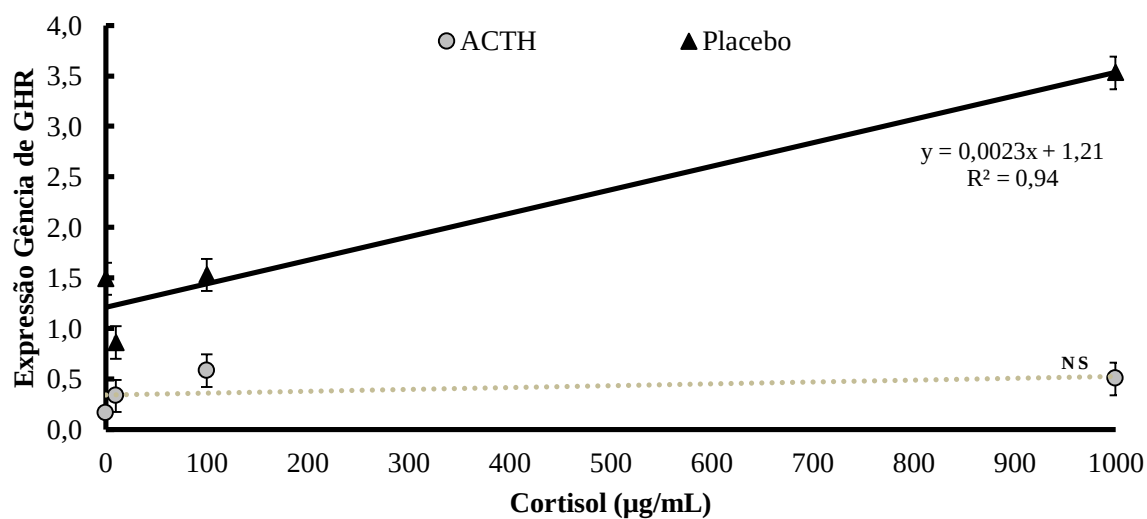


Figura 6. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R e Bax que demonstraram efeito dos níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) nas células epiteliais mamárias aos 60 dias de lactação, letras diferentes, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve influência dos tratamentos *in vivo* (ACTH x Placebo) sobre os níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) em relação a expressão gênica de GHR e Bax nas células epiteliais mamária. Em ambos os casos, o tratamento Placebo apresentou valores superiores, ao ACTH, principalmente quando se adicionou 1000 $\mu\text{g/mL}$ de cortisol, (Figura 7).



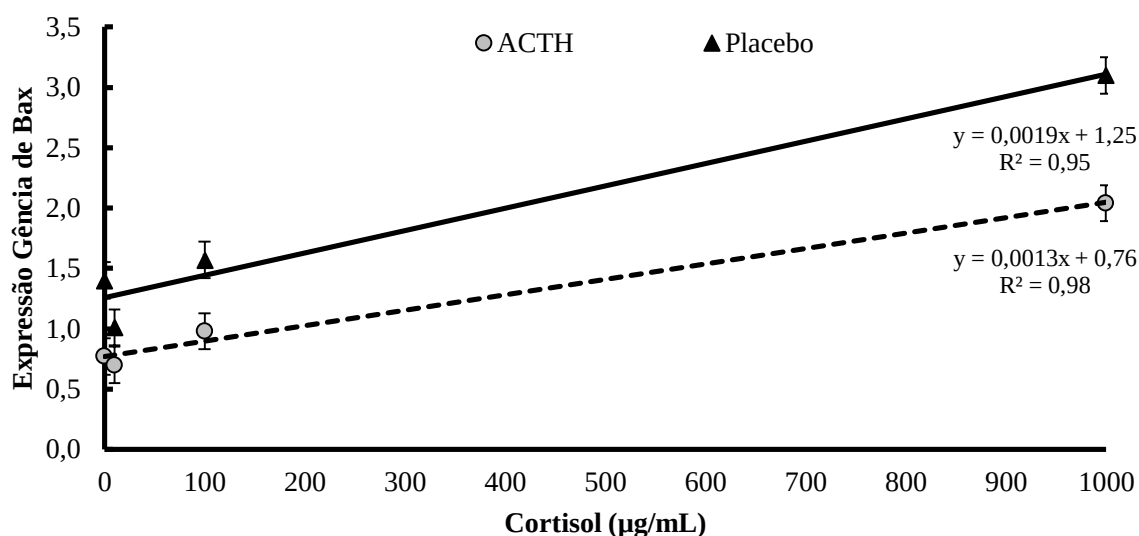


Figura 7. Influência do tratamento *in vivo* (ACTH x Placebo) sobre os níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 µg/mL) na expressão relativa de RNAm de GHR e Bax. Letras diferentes, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Os resultados do experimento *in vivo* (produção de leite, composição físico-química, microbiologia, CCS, taxa de PCNA, de TUNEL e a expressão dos genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 no tecido da glândula mamária) demonstraram que não houve efeito significativo dos tratamentos ACTH x Placebo o que indica que as cabras experimentais foram submetidas a um estresse pontual (Fukasawa et al., 2008, Diaz et al., 2013), similar à outros tipos de estresse como: frequência e eficiência da ordenha (Wilde et al., 1997), transporte (Canaes et al., 2011), condições climáticas (Gudev et al., 2005), situações diferentes daquela de animais submetidos ao estresse crônico (Mormede et al., 2007, Fukasawa et al., 2008, Hough et al., 2015). Vale ressaltar que a composição físico-química apresentou valores dentro dos padrões normais (USDA, 2016), a CCS e UFC também apresentaram valores dentro dos padrões normais para o leite de cabras (Bergonier et al., 2003).

Apesar do IGF-1 agir promovendo efeito mitógeno nas células epiteliais e ser um fator de regulação da galactopoiese (Sharma et al., 1994, Dallard et al., 2005), no presente estudo

não houve efeito do IGF-1 sobre as células mamárias em ambos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Esse resultado pode ser consequência do período em que foi colhida as amostras (60 dias de lactação) quando a taxa de proliferação celular é baixa, quando comparada a outros trabalhos durante o final da gestação até primeiras semanas de lactação (Capuco et al., 2001; Sakamoto et al., 2007) também não houve interação entre os tratamentos cortisol e IGF-1 *in vitro*.

Ao avaliar o efeito dos níveis crescentes de cortisol *in vitro*, houve maior expressão dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R (proliferação celular) e Bax (pró-apoptótico), resultado que sugere que o cortisol pode ter efeitos celulares opostos sobre as células epiteliais. Pois, a maior expressão dos genes GHR, IGF-1 e IGF-1R, estimulam a proliferação das células epiteliais (Sakamoto et al., 2007), já a proteína Bax estimula a apoptose das células epiteliais (Valentijn & Gilmore, 2004). O GHR é capaz de modificar o metabolismo das células epiteliais através do aumento da síntese de IGF-1 na matriz extracelular que por sua vez aumenta a expressão de IGF-1R. Para que o IGF-1 consiga efetuar seu papel na célula epitelial, primeiramente ocorre a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) que se localiza junto ao IGF-1R na membrana basal da célula epitelial. Essa fosforilação vai desencadear a ativação da proteína Akt no interior da célula, completando assim, o papel de proliferação e sobrevivência do IGF-1 na célula (Hockenbery et al., 1993, Sharpe et al., 2004, Murney et al., 2015, Bao et al., 2016, Perez et al., 2016).

No presente estudo, quando as células epiteliais foram submetidas a altas concentrações de cortisol, aumentou a expressão de GHR bem como a de IGF-1R e IGF-1 o que confirma o relatado anteriormente com estes hormônios, ou seja, eles agem como “protetores” das células epiteliais *in vitro* (Accorsi et al., 2002; Murney et al., 2015). Em contrapartida, a proteína Bax dá início a apoptose celular, através da despolarização e

rompimento do canal do Citocromo C liberando o mesmo para o citoplasma, ativando as caspases e por fim, desencadeando uma cascata de clivagens de proteínas que leva a morte celular (Jin & El-Deiry, 2005, Katz & Streuli, 2007b). Estes efeitos opostos do GHR e Bax, associados ao nível crescente de cortisol nas células epiteliais explicam por que as taxas de proliferação e apoptose celular não foram significativamente alteradas no presente estudo.

