

**Eveline Dias Leite**

**PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E HISTOMORFOMETRIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA  
DE RATAS TRATADAS COM TIROXINA DURANTE A GESTAÇÃO, LACTAÇÃO E  
APÓS O DESMAME ASSOCIADO AO DESENVOLVIMENTO DOS FILHOTES**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Veterinária

Área: Clínica e Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientador: Prof. Giovanni Dantas Cassali

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária



Dissertação defendida e aprovada em 22/02/2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

---

Prof.<sup>a</sup> Rogéria Serakides  
Orientadora

---

Prof. Giovanni Dantas Cassali

---

José Carlos Nogueira



Ao meu companheiro Rômulo,

por seu amor, paciência, incentivo e por tornar tudo sempre mais fácil.

Aos meus queridos pais, Heledir e Pedro,

pelo apoio incondicional, carinho e exemplo de vida. Vocês, mesmo distantes, fizeram-se presentes todo o tempo.

Muito Obrigada!



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e pelas pessoas maravilhosas que conheci.

À Prof<sup>a</sup> Rogéria Serakides, pela oportunidade e pelos ensinamentos. Pela paciência e dedicação com que me orientou e por ser prova viva de que, conhecimento e inteligência são virtudes que podem coexistir com a simplicidade.

Ao prof Geovanni Dantas Cassali pela co-orientação, pelos valiosos ensinamentos, pela prontidão em ajudar e pelas oportunas sugestões.

Ao amigo Edmilson por ter compartilhado comigo todo o mestrado e todas as noites, manhãs, feriados e finais de semana do experimento. Muito obrigada pela ajuda incondicional, amizade e risadas.

Aos meus queridos avós pelo carinho e alegria a cada encontro.

As minhas queridas irmãs Edimara, Érika e Hélia pela amizade, risadas e conselhos.

Aos professores do Setor de Patologia, Ernane Fagundes do Nascimento, Renato de Lima Santos, Roberto Maurício Carvalho Guedes e Roselene Ecco pelos ensinamentos.

As “irmãs” Natália de Melo Ocarino e Cíntia de Almeida Souza pela disposição em ajudar e por me mostrarem, a todo o momento, que poderia contar com vocês.

Aos “irmãos” Carol, Lauana, Cris, Renato, Fernanda, Vitor pela agradável convivência.

As amigas Natalie, Silke, tia Jú, Margareth e Nina pela companhia e alegres noites de bate-papo, amenizando assim, a saudade de casa.

Aos “primos” do Setor de Patologia Sílvia, Tatiane, Alcina, Carol e Fabiana pelo alegre convívio e pelas sugestões.

As técnicas do Laboratório Marilene e Mel, sempre tão amigas e prontas a ajudar.

Ao Ênio, pela paciência em explicar, várias vezes, como calibrar o phmetro e pela ajuda incondicional nas tardes de imunoistoquímica, e a Mariana, pela companhia, boas risadas e ajuda.

Aos professores Maristela, Ivan Sampaio e Martinho pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos animais que participaram deste experimento, minha eterna gratidão.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a PRPq/UFMG pelo auxílio financeiro dispensado à realização deste projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
3.1. Morfofisiologia da glândula mamária.....	15
3.1.1 Desenvolvimento da Glândula mamária.....	18
3.1.1.1 Pré-puberdade.....	19
3.1.1.2 Puberdade.....	19
3.1.1.3 Gestação.....	20
3.1.1.4 Lactação.....	21
3.1.1.5 Involução.....	22
3.2 Hormônios que afetam a atividade da glândula mamária.....	24
3.2.1 Estrógeno.....	24
3.2.2 Progesterona.....	24
3.2.3 Prolactina.....	25
3.2.4 Hormônio do crescimento (GH).....	26
3.2.5 Fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) e proteínas ligadoras dos fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFBPs).....	27
3.2.6 Hormônios Tireoidianos.....	28
3.2.7 Corticosteróides.....	30
3.2.8. Insulina.....	30
3.2.9. Ocitocina.....	30
3.2.10. Lactogênios placentários.....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Experimento 1.....	31
4.2. Experimento 2.....	32
4.3 Procedimentos comuns aos dois experimentos.....	33
<b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	
5.1. Experimento 1	
5.1.1. Histomorfometria da tireóide e consumo de água e ração.....	36
5.1.2. Histomorfometria da glândula mamária.....	38
5.1.3. Proliferação celular e apoptose no epitélio mamário.....	39
5.1.4. Quantificação do número de mastócitos.....	44
5.2. Experimento 2	
5.2.1. Morfofisiologia da tireóide e consumo de água e ração.....	45
5.2.2. Histomorfometria da glândula mamária.....	52
5.2.3. Proliferação celular e apoptose no tecido mamário.....	53
5.2.4. Quantificação do número de mastócitos.....	53
5.2.5. Comportamento Materno.....	54
5.2.6. Desenvolvimento dos Filhotes.....	60
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65
<b>8. ANEXOS</b>	
8.1 Anexos do experimento 1.....	70
8.2 Anexos do experimento 2.....	74