Ao avaliar a expressão de GHR houve efeito do tratamento ACTH x Placebo (experimento *in vivo*) sobre os níveis crescentes de cortisol adicionados na cultura celular (experimento *in vitro*). Neste caso, as células epiteliais das cabras submetidas ao tratamento placebo apresentaram maior expressão GHR à medida que a concentração de cortisol aumentou na cultura quando comparado ao tratamento ACTH. Este resultado foi inesperado, pois nossa hipótese inicial postulava efeito oposto do estresse, via administração de cortisol. Porém, também foi observado expressão elevada do gene Bax para cabras do grupo placebo quando comparadas as do grupo ACTH, assim a maior expressão de Bax em decorrência da maior concentração de cortisol no meio (1000 µg/mL), está de acordo com a hipótese inicial, ou seja, o estresse via cortisol desencadeia a apoptose, poisque o cortisol ativa a expressão da proteína Bax na mitocôndria (Valentijn & Gilmore, 2004, Katz & Streuli, 2007b). Esse resultado pode ser indício de que a célula epitelial pode ser influenciada pelo o que ocorre com as células epiteliais antes de serem submetidas aos tratamentos *in vitro*, ou seja, o estresse pontual (*in vivo*) reduziu nas cabras do grupo ACTH sua resposta à altas concentrações de cortisol *in vitro*.

Deste modo, os resultados do presente estudo sugerem que ação do cortisol promove respostas celulares opostas, pois no experimento *in vitro* o aumento na concentração de cortisol no meio resultou em maior expressão de IGF-1, IGF-1R, GHR que estimulam a proliferação celular e Bax que estimula a apoptose. Contudo, tanto *in vivo* como *in vitro*, as

taxas de proliferação e apoptose não foram influenciadas pelos tratamentos testados, mantendo a glândula mamária nos 60 dias de lactação, em estado estável em relação ao número de células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accorsi, P. A., B. Pacioni, C. Pezzi, M. Forni, D. J. Flint, and E. Seren. 2002. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *Journal of Dairy Science* 85(3):507-513.
- Bao, Z. K., J. Lin, L. L. Ye, Q. Zhang, J. Q. Chen, Q. Yang, and Q. H. Yu. 2016. Modulation of mammary gland development and milk production by growth hormone expression in GH transgenic goats. *Frontiers in Physiology* 7:8.
- Baumrucker, C. R. and J. R. Blum. 1993. Secretion of insulin-like growth-factors in milk and their effect on the neonate. *Livestock Production Science* 35(1-2):49-72.
- Baxter, R. C. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 278(6):E967-E976.
- Bergonier, D., R. De Cremoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34(5):689-716.
- Canaes, T. S. 2011. Capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) na alimentação de cabras Saanen nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, produção, composição e aceitação do leite. . Page 196 in *Zootecnia*. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Jaboticabal.
- Capuco, A. V., D. L. Wood, R. Baldwin, K. McLeod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *Journal of Dairy Science* 84(10):2177-2187.
- Collier, R. J., E. L. Annen-Dawson, and A. Pezeshki. 2012. Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health. *Animal* 6(3):403-414.
- Collier, R. J., J. C. Byatt, M. F. McGrath, and P. J. Eppard. 1995. Role of bovine placental lactogen in intercellular signalling during mammary growth and lactation. *Intercellular Signalling in the Mammary Gland*:13-24.
- Collier, R. J., Stiening C. M., B. C. Pollard, M. J. VanBaale, L. H. Baumgard, P. C. Gentry, and P. M. Coussens. 2006. Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stresstolerance at the cellular level in cattle. *Journal Animal Science* 84:E1 - E13.
- Dallard, B. E., H. H. Ortega, J. A. Lorente, and G. S. Romano. 2005. Immunolocalization and expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the ovine mammary gland during mammarygenesis, lactation and involution. *Small Ruminant Research* 58(1):1-11.
- Diaz, J. R., M. Alejandro, G. Romero, F. Moya, and C. Peris. 2013. Variation in milk cortisol during lactation in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Science* 96(2):897-905.

- Flint, D. J. and M. Gardner. 1994. Evidence that growth-hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary-gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic-acid content and tight junction status. *Endocrinology* 135(3):1119-1124.
- Fukasawa, M., H. Tsukada, T. Kosako, and A. Yamada. 2008. Effect of lactation stage, season and parity on milk cortisol concentration in Holstein cows. *Livestock Science* 113(2-3):280-284.
- Green, K. A. and C. H. Streuli. 2004. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(15):1867-1883.
- Gu, X., T. Ali, R. Chen, G. Hu, Y. Zhuang, J. Luo, H. Cao, and B. Han. 2015. In Vivo Studies of Molybdenum-Induced Apoptosis in Kidney Cells of Caprine. *Biological Trace Element Research* 165(1):51-58.
- Gudev, D., S. Popova-Raltcheva, P. Moneva, and H. D. Johnson. 2005. Endocrine changes in two behavioural types of cows exposed to heat. *Biotechnology in animal husbandry* 21:45-51.
- Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. 1993. BCL-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75(2):241-251.
- Hough, D., K. Storbeck, S. W. P. Cloete, A. C. Swart, and P. Swart. 2015. Relative contribution of P450c17 towards the acute cortisol response: Lessons from sheep and goats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 408(C):107-113.
- Jin, Z. Y. and W. S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* 4(2):139-163.
- Jones, J. I. and D. R. Clemmons. 1995. Insulin-like growth-factors and their binding-proteins - biological actions. *Endocrine Reviews* 16(1):3-34.
- Katz, E. and C. H. Streuli. 2007a. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(4):715-726.
- Katz, E. and C. H. Streuli. 2007b. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(4):715-726.
- Kleinberg, D. L., M. Feldman, and W. F. Ruan. 2000. IGF-I: An essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5(1):7-17.
- Knight, C. H. and M. Peaker. 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* 69(2):331-338.
- Marshman, E., K. A. Green, D. J. Flint, A. White, C. H. Streuli, and M. Westwood. 2003. Insulin-like growth factor binding protein 5 and apoptosis in mammary epithelial cells. *Journal of Cell Science* 116(4):675-682.
- Merighe, G. K. F., M. D. Miranda, T. H. C. de Bem, Y. F. Watanabe, and F. V. Meirelles. 2010. Effect of culture time and gender of nuclei donor cells on bovine development produced by nuclear transfer. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* 39(10):2166-2173.

- Mormede, P., S. Andanson, B. Auperin, B. Beerda, D. Guemene, J. Malmkvist, X. Manteca, G. Manteuffel, P. Prunet, C. G. van Reenen, S. Richard, and I. Veissier. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 92(3):317-339.
- Murney, R., K. Stelwagen, T. T. Wheeler, J. K. Margerison, and K. Singh. 2015. The effects of milking frequency on insulin-like growth factor I signaling within the mammary gland of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98(8):5422-5428.
- NRC. 2007. Nutrients requirements of small ruminant: sheep, goats, cervids and new world camelids Washington, D.C.
- Perez, L., J. B. Ortiz-Delgado, and M. Manchado. 2016. Molecular characterization and transcriptional regulation by GH and GnRH of insulin-like growth factors I and II in white seabream (*Diplodus sargus*). *Gene* 578(2):251-262.
- Prosser, C., I. Fleet, A. Corps, E. Froesch, and R. Heap. 1990. Increase in milk secretion and mammary blood flow by intra-arterial infusion of insulin-like growth factor-I into the mammary gland of the goat. *Journal of Endocrinol* 123:437-443.
- Prosser, C. G. 1996. Insulin-Like Growth Factors in Milk and Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1(3):297-306.
- Sakamoto, K., T. Yano, T. Kobayashi, A. Hagino, H. Aso, and Y. Obara. 2007. Growth hormone suppresses the expression of IGFBP-5, and promotes the IGF-I-induced phosphorylation of Akt in bovine mammary epithelial cells. *Domestic Animal Endocrinology* 32(4):260-272.
- SAS. 2008. Statistics Version 9.2. SAS Inst., Inc., Cary, NC.CD-ROM.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols* 3(6):1101-1108.
- Sharma, B. K., M. J. Vandehaar, and N. K. Ames. 1994. Expression of insulin-like growth-factor-i in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. *Journal of Dairy Science* 77(8):2232-2241.
- Sharpe, J. C., D. Arnoult, and R. J. Youle. 2004. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1644(2-3):107-113.
- Tao, S. Y., J. Tian, R. H. Cong, L. L. Sun, Y. Q. Duanmu, H. B. Dong, Y. D. Ni, and R. Q. Zhao. 2015. Activation of cellular apoptosis in the caecal epithelium is associated with increased oxidative reactions in lactating goats after feeding a high-concentrate diet. *Experimental Physiology* 100(3):278-287.
- USDA. 2016. Basic Report 01082, Milk, lowfat, fluid, 1% milkfat, with added vitamin A and vitamin D. N. N. D. f. S. Reference, ed, Beltsville, MD - USA.
- Valentijn, A. J. and A. P. Gilmore. 2004. Translocation of full-length bid to mitochondria during anoikis. *Journal of Biological Chemistry* 279(31):32848-32857.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. *Cell* 96(2):245-254.
- Wilde, C. J., L. H. Quarrie, E. Tonner, D. J. Flint, and M. Peaker. 1997. Mammary apoptosis. *Livestock Production Science* 50(1-2):29-37.