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Altura do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ ) das tireóides de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.....	37
<b>Gráfico 2.</b> Média do consumo diário individual de ração (g) nos grupos controle e tratado com tiroxina antes e durante a gestação.....	37
<b>Gráfico 3.</b> Média do consumo diário individual de água (ml) nos grupos controle e tratado com tiroxina antes e durante a gestação.....	37
<b>Gráfico 4.</b> Porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.....	42
<b>Gráfico 5.</b> Porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.....	42
<b>Gráfico 6.</b> Porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.....	42
<b>Gráfico 7.</b> Porcentagem de estroma na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.....	43
<b>Gráfico 8.</b> Número médio de células epiteliais/campo com expressão de CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do tratado tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação...	43
<b>Gráfico 9.</b> Número médio de células epiteliais/campo com expressão de caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do tratado tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação...	44
<b>Gráfico 10.</b> Altura média do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ ) das tireóides de ratas do grupo controle e do grupo tratado tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	50
<b>Gráfico 11.</b> Altura média do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ ) das tireóides de ratas não gestantes não tratadas e tratadas com tiroxina.....	50
<b>Gráfico 12.</b> Concentração plasmática de T4 total ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) das ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	50
<b>Gráfico 13.</b> Concentração plasmática de T4 livre (nanog/dl) das ratas dos grupos não gestantes tratado com tiroxina e não tratado.....	51
<b>Gráfico 14.</b> Consumo diário individual de água (ml) das ratas do grupo tratado com tiroxina e do grupo controle antes e durante a gestação.....	51
<b>Gráfico 15.</b> Consumo diário individual de ração (g) das ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina e do grupo controle antes e durante a gestação.....	51
<b>Gráfico 16.</b> Porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	56
<b>Gráfico 17.</b> Porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	56
<b>Gráfico 18.</b> Porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	56
<b>Gráfico 19.</b> Porcentagem de estroma na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	57
<b>Gráfico 20.</b> Número médio de células epiteliais/campo com expressão de CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	57
<b>Gráfico 21.</b> Número médio de células epiteliais/campo com expressão de caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo controle e tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia desmame.....	57
<b>Gráfico 22.</b> Peso médio (g) ajustado dos filhotes machos e fêmeas de mães do grupo controle e tratado com tiroxina do 1º ao 21º dia de idade.....	63
<b>Gráfico 23.</b> Idade média (dias) de abertura dos olhos dos filhotes de mães controle e tratadas com tiroxina.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número médio de mastócitos/campo na glândula mamária de ratas gestantes do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.....	45
<b>Tabela 2.</b> Coeficiente de correlação entre o número de mastócitos da glândula mamária de ratas gestantes e a porcentagem de epitélio e conjuntivo.....	46
<b>Tabela 3:</b> Número médio de mastócitos/campo na glândula mamária de ratas gestantes do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.....	60
<b>Tabela 4.</b> Coeficiente de correlação entre o número de mastócitos na glândula mamária de ratas gestantes e a porcentagem de epitélio e de estroma durante e após a lactação.....	60
<b>Tabela 5.</b> Avaliação das mães tratadas ou não com tiroxina quanto a higienização dos filhotes.....	62
<b>Tabela 6.</b> Avaliação das mães tratadas ou não com tiroxina quanto ao aquecimento dos filhotes.....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Rata gestante, colheita dos pares da glândula mamária abdominal caudal e inguinal. B) Fragmento dos pares da glândula mamária abdominal caudal e inguinal colhido de rata gestante.....	34
<b>Figura 2.</b> Filhote de rata. Sexagem de filhotes, no dia do nascimento. A) Filhote fêmea, vulva próxima ao ânus. B) Filhote macho, genitália protuberante e mais distante do ânus, quando comparada à fêmea.....	34
<b>Figura 3.</b> Figura 3. Tireóide das ratas do experimento 1. HE, 309,86×. A) Grupo controle, folículos redondos ou ovais e revestidos por epitélio cuboidal. B) Grupo tratado com tiroxina, folículos ovais, grandes, preenchidos por grande quantidade de colóide e revestidos por epitélio pavimentoso.....	40
<b>Figura 4.</b> Glândula mamária de ratas, no 7º dia de gestação, experimento 1. HE, 117×. A) Grupo controle, ninhos de células epiteliais envoltos por grande quantidade de tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina, ninhos de células epiteliais envoltos por grande quantidade de tecido adiposo.....	40
<b>Figura 5.</b> Glândula mamária de ratas, no 14º dia de gestação, experimento 1. HE, 119,28×. A) Grupo controle, ninhos de células epiteliais envoltos por grande quantidade de tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina, ninhos de células epiteliais envoltos por pequena quantidade de tecido adiposo.....	41
<b>Figura 6.</b> Glândula mamária de ratas, no 19º dia de gestação, experimento 1. HE, 130×. A) Grupo controle, supremacia de epitélio em relação ao tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina com maior porcentagem de epitélio em relação ao grupo controle.....	41
<b>Figura 7.</b> Glândula mamária de ratas, no 7º dia de gestação, experimento 1. Imunomarcção para CDC-47, estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 607,86×. As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle. B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.....	47
<b>Figura 8.</b> Glândula mamária de ratas, no 14º dia de gestação, experimento 1. Imunomarcção para CDC-47, estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 580×. As células marcadas pelo anticorpo CDC 47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle. B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.....	47
<b>Figura 9.</b> Glândula mamária de ratas, no 19º dia de gestação, experimento 1. Imunomarcção para CDC-47, estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 583,57×. As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle. B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.....	48
<b>Figura 10.</b> Glândula mamária de ratas, experimento 1, Giemsa, 249,43×. A) Grupo controle, 7 dias de gestação, grande número de mastócitos/campo (setas). B) Grupo controle, 19 dias de gestação, pequeno número de mastócitos/campo (setas).....	48

<b>Figura 11.</b> Figura 11. Tireóide das ratas lactantes do experimento 2. HE, 312,43×. A) Grupo controle, folículos redondos ou ovais, revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso. B) Grupo tratado com tiroxina, folículos redondos ou ovais, revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso.....	49
<b>Figura 12.</b> Tireóide das ratas não gestantes do experimento 2. HE, 312,86× A) Grupo não tratado, folículos redondos ou ovais, de tamanhos variados e revestidos por epitélio cuboidal. B) Grupo tratado com tiroxina, folículos ovais, grandes, preenchidos por grande quantidade de colóide e revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso.....	49
<b>Figura 13.</b> Glândula mamária de ratas, 2° dia de lactação, experimento 2. HE, 257,71×. A) Grupo controle, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso. B) Grupo tratado com tiroxina, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso semelhante ao grupo controle.....	55
<b>Figura 14.</b> Glândula mamária de ratas, 21° dia de lactação, experimento 2. HE, 249,43×. A) Grupo controle, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso. B) Grupo tratado com tiroxina, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso semelhante ao grupo controle.....	55
<b>Figura 15.</b> Glândula mamária de ratas, 5° dia de desmame, experimento 2. Tricrômio de Masson, 259,14×. A) Grupo controle, alvéolos distribuem-se desorganizadamente, lúmens alveolares com secreção láctea e pequena quantidade de tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina, alvéolos distribuem-se desorganizadamente, lúmens alveolares com secreção láctea e moderada quantidade de tecido adiposo entremeado aos alvéolos.....	58
<b>Figura 16.</b> Glândula mamária de ratas, no 2° dia de gestação, experimento 2. Imunomarcação para CDC-47, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 615,71×. As células marcadas pelo anticorpo CDC 47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle, B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.....	58
<b>Figura 17.</b> Glândula mamária de ratas, no 21° dia de gestação, experimento 2. Imunomarcação para CDC-47, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 607,86×. As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle, B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.....	59
<b>Figura 18.</b> Glândula mamária de ratas, no 5° dia de desmame, experimento 2. Imunomarcação para CDC-47, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 587,14×. As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle, B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.....	59
<b>Figura 19.</b> Glândula mamária de ratas, no 5° dia de desmame, experimento 2. Imunomarcação para caspase-3, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 583,57×. As células marcadas pelo anticorpo anti-caspase 3 apresentam o núcleo e o citoplasma com coloração amarronzada (setas). A) Grupo controle, pequeno número de células marcadas. B) Grupo tratado com tiroxina, grande número de células marcadas.....	61
<b>Figura 20.</b> Glândula mamária de ratas, experimento 2. Giemsa, 615,71×. A) Grupo controle, 2° dia de lactação, pequeno número de mastócitos/campo (setas). B) Grupo controle, 5° dia de desmame, grande número de mastócitos/campo (setas).....	61