Zarzynska, J. and T. Motyl. 2008. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59:275-288.

CAPÍTULO 3 -Relações entre cortisol e IGF-1 sobre a expressão de genes e as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais *in vivo* e *in vitro* no final da lactação.

RESUMO

Vários fatores hormonais podem interferir no início da involução da glândula mamária, dentre eles está o cortisol e o IGF-1 que podem afetar o número de células epiteliais secretórias, a estrutura do alvéolo, bem como, a sobrevivência das células epiteliais e sua proliferação. Deste modo, esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do IGF-1 e cortisol no final da lactação sobre a proliferação, sobrevivência e apoptose na expressão dos genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax, Bcl-2, nas células epiteliais mamárias de cabras Saanen *in vivo* e *in vitro*. Trinta cabras Saanen foram submetidas a administração de ACTH (para induzir o aumento da concentração de cortisol) ou Placebo aos 180 dias de lactação. Durante o experimento foram avaliadas a produção, composição (gordura, proteína, lactose, minerais e acidez) e qualidade do leite (Contagem Total de Bactérias, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae* CCS. Além disso, foram colhidas amostras de sangue das cabras experimentais para determinação da concentração plasmática de Cortisol e IGF-1. Simultaneamente, quatro cabras do grupo Placebo e quatro cabras do grupo ACTH foram submetidas à biópsia da glândula mamária. Parte do tecido mamário foi destinada à histologia para determinação taxas de proliferação e apoptose; parte do tecido foi destinada à expressão genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2; e finalmente outra parte foi destinada para cultivo celular e posterior administração de tratamentos *in vitro* (adição de cortisol 0, 10, 100 e 1000 µg/mL e IGF-1 0 ou 100 ng/mL ao meio de cultivo). Houve efeito significativo da administração de ACTH e placebo *in vivo* e o grupo ACTH apresentou maior produção de leite e maior expressão do gene GHR no tecido da glândula mamária. No experimento *in vitro* também houve efeito significativo do cortisol com maior expressão dos

genes GHR e Bax ao adicionar 1000 µg/mL de cortisol no meio cultivo. Porém, a adição de níveis crescentes de cortisol *in vitro* reduziu significativamente a expressão de IGF-1R. Os resultados do experimento *in vivo* demonstraram que o aumento pontual de cortisol no final da lactação tem efeito positivo sobre o metabolismo das células epiteliais e a produção de leite. *In vitro*, a adição de cortisol aumentou significativamente a expressão de GHR e Bax, mas também reduziu significativamente a expressão de IGF-1R o que evidência o início da involução da glândula mamária.

PALAVRAS CHAVE: Cabras, células epiteliais, cortisol, IGF-1 e involução mamária.

INTRODUÇÃO

Após o pico da lactação dá-se início a involução natural da glândula mamária que tem por consequência o declínio na produção e na composição de leite. Esses acontecimentos se dão principalmente através de dois fatores: 1) redução da capacidade de síntese das células epiteliais mamárias; e 2) desorganização da matriz extracelular e da estrutura do alvéolo, resultando em diminuição drástica no número de células epiteliais (Hurley, 1989, Capuco et al., 2003, Green and Streuli, 2004, Singh et al., 2015).

Vários sinalizadores intramamários podem interferir no início da involução, na regulação da síntese do leite e na sobrevivência das células epiteliais (Flint and Knight, 1997, Accorsi et al., 2002). Dentre todos, o principal é o IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1) que também é sintetizado na glândula mamária e liberado na matriz extracelular do alvéolo através da ação do hormônio de crescimento (GH) (Baumrucker and Erondy, 2000). Sua ação é regulada por um receptor de alta afinidade (IGF-1R) e pelas proteínas ligantes ao IGF- 3 e 5 (IGFBP) (Jones and Clemmons, 1995).

Existem 6IGFBPs, porém na cultura primária de células bovinas foi constatado maior secreção das IGFBPs 3 e 5 (Murney et al., 2015). Essas proteínas são responsáveis pelo transporte e regulação dos níveis de IGF na matriz extracelular do alvéolo, podendo inibir ou aumentar a ação do IGF-1, dependendo da fase da lactação (Sakamoto et al., 2007). A IGFBP-3 é encontrada em maior abundância nas células do leite no terço final da gestação e no final da lactação (Gibson et al., 1999, Baumrucker and Erondy, 2000, Imai et al., 2000, Ricort and Binoux, 2001). A IGFBP-5 age principalmente no início da involução mamária, quando sua concentração na matriz extracelular do alvéolo é superior a concentração de IGF-1 fazendo com o que o IGF-1 não consiga exercer seu papel na célula epitelial mamária. Pois, não ocorre a fosforilação do substrato de insulina (IRS), presente no IGF-1R, e não há ativação das proteínas responsáveis pela sobrevivência e persistências das células epiteliais (Flint et al., 2000, Zarzynska and Motyl, 2008).

A IGFBP-5 também pode atuar no decréscimo da proteína Bcl-2 e aumento da Bax, que são potentes reguladores da apoptose na mitocôndria das células (Vaux & Korsmeyer, 1999, , Tonner et al., 2002, Sharpe et al., 2004). Estas proteínas estão localizadas dentro da célula epitelial, na membrana da mitocôndria, durante toda a lactação elas se mantêm em equilíbrio, porém, se algo atípico ocorrer (como aumento drástico na concentração de cortisol) ou involução da glândula mamária, há um desequilíbrio entre as proteínas Bax e Bcl-2, onde a concentração de Bax é muito maior (Kaufmann & Hengartner, 2001). A Bax provoca o rompimento do canal do Citocromo C na mitocôndria gerando clivagens e ativação de caspases promovendo a desfragmentação do núcleo celular e por fim, apoptose (Wareski et al., 2001; Valentijn & Gilmore, 2004).

Esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do cortisol na fase final da lactação sobre o IGF-1, a proliferação, apoptose e expressão dos genes IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, nas células epiteliais mamárias de cabras Saanen *in vivo* e *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cabras e Design Experimental

Trinta cabras da raça Saanen, com peso vivo de $57,5 \pm 1,5$ kg, escore corporal de $3,5 \pm 1,0$, não gestantes, lactantes e saudáveis foram utilizadas para conduzir o experimento na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP – São Paulo/Brasil. As cabras foram alocadas em baias coletivas cobertas, com cocho de alimentação, sal mineral e água. A alimentação foi composta de 60% de concentrado e 40% de volumoso, fornecendo 100% do requerimento do animal (NRC, 2007).

A ordenha foi realizada uma vez ao dia pelo mesmo ordenhador durante todo o período experimental às 07:00h da manhã em ordenhadeira mecânica (Westfalia Surge) regulada para manter um nível de vácuo de 48 KPa e taxa de pulsação de 120 ciclos/minuto. A rotina da ordenha foi realizada conforme protocolo padrão do Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP, ou seja: entrada dos animais, pré-dipping (com solução de cloro + glicerina), secagem dos tetos, teste da caneca de fundo preto (verificação da mastite sub clínica), colocação do copo das teteiras, retirada das teteiras, pós-dipping (com solução de iodo), registro da produção e saída dos animais.

Experimento 1 – *In vivo*

Os 30 animais foram divididos de maneira homogênea (peso, escore e número de partos) e aleatoriamente sendo que, 15 animais de cada grupo foram submetidos aos tratamentos: 1- desafio com ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) foi administrado via

exógena 0,6 UI / kg de peso vivo / por animal e 2- desafio com Placebo (soro fisiológico). Estes tratamentos (ACTH x Placebo) foram realizados no 180º dia de lactação.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP. Para determinação dos parâmetros físico-químicos foi utilizado o aparelho Milkoskope Expert Automático para mensuração de: gordura, proteína, lactose e minerais. O método utilizado para análise da acidez do leite foi o Dornic ou acidez titulável, o resultado das amostras foi expresso em percentagem (%). A determinação dos microrganismos presentes no leite foi realizada pela contagem das colônias crescidas em ágar (UFC/mL). Para tanto, 100µL de leite foram semeados e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após incubação foi contado o número total de colônias por placa. Foram utilizados três meios de cultura: Contagem Total de Bactérias (Plate Count Agar); *Estafilococos* (Baird Parker Aga) e *Enterobacterias* (MacConkey Agar).