## RESUMO

Em dois experimentos distintos foi estudado o efeito da administração de tiroxina na glândula mamária de ratas Wistar durante a gestação, lactação e após o desmame. Também foram estudados o comportamento materno e o desenvolvimento dos filhotes de ratas tratadas com tiroxina durante o período de amamentação. Em cada experimento foram utilizadas 36 ratas adultas distribuídas em dois grupos, tratado e controle. Após 60 dias do início do tratamento com tiroxina na água de beber, as ratas foram acasaladas, sendo a cópula confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. No primeiro experimento, seis animais/grupo foram sacrificados com sete, 14 e 19 dias de gestação. No segundo experimento, seis animais/grupo foram sacrificados no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame. Durante a gestação, o tratamento com tiroxina acelerou significativamente o desenvolvimento da glândula mamária, mas sem alterar a taxa de proliferação e de apoptose das células epiteliais. Durante a lactação, o tratamento com tiroxina não alterou as características histomorfométricas, o índice de proliferação e a taxa de apoptose da glândula mamária. Mas no quinto dia de involução da glândula, o tratamento com tiroxina aumentou a taxa de apoptose. As mães tratadas com tiroxina apresentaram comportamento alterado no que se refere aos cuidados com a prole, principalmente quanto a higienização e aquecimento dos filhotes. Mas isso não impossibilitou que os seus filhotes desenvolvessem. O peso médio e a idade de abertura dos olhos dos filhotes das mães tratadas com tiroxina, durante todo o período de amamentação foram semelhantes aos dos filhotes de mães não tratadas. Conclui-se que a administração de tiroxina acelera o desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação por estimular a diferenciação do epitélio mamário e que não altera a glândula mamária nem o desenvolvimento dos filhotes durante a lactação, mas acelera o processo de involução da glândula após o desmame.

Palavras-Chaves: glândula mamária, tiroxina, gestação, lactação, desmame, ratas

## ABSTRACT

In two different experiments it was studied the effect of the usage of thyroxine in the mammary gland of rats Wistar during the pregnancy, lactation and after the removal of the litter. It has also been studied the mother's behavior and the development of the rats nestling treated with thyroxine during the lactation period. In each experiment were used 36 rats in adult age divided in two groups, treated and control. After 60 days from the beginning of the treatment with thyroxine in the drinking water, the rats were coupled, and the intercourse was confirmed by the presence of spermatozoa in the vaginal smear. In the first experiment, six animals/group were sacrificed on the seventh, 14<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> day of pregnancy. In the second experiment, six animals/group were sacrificed on the second and 21<sup>st</sup> day of lactation and on the 5<sup>th</sup> day after the removal of the litter. During the pregnancy, the treatment with thyroxine accelerated the development of the mammary gland significantly, although without altering the proliferation and apoptosis of the epithelial cells rates. During the lactation, the treatment with thyroxine has not changed the histomorfometric characteristics, the proliferation index and the mammary gland apoptosis rate. However on the fifth day of the gland's involution, the treatment with thyroxine increased the apoptosis rate. The mothers treated with thyroxine presented behavior changed concerning the offspring's care, especially about the cleaning and heating of the nestling. Although it has not disabled the nestling to grow. The average weight and the age of the eyes opening of the nestling from the mothers treated with thyroxine, during all the breast-feeding period were similar to those of the nestling from non treated mothers. We conclude that the usage of thyroxine accelerates the development of the mammary gland during the pregnancy because it stimulates the mammary epithelial differentiation and it does not change the mammary gland nor the development of the nestling during the lactation, but it accelerates the involution process of the gland after the wean.