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada em lâminas, através do método direto utilizando-se microscópio óptico comum com objetiva de imersão. Após a colheita do leite as lâminas foram confeccionadas através de esfregaço do leite (em duplicata) e posteriormente submetidas ao fixador de Carnoy's; hidratadas com álcool etílico e água destilada; coradas com Verde de metila e pironina Y (PYMG) e imersas em álcool e água novamente. Foram contados 50 campos por esfregaço de cada animal, totalizando 100 campos por animal.

Amostras de sangue foram coletadas por punção na veia jugular, nos tempos -30 minutos (30 minutos antes da aplicação de ACTH ou Placebo); tempo 0 minuto (no momento da aplicação) e nos tempos 60; 120 e 360 minutos (após a aplicação). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm, 4°C, durante 17 minutos. O plasma foi separado, transferido para um microtubo de 1,5 mL e estocado a -20°C para posterior análise dos hormônios

cortisol e IGF-1. As análises dos hormônios foram realizadas pela metodologia imunoenzimáticas (EIA) utilizando kits comerciais para cortisol (Monobind, Lake Forest, CA, USA) e para IGF-1 (Enzo, Farmingdale, NY USA). As leituras dos resultados das reações foram realizadas no leitor de microplacas de ELISA.

No dia do desafio (180º dia de lactação) também foram realizadas biópsias da glândula mamária de 8 cabras, sendo sorteadas 4 cabras de cada tratamento. A biópsia foi realizada após 20 minutos da aplicação de ACTH ou Placebo e depois do esgotamento total do úbere, na parte superior e medial da glândula mamária. Após a tricotomia, assepsia da pele e bloqueio anestésico, foi realizada uma incisão na pele, com um bisturi. Em seguida, o equipamento para biópsia foi inserido na incisão numa profundidade de aproximadamente 2,0 cm, ao ser disparado o equipamento secciona e recolhe uma amostra de aproximadamente 2,0 x 0,5 cm de tecido mamário. Foram coletadas 3 amostras de tecido sendo a 1ª destinada a histologia e armazenada em formol 4% até a confecção das lâminas; a 2ª imediatamente armazenada em freezer -80°C para posterior análise da expressão gênica em PCR tempo real e a 3ª foi destinada para cultivo celular e posterior administração de tratamentos *in vitro* (Experimento 2).

Para histologia e coloração HE o tecido primeiramente foi fixado em formol 4% por um período de no mínimo 24 horas. Após essa etapa, o tecido foi imerso em álcool 70%; álcool absoluto; xilol e por fim incluso na parafina para formação de blocos e posterior corte no micrótomo e coloração básica em HE para observação histológica morfofuncional do tecido mamário em microscópio óptico (400x).

A taxa de apoptose foi determinada pela metodologia de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTPnickendlabeling) que identifica *in situ* a fragmentação do DNA característica das células apoptóticas, baseado na incorporação de nucleotídeos

marcados nos sítios de fragmentação do DNA pela ação da enzima deoxinucleotidiltransferase terminal. Posteriormente, a inserção dos nucleotídeos é revelada pela reação da peroxidase com a diaminobenzidina conforme as recomendações do kit (In situ cell death detection, fluorescein – Roche, Indianapolis, IN, USA). Por fim, a leitura das lâminas foi realizada em microscopia fluorescente (400x), (Figura 1 A e B).

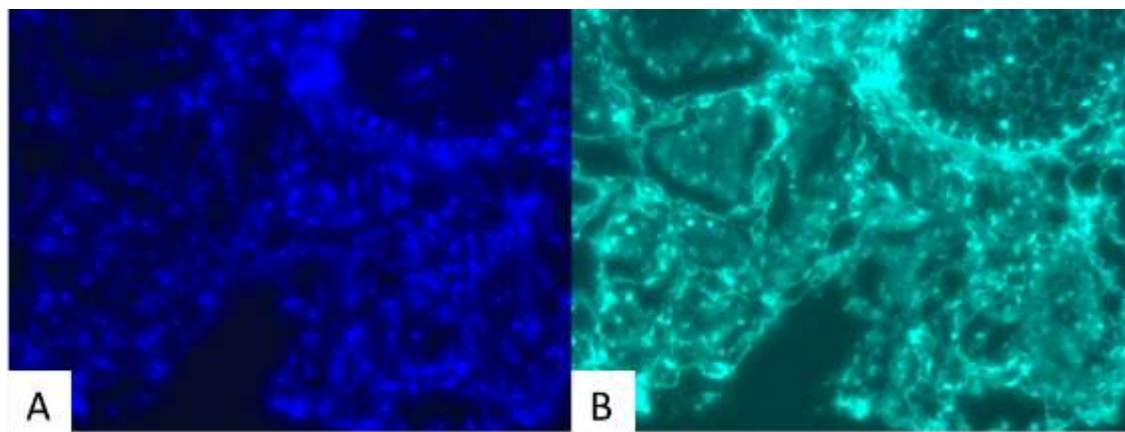


Figura 12 A e B. A: Foto do lóbulo contendo células epiteliais mamárias coradas com HOECHST e visualizada pelo microscópio (400x), B: Foto do lóbulo contendo células epiteliais mamárias positivas para coloração de TUNEL, visualização em fluorescência da fragmentação do DNA.

A taxa de proliferação celular foi determinada pela metodologia de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), que identifica no núcleo das células proteínas que possuem o papel de iniciar a proliferação celular por intermédio da DNA polimerase. A análise foi realizada seguindo as recomendações do kit PCNA – Invitrogen - Burlington, Ontario - Canada), a leitura foi realizada em microscópio óptico com lente objetiva 400x para posterior contagem das células, Figura 2.

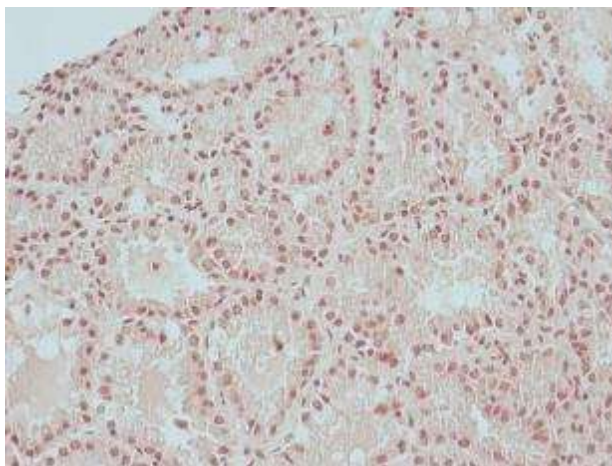


Figura 2. Foto do lóbulo contendo células epiteliais mamárias coradas com reagente do kit de PCNA, células marcadas o núcleo (marrom intenso) são consideradas positivas, ou seja, células proliferativas, visualizada pelo microscópio Zeiss (400x).

Para expressão gênica do tecido, primeiramente foi realizada a extração do RNA através do kit PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies, California, USA). Posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA por transcrição reversa (RT), onde, o RNA total (1,0 µg) foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL empregando-se o kit Improm II (Promega, Madison, USA). Resumidamente, o protocolo se iniciou com a incubação do RNA com 0,5 µg do oligonucleotídioligo-dT (Invitrogen, California, USA) por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação tampão 1 X, 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa Improm. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C (Merighe et al., 2010). Na sequência as amostras foram submetidas à reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR) e posterior análise dos fragmentos gênicos amplificados. Os níveis de expressão dos genes de interesse foram determinados por PCR-TR usando os genes cujos oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes estudados.

Gene		Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
GAPDH	Direto	5'-GGTGATGCTGGTGCTGAG-3'	AJ431207	181
	Reverso	5'-TGACAATCTTGAGGGTGTTG-3'		
GHR	Direto	5'-CGTCTCTGCTGGTGAAAACA-3'	NM_001285648	148
	Reverso	5'-AACGGGTGGATCTGGTTGTA-3'		
IGF-1R	Direto	5'-TTAAAATGGCCAGAACCTGAG-3'	XM_005694951	314
	Reverso	5'-ATTATAACCAAGCCTCCAC-3'		
IGF-1	Direto	5'-TGCTCTCCAGTTCGTGTG-3'	FJ716104	142
	Reverso	5'-CATCTCCAGCCTCCTCAG-3'		
IGFBP-3	Direto	5'-AAAGGTCATGCCAAGGACAG-3'	JQ341161	281
	Reverso	5'-TGCCCGTACTTATCCACACA-3'		
IGFBP-5	Direto	5'-TGCGAGCTGGTCAAGGAG-3'	JF720883	257
	Reverso	5'-TCCTCTGCCATCTCGGAG-3'		
BCL-2	Direto	5'-GATGACCGAGTATCTGAACCG -3'	NM_001166486	120
	Reverso	5'-GACAGCCAGGAGAAATCAAACA-3'		
BAX	Direto	5'-TCGGTCTCAACGGCTACA -3'	NM_173894	189
	Reverso	5'-CCACTCCAGCCACAAAGA -3'		

Cada gene foi amplificado em uma reação separada e cada reação foi realizada em duplicata. Cada 20 µL de reação continha 1,0 µL de cDNA das amostras; 0,4µL de primer direto e 0,4µL de primer reverso dos genes analisados: GAPDH (controle), receptor de GH (GHR), receptor de IGF-1 (IGF-1R), IGF-1, Bax, Bcl-2, IGFBP-3 e IGFBP-5; 8,2 µL de água livre de RNA e 10,0 µL de Mix Sybr Green.

Os resultados foram analisados conforme equação deSchmittgen & Livak, 2008, que possibilita a comparação das mudanças no perfil de expressão gênica da amostra de interesse em relação a um calibrador (amostra controle) e entre diferentes amostras. O número dois na base da fórmula aritmética representa que a quantidade de material genético da reação é dobrada a cada novo ciclo e o C_T se refere a ciclo threshold que é a quantidade de ciclos necessários para que a amostra atinja o limiar de detecção na fase exponencial da amplificação.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \left[\frac{(Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ controle}) \text{ amostra A}}{-(Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ controle}) \text{ amostra B}} \right]$$

Experimento 2 – *In vitro*

No 180º de lactação os animais experimentais foram tratados com ACTH ou Placebo, e neste mesmo dia foi realizada biópsia para obtenção do tecido mamário de 4 cabras de cada tratamento. Posteriormente, parte do tecido obtido da glândula mamária foi destinado para cultivo em meio básico Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture, Gibco Life (DMEM/F-12) até que as mesmas as células preenchessem o fundo da placa. As células foram coradas com azul de tripan (Trypan Blue Stain – 0,4%) e contadas pelo aparelho Countess Automated Cell Counter (Invitrogen - Waltham, -MA, USA) a fim de garantir que todo tratamento proposto tivesse uma quantidade mínima de $1,0 \times 10^5$ de células epiteliais mamária vivas. Posteriormente, as células foram dispostas em matrigel por 24 horas, para posterior inclusão de cortisol e IGF-1 no meio de cultivo, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos estipulados por amostra onde variaram os níveis de cortisol em relação às duas contrações de IGF-1: 0 ng/mL ou 100 ng/mL.

Meio SEM IGF-1 + Cortisol	Meio COM IGF-1 + Cortisol
0 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	0 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1
10 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	10 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1
100 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	100 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1
1000 µg/mL Cortisol + 0 ng/mL IGF-1	1000 µg/mL Cortisol + 100 ng/mL IGF-1

As células epiteliais permaneceram incubadas nestes meios de cultura por 5 dias (Figura 3), depois as células foram removidas da placa de cultura e centrifugadas até a formação de um pellet que foi estocado a -80°C para posterior extração de RNA, síntese de cDNA e expressão gênica (dos mesmos genes expressos no tecido) por PCR tempo real como descrito anteriormente para o *in vivo* (Tabela 1).



Figura 3. Placa de cultivo celular com os 8 tratamentos propostos por animal.

A expressão gênica de IGF-1, IGF-1R, GHR, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 das células tratadas (*in vitro*) foram realizadas e analisadas conforme descrito no experimento 1.

Análise Estatística

Experimento 1 (*in vivo*)

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando o Statistical Analysis System (SAS, 2008). Após a verificação da normalidade do resíduo para o Shapiro-Wilk PROC UNIVARIATE. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo o procedimento do MIXED do SAS, utilizando o modelo: $Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + e_{ij}$, em que, μ = média total, C = efeito aleatório das cabras ($i = 1$ para 30 cabras), B = efeito fixo para os tratamentos ACTH x Placebo, ($j = 1$) e e = erro residual. Foram considerados como efeito fixo os tratamentos (ACTH x Placebo) e como efeito aleatório os animais. Quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de menor diferença significativa, Tukey, a significância foi testada em $P \leq 0,05$.

Experimento 2 (*in vitro*)

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando o Statistical Analysis System (SAS, 2008). Após a verificação da normalidade do resíduo para o Shapiro-Wilk PROC UNIVARIATE. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo o

procedimento GLM do SAS, utilizando o modelo: $Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + e_{ij}$, em que, μ = média total, C = efeito aleatório das cabras ($i = 1$ para 8 cabras), B = efeito fixo para os tratamentos Cortisol ou IGF-1, ($j = 1$) e e = erro residual. Foram considerados como efeito fixo os tratamentos cortisol (0, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e IGF-1 (0 e 100 ng/mL) e como efeito aleatório os animais (biópsia da glândula mamária). Quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de menor diferença significativa, Tukey, a significância foi testada em $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1 – In vivo

Ao observar a produção de leite houve efeito significativo dos tratamentos propostos ($P < 0,05$), o grupo ACTH produziu mais leite aos 180 dias de lactação do que o grupo placebo, (Tabela 3). Quanto à composição físico-química (gordura, proteína, lactose, minerais e acidez (%)), análise microbiológica (Contagem Total de Bactérias, *Enterobacterias* e *Estafilococos* (UFC/mL)) e CCS (células/mL) não houve efeito dos tratamentos ACTH x Placebo ($P > 0,05$).

Tabela 3. Produção (L), composição físico-química (gordura; proteína; lactose; minerais e acidez (%)), microbiologia (PCA; MC e BPA (UFC/mL)) e CCS (cells/mL) do leite aos 180 dias de lactação

Parâmetros	Tratamentos		DPM ‡	P- valor†
	ACTH Média ± DPM	Placebo Média ± DPM		
Produção de Leite (L)	2,05 ± 0,04 ^a	1,81 ± 0,02 ^b	0,03	0,01
Gordura (%)	3,41 ± 0,05	3,37 ± 0,09	0,07	NS
Proteína (%)	3,04 ± 0,13	3,01 ± 0,10	0,01	NS
Lactose (%)	4,12 ± 0,02	4,09 ± 0,02	0,02	NS
Minerais (%)	0,62 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,01	NS
Acidez (%)	1,65 ± 0,01	1,63 ± 0,01	0,01	NS
CCS (cells/mL) *	1339,17 ± 142,77	1130,6 ± 34,54	106,74	NS
Contagem Total de Bactérias (UFC/mL)*	17,60 ± 10,02	19,92 ± 48,62	35,44	NS
<i>Enterobacterias</i> (UFC/mL)**	-	-	-	-
<i>Estafilococos</i> (UFC/mL)*	7,23 ± 3,20	52,45 ± 32,71	23,49	NS

* Valores dispostos em 10³.

**Não houve contagem suficiente para realizar análise estatística

‡ Desvio padrão da média.

† Valor da probabilidade para efeito de tratamento (ACTH e Placebo), P<0,05.

^{A-B} Médias na mesma linha, seguidas por diferente letra diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

NS: Não Significativo

Quanto à concentração plasmática de IGF-1 (ng/mL) não houve efeito de tratamentos, de tempo de coleta e interação tratamento/tempo de coleta. Contudo, houve interação significativa entre tratamento e tempo para concentração plasmática de cortisol, sendo que, 60 minutos após a aplicação de ACTH a concentração de cortisol foi significativamente superior (38,12 ng/mL) ao grupo placebo (7,62 ng/mL), porém, a concentração de cortisol voltou para níveis basais no tempo 120 minutos, perfil característico de animais submetidos a um estresse pontual (Fukasawa et al., 2008, Diaz et al., 2013), (Figura 4).