Key words: mammary gland, thyroxine, pregnancy, lactation, wean, rats.

## 1. INTRODUÇÃO

A proliferação e a diferenciação do epitélio mamário, durante a puberdade, gestação e lactação, estão sob o controle de vários hormônios, sendo os principais, o estrógeno, a progesterona, a prolactina (PRL), o hormônio do crescimento (GH), a insulina, os hormônios tireoidianos, os glicocorticóides, a ocitocina e uma variedade de fatores de crescimento semelhante à insulina (Thordarson et al., 1992; Varas et al., 2002).

Nas fêmeas púberes não gestantes, a população de células epiteliais é minoria na glândula mamária, sendo esta constituída predominantemente por tecido adiposo. A gestação induz o desenvolvimento epitelial associado à redução do tecido adiposo. Durante a lactação, a maior parte da glândula mamária é representada pelos ácinos secretórios, havendo hipertrofia das células epiteliais e distensão dos alvéolos pelo acúmulo de secreção látea. Após o desmame, a glândula mamária involui, o epitélio secretório sofre apoptose e o tecido adiposo reassume como o principal constituinte da glândula (Varas et al., 2002).

Os hormônios tireoidianos além de participarem do desenvolvimento da glândula mamária, aumentam a síntese e a secreção de algumas proteínas do leite, como a alfa-lactoalbumina (Ramos et al., 2000). Além disso, para que os principais hormônios galactopoéticos, tais como o GH e a PRL, atuem nesta glândula, é essencial a participação dos hormônios tireoidianos. Por isso, o GH e a PRL aumentam a atividade da 5' desiodinase na glândula mamária, enzima que converte a tiroxina (T4) em triiodotironina (T3), forma

metabolicamente ativa do hormônio tireoidiano (Griffith e Turner, 1961; Kumaresan e Turner, 1965; Capuco et al., 1999).

Duas em cada 1000 mulheres apresentam algum grau de hipertireoidismo (Varas et al., 2002). Nos gatos, essa é a endocrinopatia mais comum (Watson et al., 2005), acometendo cerca de 2,1% da população felina. Os efeitos do hipertireoidismo são amplamente conhecidos em vários sistemas (Trivalle et al., 1996), mas a literatura ainda é controversa e incompleta quanto ao efeito da tiroxina na glândula mamária, na habilidade materna e no desenvolvimento dos filhotes de mães tratadas com tiroxina. Além do mais, estudar o mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos nos diversos estados funcionais da glândula mamária é relevante, visto a importância que se tem dado, atualmente, para a participação dos hormônios tireoidianos no desenvolvimento de determinados tumores, particularmente para o câncer de mama.

O hipertireoidismo acelera o desenvolvimento da glândula mamária e a lactogênese (Rosato et al., 1992; Rosato et al., 2002) e promove involução mamária precoce (Varas et al., 2002). Na glândula mamária, há maior expressão dos receptores para os fatores de crescimento e suas proteínas no estado hipertireóide (Rosato et al., 2002). Eles ativam a mitose, mediando a mamogênese, e inibindo a involução mamária, pela proteção das células epiteliais contra apoptose. No hipertireoidismo, o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) encontra-se diminuído e os níveis de IGFBP-5, proteína ligadora do fator de crescimento semelhante à insulina, que

estimula a involução da glândula mamária, encontram-se elevados durante a lactação, sendo estas alterações responsáveis pela involução mamária precoce (Rosato et al., 2002; Varas et al., 2002). No entanto, postula-se que apesar da taxa de apoptose na glândula mamária ser mais elevada no hipertireoidismo, a taxa de proliferação também seria. Assim, a fim de verificar se há realmente precocidade na involução da glândula mamária, o melhor seria o estudo concomitante não somente da taxa de apoptose quanto também da taxa de proliferação celular, um dos principais objetivos deste estudo.