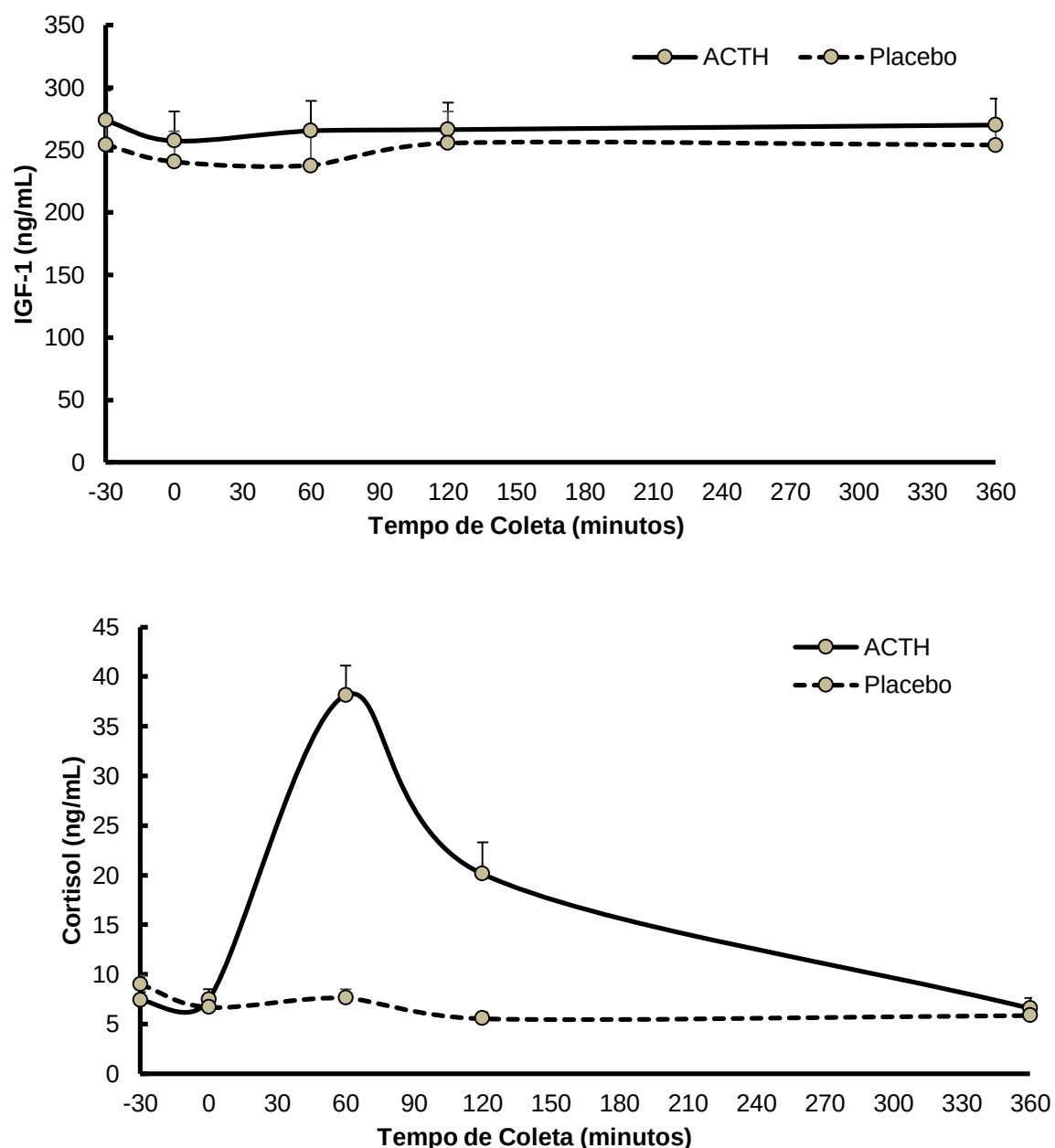


Figura 4. Concentração plasmática de IGF-1 (ng/mL) e cortisol (ng/mL) ao 180º dia de lactação em função dos tratamentos ACTH e Placebo.

Também houve efeito significativo de tratamento ao avaliar a expressão gênica de GHR no tecido da glândula mamária, sendo que houve maior expressão de GHR observada no tecido mamário das cabras do grupo ACTH, quando comparadas ao grupo placebo. Para os demais genes analisados IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2 não houve efeito dos tratamentos (ACTH x Placebo), Tabela 4.

Tabela 4. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, do tecido da glândula mamária no 180º diade lactação para os tratamentos ACTH e Placebo.

Parâmetros	Tratamentos		DPM‡	P-valor†
	ACTH	Placebo		
	Média ± DPM‡	Média ± DPM‡		
GHR	2,46 ± 0,24 ^a	1,06 ± 0,24 ^b	0,17	0,02
IGF-1	1,57 ± 0,38	0,99 ± 0,28	0,24	NS
IGF-1R	3,45 ± 0,24	2,40 ± 0,24	0,24	NS
IGFBP-3	0,82 ± 0,11	1,51 ± 0,61	0,80	NS
IGFBP-5	2,74 ± 0,41	1,43 ± 0,55	0,34	NS
Bax	1,79 ± 0,24	1,40 ± 0,25	0,17	NS
Bcl-2	1,7 ± 0,23	2,39 ± 1,03	0,63	NS

‡ Desvio padrão da média.

† Valor da probabilidade para efeito de tratamento (ACTH e Placebo), P<0,05.

^{A-B} Médias na mesma linha, seguidas por letra diferente, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

NS: Não Significativo

O percentual de proliferação (PCNA) e apoptose (TUNEL) das células epiteliais do tecido da glândula mamária não foi influenciado pelos tratamentos propostos, (Figura 5).

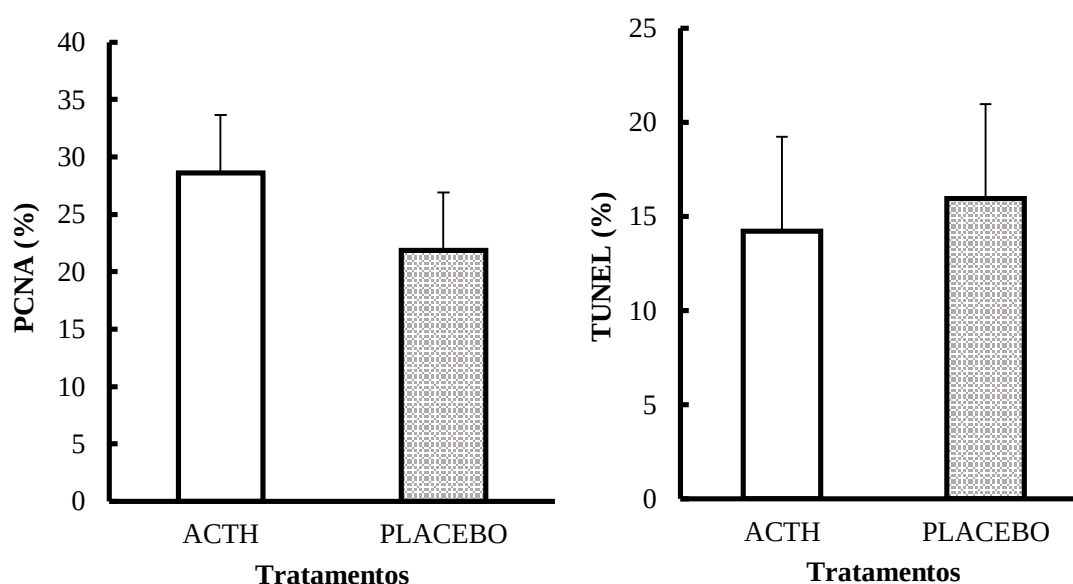


Figura 5. Percentual de proliferação (PCNA) e apoptose (TUNEL) celular da glândula mamária de cabras tratadas com ACTH ou Placebo no 180º dia de lactação.

Experimento 2 – *In vitro*

Não houve *in vitro* efeito significativo da inclusão do IGF-1 e da interação cortisol/IGF-1 sobre a expressão dos genes estudados, Tabela 5.

Tabela 5. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFBP-3, IGFBP-5, Bax e Bcl-2, de células epiteliais mamária, no 180º dia de lactação, cultivadas em meio Com ou Sem IGF-1 (0 e 100 ng/mL) no meio de cultivo.

Parâmetros	IGF-1		DPM‡	P-valor†
	0	100		
	Média ± DPM‡	Média ± DPM‡		
GHR	0,45 ± 0,07	0,39 ± 0,11	0,09	NS
IGF-1	45,90 ± 17,31	11,57 ± 6,20	11,20	NS
IGF-1R	11,14 ± 4,94	19,2 ± 10,6	7,70	NS
IGFBP-3	0,48 ± 0,05	0,56 ± 0,08	0,06	NS
IGFBP-5	34,6 ± 14,7	27,7 ± 11,3	13,00	NS
Bax	1,31 ± 0,23	1,04 ± 0,17	0,20	NS
Bcl-2	2,99 ± 0,44	2,26 ± 0,39	0,42	NS

‡ Desvio padrão da média.

† Valor da probabilidade para efeito células epiteliais cultivadas COM ou SEM IGF-1 (0 e 100 ng/mL), P<0,05.

NS: Não Significativo

Contudo, houve efeito significativo de níveis crescentes (0, 10, 100 e 1000 µg/mL) de cortisol sobre a expressão do gene Bax nas células epiteliais, sendo a maior expressão observada quando foi adicionado 1000 µg/mL de cortisol no meio de cultura. Efeito oposto foi observado para a expressão de IGF-1R, pois o aumento de concentração de cortisol diminuiu significativamente a expressão de IGF-1R, (Figura 6). As maiores expressões dos genes de Bcl-2 foram observadas nos tratamentos com 0 e 1000 µg/mL de cortisol. *In vitro*, a expressão dos genes IGF-1, IGFBP-3 e IGFBP-5 não se alterou com os tratamentos propostos, (Tabela 6).

Tabela 6. Expressão relativa de RNAm dos genes GHR; IGF-1; IGF-1R; IGFBP-3; IGFBP-5; Bax e Bcl-2, de células epiteliais mamárias, em meio de cultivo, ao 180º dia de lactação para níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 µg/mL).

	Cortisol (µg/mL)				DPM‡	P-valor †
	0	10	100	1000		
	Média ± DPM‡	Média ± DPM‡	Média ± DPM‡	Média ± DPM‡		
GHR	0,41 ± 0,19 ^{ab}	0,29 ± 0,07 ^b	0,29 ± 0,05 ^b	0,78 ± 0,17 ^a	0,13	0,03
IGF-1	26,3 ± 18,7	18,6 ± 12,1	9,84 ± 7,06	5,93 ± 2,82	10,17	NS
IGF-1R	26,33 ± 18,67 ^a	18,58 ± 12,09 ^a	9,84 ± 7,06 ^{ab}	5,93 ± 2,82 ^b	11,75	0,05
IGFBP-3	0,33 ± 0,05	0,65 ± 0,11	0,63 ± 0,12	0,47 ± 0,01	0,09	NS
IGFBP-5	27,5 ± 16,6	23,4 ± 13,5	23,8 ± 13,0	50,0 ± 27,6	17,69	NS
Bax	0,99 ± 0,13 ^b	0,59 ± 0,14 ^b	0,68 ± 0,13 ^b	2,42 ± 0,39 ^a	0,22	0,01
Bcl-2	3,58 ± 0,57 ^a	1,28 ± 0,39 ^b	1,49 ± 0,27 ^b	4,18 ± 0,73 ^a	0,52	0,01

‡ Desvio padrão da média.

† Valor da probabilidade para efeito de tratamento (ACTH e Placebo), P<0,05.

^{A-B} Médias na mesma linha, seguidas por letra diferente, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

NS: Não Significativo.

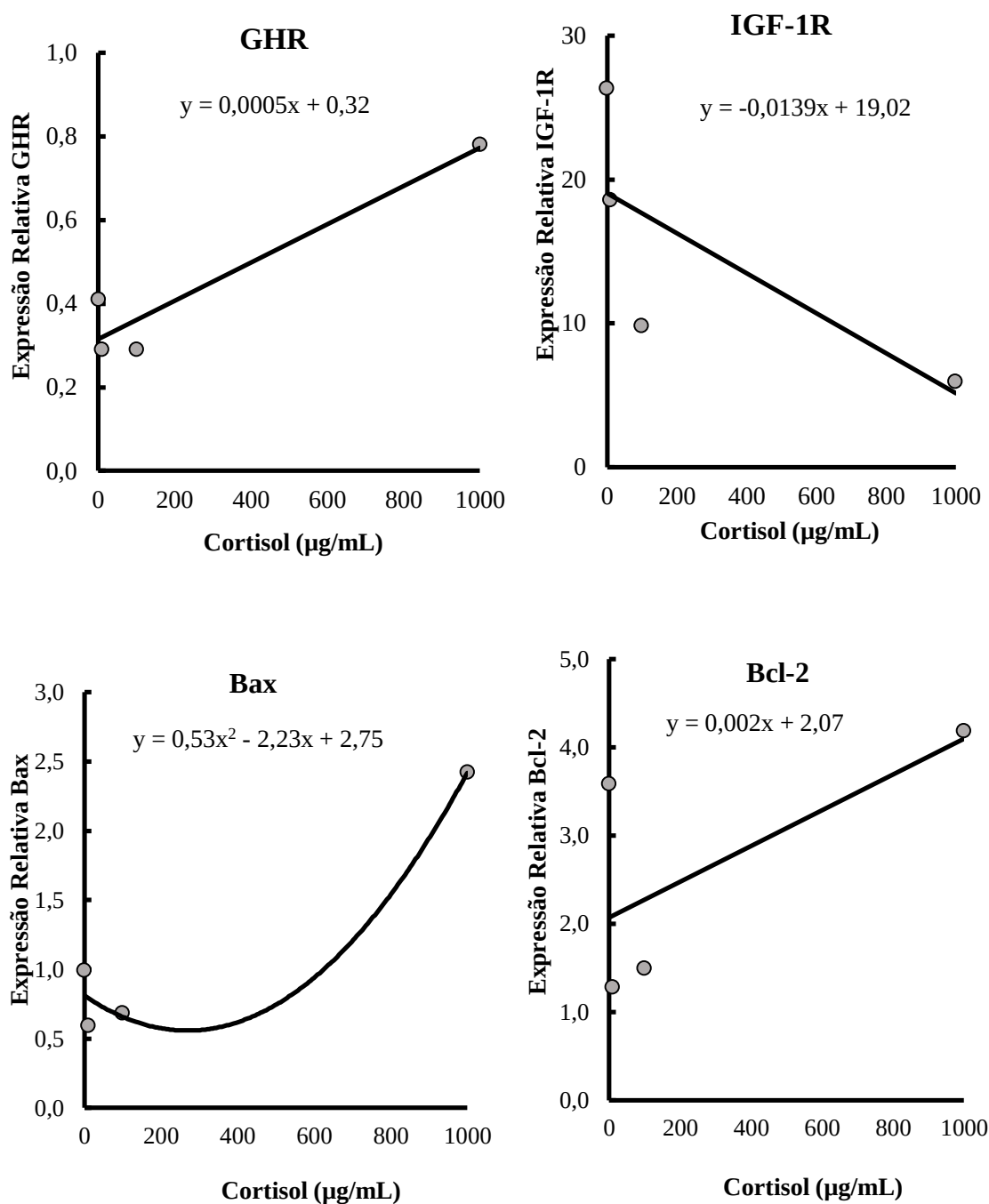


Figura 6. Expressão relativa de RNAm dos genes (GHR, IGF-1R, Bax e Bcl-2) em função dos níveis crescentes de cortisol (0, 10, 100 e 1000 µg/mL) nas células epiteliais mamárias no 180º dia de lactação. Diferentes letras, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

No experimento *in vivo* houve efeito da administração de ACTH x Placebo sobre a produção de leite, neste caso as cabras submetidas ao tratamento ACTH produziram mais leite que aquelas submetidas ao tratamento placebo. Este aumento pode ser explicado pela maior

expressão do gene GHR, pois o GH modula o metabolismo das células epiteliais mamárias (Plath-Gabler et al., 2001) e induz o aumento produção de leite *in vivo* através do aumento da disponibilidade de nutrientes para síntese de leite (Etherton & Bauman, 1998, Rose et al., 1998, Sakamoto et al., 2007). Porém, não houve efeito *in vivo* dos tratamentos ACTH e Placebo sobre as taxas de proliferação celular e apoptose, o que demonstra que, aumentos pontuais de cortisol não afetam negativamente as células epiteliais (Sevi, 2009, Hamzaoui et al., 2013). Possivelmente diferentes resultados poderiam ser encontrados caso os animais fossem submetidos a um estresse crônico (Mormede et al., 2007).

Ao avaliar os dados do experimento *in vitro* (quando as concentrações de cortisol foram mantidas durante os 5 dias de cultura) observasse que não houve efeito da adição de IGF-1 (100 ng/mL) no meio de cultivo das células epiteliais sobre a expressão dos genes estudados. Porém, *in vitro* houve efeito significativo dos níveis crescentes de cortisol nas células epiteliais, sendo que houve maior expressão de GHR ao adicionar 1000 µg/mL. Também *in vitro* foi observado efeito inverso para a expressão de IGF-1R, ou seja, quanto maior a concentração de cortisol menor a expressão de IGF-1R. O aumento de GHR nos altos níveis de cortisol pode se associar com a sobrevivência das células, inibição da apoptose e persistência da lactação, ações essas mediadas pelo GH (Capuco et al., 2001, Sakamoto et al., 2007).

Este resultado foi contrário à nossa hipótese inicial que postulava que o estresse causaria, via cortisol, apoptose das células epiteliais mamárias. Em contrapartida, o declínio da expressão de IGF-1R em função do aumento de cortisol também observada no estudo *in vitro*, indica que o cortisol pode acarretar em aumento da apoptose, queda na função secretória do alvéolo e aumento na atividade oxidativa (Baumrucker & Erondy, 2000, Green & Streuli, 2004, Collier et al., 2012). Estes efeitos opostos do cortisol sobre a expressão de GHR

e IGF-I, explicam por que neste estudo não houve efeito dos tratamentos propostos sobre as taxas de proliferação e apoptose.