O efeito do hipertireoidismo na habilidade materna tem sido divergente. Há estudos que demonstram que mães hipertireóideas apresentam inadequada habilidade materna (Rosato et al., 1992), enquanto outros demonstram o contrário (Varas et al., 2002). Um fato que pode ter contribuído para tal divergência é a dose de tiroxina utilizada. No experimento de Rosato et al. (1992) a dose foi dez vezes maior que a dose de tiroxina utilizada por Varas et al. (2002), e suficiente para provocar a morte dos filhotes. Além do mais, a heterogeneidade nos critérios adotados para caracterizar a habilidade materna também contribui para a diversidade de resultados. Um dos objetivos deste experimento é avaliar a habilidade materna e o desenvolvimento dos filhotes, não somente pelo comportamento materno e fetal, mas também pelo peso do filhote, considerando-se o sexo, à semelhança do que é realizado nos ensaios que estudam habilidade materna em animais de produção.

## **2. OBJETIVOS**

Estudar as alterações histomorfométricas e verificar a taxa de proliferação e apoptose da glândula mamária de ratas tratadas com tiroxina durante a gestação, a lactação e no quinto dia de involução.

Quantificar o número de mastócitos na glândula mamária de ratas tratadas com tiroxina durante a gestação, a lactação e no quinto dia de involução e correlacionar com a porcentagem de tecido epitelial e de estroma.

Verificar a habilidade materna e o desenvolvimento dos filhotes, durante o período de amamentação, de ratas tratadas com tiroxina.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Morfofisiologia da glândula mamária**

A sobrevivência dos filhotes de mamíferos depende da capacidade da mãe de sintetizar e secretar o leite. O aleitamento adequado fornece não apenas nutrientes para o crescimento e o desenvolvimento dos recém-nascidos, mas também, em algumas espécies, incluindo as ratas, substâncias importantes na defesa dos animais, como os anticorpos (Kuenzi e Sherwood, 1992, Delouis e Richard, 1993).

A glândula mamária apresenta-se como um par isolado ou em duas linhas sagitais simétricas, em número variável (Delouis e Richard, 1993). Nas ratas, a glândula mamária situa-se no subcutâneo da região cervical até a inguinal, como seis pares ventro-

laterais, cada uma com sua própria papila mamária. As glândulas cervicais, torácicas, abdominais e inguinais variam em seu desenvolvimento, sendo as inguinais, mais diferenciadas nas ratas nulíparas (Masso-Welch et al., 2000).

O tecido mamário apresenta múltiplos tipos celulares, e é dividido em dois compartimentos, o epitelial ou parênquima e o estroma (Masso-Welch et al., 2000). O epitélio mamário deriva-se, embriologicamente, do ectoderma, enquanto que o estroma deriva-se do mesoderma (Delouis e Richard, 1993, Walter et al., 1994).

O estroma é composto pelo tecido conjuntivo, constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras de músculo liso, linfonodos, tecido adiposo (Delouis e Richard, 1993, Masso-Welch et al., 2000, Gouon-Evans et al., 2002) e pela migração de leucócitos, como macrófagos, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos (Gouon-Evans et al., 2002).

O parênquima mamário é composto por estruturas epiteliais, distintas do ponto de vista morfofuncional, representado pelo epitélio dos ductos, dos ductulos e dos alvéolos e pela camada mioepitelial que os circunda. As células do epitélio dos ductos e ductulos possuem forma cuboidal ou colunar, enquanto que nos alvéolos o epitélio é piramidal ou achatado. O epitélio alveolar é responsável pela síntese e secreção de leite durante a lactação (Walter et al., 1994, Masso-Welch et al., 2000).

O epitélio mamário apresenta ramificações que terminam nos alvéolos. O conjunto de alvéolos forma os lóbulos, e o conjunto destes é organizado em lobos. Os alvéolos

drenam para os ductulos, que se unem entre si formando ductos maiores. Em ratas e camundongos fêmeas, todos os ductos unem-se em um único ducto coletor primário que se conecta com a papila mamária (Delouis e Richard, 1993, Walter et al., 1994, Masso-Welch et al., 2000).