Também houve efeito dos níveis crescentes de cortisol sobre a expressão de Bax. Assim a melhor relação Bax/Bcl-2 ocorreu no tratamento 0 µg/mL de cortisol, porém houve aumento significativo de Bax com a adição de 1000 µg/mL de cortisol. Esta mudança de relação entre Bax e Bcl2 é um indicativo do início da involução da glândula mamária (Kaufmann & Hengartner, 2001, Green & Streuli, 2004, Singh et al., 2015). Este resultado isoladamente sugere que o cortisol, pode em final de lactação, pode estimular a apoptose das células epiteliais mamárias.

A maior concentração de cortisol *in vivo* provocou aumento na expressão dos genes GHR nas células epiteliais o que sugere um aumento no metabolismo das células epiteliais e justifica a maior produção de leite dos animais submetidos ao tratamento ACTH (Neuenschwander et al., 1996, Murney et al., 2015). Do mesmo modo, os níveis crescentes de cortisol *in vitro* aumentaram significativamente a expressão de GHR e Bax e diminuíram significativamente a expressão de IGF-1R. Alterações semelhantes, também foram observadas em estudos que caracterizaram a apoptose das células epiteliais e involução da glândula mamária (Heermeier et al., 1996, Tonner et al., 2002, Zarzynska & Motyl, 2008).

As variações de expressão dos genes GHR, IGF-1R e Bax mensuradas no presente estudo sugerem que o cortisol promove respostas celulares opostas, pois a inclusão de 1000 µg/mL de cortisol no meio de cultivo houve aumento a expressão gênica de GHR e Bax, que são indicadores das alterações celulares que desencadeiam proliferação e apoptose nas células epiteliais mamárias. Simultaneamente, a maior concentração de cortisol causou uma redução na expressão de IGF-1R nas mesmas condições, como no presente estudo o IGF-1 não está

sendo expresso, este hormônio não desempenhou o seu papel de “protetor” da célula epitelial como postulado inicialmente no presente estudo.

Deste modo, os resultados do presente estudo sugerem que no final da lactação a administração de ACTH *in vivo* aumentou significativamente a expressão de GHR e a produção de leite, provavelmente devido ao aumento do metabolismo das células epiteliais. Contudo, o aumento da concentração de cortisol *in vitro* aumentou a expressão de GHR e Bax, mas reduziu a expressão de IGF-1R nas células mamárias causando respostas celulares opostas que não modificaram as taxas de proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias.

REFERÊNCIAS

- Accorsi, P. A., B. Pacioni, C. Pezzi, M. Forni, D. J. Flint, and E. Seren. 2002. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 85(3):507-513.
- Baumrucker, C. R. and N. E. Erondy. 2000. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 5(1):53-64.
- Capuco, A. V., S. E. Ellis, S. A. Hale, E. Long, R. A. Erdman, X. Zhao, and M. J. Paape. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81:18-31.
- Capuco, A. V., D. L. Wood, R. Baldwin, K. McLeod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84(10):2177-2187.
- Collier, R. J., E. L. Annen-Dawson, and A. Pezeshki. 2012. Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health. *Animal* 6(3):403-414.
- Diaz, J. R., M. Alejandro, G. Romero, F. Moya, and C. Peris. 2013. Variation in milk cortisol during lactation in Murciano-Granadina goats. *J. Dairy Sci.* 96(2):897-905.
- Etherton, T. D. and D. E. Bauman. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 78(3):745-761.
- Flint, D. J. and C. H. Knight. 1997. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 2(1):41-48.
- Flint, D. J., E. Tonner, and G. J. Allan. 2000. Insulin-like growth factor binding proteins: IGF-dependent and -independent effects in the mammary gland. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 5(1):65-73.

- Fukasawa, M., H. Tsukada, T. Kosako, and A. Yamada. 2008. Effect of lactation stage, season and parity on milk cortisol concentration in Holstein cows. *Livest. Sci.* 113(2-3):280-284.
- Gibson, C. A., M. D. Staley, and C. R. Baumrucker. 1999. Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells. *J. Anim. Sci.* 77(6):1547-1557.
- Green, K. A. and C. H. Streuli. 2004. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell. Molec. Life Sci.* 61(15):1867-1883.
- Hamzaoui, S., A. A. K. Salama, E. Albanell, X. Such, and G. Caja. 2013. Physiological responses and lactational performances of late-lactation dairy goats under heat stress conditions. *J. Dairy Sci.* 96(10):6355-6365.
- Heermeier, K., M. Benedict, M. L. Li, P. Furth, G. Nunez, and L. Henninghausen. 1996. Bax and Bcl-x(S) are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells. *Mechan. Develop.* 56(1-2):197-207.
- Hurley, W. L. 1989. Mammary-gland function during involution. *J. Dairy Sci.* 72(6):1637-1646.
- Imai, Y., A. Moralez, U. Andag, J. B. Clarke, W. H. Busby, and D. R. Clemmons. 2000. Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and-5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions. *J. Biolog. Chemist.* 275(24):18188-18194.
- Jones, J. I. and D. R. Clemmons. 1995. Insulin-like growth-factors and their binding-proteins - biological actions. *Endoc. Rev.* 16(1):3-34.
- Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trend. Cell Biol.* 11(12):526-534.
- Merighe, G. K. F., M. D. Miranda, T. H. C. de Bem, Y. F. Watanabe, and F. V. Meirelles. 2010. Effect of culture time and gender of nuclei donor cells on bovine development produced by nuclear transfer. *Rev. Brasil. Zoot.-Brazil. J. Anim. Sci.* 39(10):2166-2173.
- Mormede, P., S. Andanson, B. Auperin, B. Beerda, D. Guemene, J. Malmkvist, X. Manteca, G. Manteuffel, P. Prunet, C. G. van Reenen, S. Richard, and I. Veissier. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Phys. Behav.* 92(3):317-339.
- Murney, R., K. Stelwagen, T. T. Wheeler, J. K. Margerison, and K. Singh. 2015. The effects of milking frequency on insulin-like growth factor I signaling within the mammary gland of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(8):5422-5428.
- Neuenschwander, S., A. Schwartz, T. L. Wood, C. T. Roberts, L. Henninghausen, and D. LeRoith. 1996. Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in a transgenic mouse model. *J. Clinical Investig.* 97(10):2225-2232.
- NRC. 2007. Nutrients requirements of small ruminant: sheep, goats, cervids and new world camelids Washington, D.C.
- Plath-Gabler, A., C. Gabler, F. Sinowatz, B. Berisha, and D. Schams. 2001. The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.* 168(1):39-48.

- Ricort, J. M. and M. Binoux. 2001. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits type 1 IGF receptor activation independently of its IGF binding affinity. *Endocrinol.* 142(1):108-113.
- Rose, M. T., F. Itoh, M. Matsumoto, Y. Takahashi, and Y. Obara. 1998. Insulin-independent glucose uptake in growth hormone treated dairy cows. *J. Dairy Res.* 65(3):423-431.
- Sakamoto, K., T. Yano, T. Kobayashi, A. Hagino, H. Aso, and Y. Obara. 2007. Growth hormone suppresses the expression of IGFBP-5, and promotes the IGF-I-induced phosphorylation of Akt in bovine mammary epithelial cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 32(4):260-272.
- SAS. 2008. Statistics Version 9.2. SAS Inst., Inc., Cary, NC.CD-ROM.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protoc.* 3(6):1101-1108.
- Sevi, A. 2009. Animal-based measures for welfare assessment. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:904-911.
- Sharpe, J. C., D. Arnoult, and R. J. Youle. 2004. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Bioch. Bioph. Acta-Mol. Cell Res.* 1644(2-3):107-113.
- Singh, K., K. M. Swanson, H. V. Henderson, R. A. Erdman, and K. Stelwagen. 2015. The effect of milking reinitiation following extended nonmilking periods on lactation in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(11):7666-7674.
- Tonner, E., M. C. Barber, G. J. Allan, J. Beattie, J. Webster, C. B. A. Whitelaw, and D. J. Flint. 2002. Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) induces premature cell death in the mammary glands of transgenic mice. *Develop.* 129(19):4547-4557.
- Valentijn, A. J. and A. P. Gilmore. 2004. Translocation of full-length bid to mitochondria during anoikis. *J. Biolog. Chem.* 279(31):32848-32857.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. *Cell* 96(2):245-254.
- Zarzynska, J. and T. Motyl. 2008. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *J. Phys. Pharmac.* 59:275-288.