Os alvéolos são compostos por uma única camada de células epiteliais, que circundam o lúmen. As células mioepiteliais contráteis envolvem a camada de células epiteliais. Os ductulos são constituídos de duas camadas de células epiteliais e mioepiteliais. Uma malha de estroma, conectada aos músculos da pele, confere uma forma achatada a glândula mamária dos roedores e logomorfes, e uma forma esférica, a dos primatas e ruminantes (Delouis e Richard, 1993).

Nos marsupiais, os ductos projetam-se para o exterior do corpo sem nenhuma estrutura específica. Nos primatas, roedores e logomorfes os ductos projetam-se em papilas mamárias, enquanto que nos ruminantes, os ductos projetam-se para uma cisterna que se comunica com o meio externo por uma teta (Delouis e Richard, 1993).

As papilas mamárias são estruturas essenciais, pois, permitem a sucção e a passagem do leite do sistema ductal da glândula mamária para o filhote, além de apresentarem terminações nervosas da via aferente do arco reflexo neuroendócrino que estimulam a secreção de prolactina, durante o ato da sucção (Kuenzi e Sherwood, 1992).

O epitélio mamário próximo a papila mamária é envolto por uma camada espessa de estroma, enquanto que o epitélio distal é envolto por uma camada delgada (Masso-Welch et al.,

2000). O epitélio da papila mamária é contínuo com o epitélio pavimentoso queratinizado da epiderme. A transição deste epitélio para duas camadas de epitélio cuboidal, presente nos ductos, ocorre no ducto lactífero no interior da papila mamária. O ducto lactífero transporta o leite do seio lactífero para a papila mamária. O óstio externo das papilas mamárias é selado por um *plug* de células epiteliais ou de queratina. Glândulas sebáceas e sudoríparas estão presentes adjacentes as papilas mamárias (Masso-Welch et al., 2000).

O seio lactífero que é o local de armazenamento do leite, durante a lactação, apresenta o lúmen particularmente irregular, circundado por duas camadas de epitélio cúbico e uma camada espessa de estroma. O ducto principal apresenta uma camada bem regular de epitélio cúbico ou colunar circundado por células mioepiteliais. A circunferência do ducto principal apresenta maior regularidade do que a do seio lactífero, mas ambos os ductos são igualmente circundados por uma espessa camada de estroma (Masso-Welch et al., 2000).

Uma cápsula altamente vascularizada de tecido conjuntivo fibrilar delimita a glândula mamária. Esta cápsula atua como uma “zona inibitória”. As células epiteliais mamárias podem invadir esta região, mas não a atravessam durante o desenvolvimento normal da glândula, apesar de ser possível a presença de tecido mamário adjacente (Masso-Welch et al., 2000). Septos de tecido conjuntivo, que se desenvolveram antes do epitélio, dividem a glândula mamária em lobos, que provavelmente também inibem a invasão ductal (Walter et al., 1994, Masso-Welch et al., 2000).

As células mioepiteliais circundam o epitélio dos ductos, dúctulos e alvéolos. A forma, a espessura e a continuidade dessas células variam entre as estruturas epiteliais da glândula mamária e durante o desenvolvimento (Masso-Welch et al., 2000). As células mioepiteliais adquirem miofilamentos, durante a gestação, para exercerem sua função contrátil, durante a lactação (Joshi et al., 1986). As células mioepiteliais localizam-se entre o epitélio luminal e a membrana basal. As células mioepiteliais que circundam os alvéolos, durante a gestação e a lactação, formam uma camada descontínua de células, com formato *stellate*, e contraem os alvéolos no momento da amamentação. No início da involução mamária, as células mioepiteliais formam uma camada contínua e densa envolvendo o alvéolo. Indiferentemente da sua forma, as células mioepiteliais, que separam o compartimento epitelial do estroma, sintetizam e secretam a membrana basal (Masso-Welch et al., 2000).

A interação entre o compartimento epitelial e o mesenquimal é importante para o desenvolvimento pós-natal da “árvore” ductal mamária e para sua diferenciação, durante a gestação. Algumas das células do compartimento mesenquimal, como os adipócitos e os fibroblastos, são capazes de produzir fatores de crescimento que atuam, sinergicamente, com os hormônios mamogênicos, promovendo o desenvolvimento e a diferenciação das células epiteliais (Delouis e Richard., 1993, Gouon-Evans et al., 2002).

A matriz extracelular da glândula mamária, particularmente a membrana basal, apresenta função importante no tecido. Contribui para a proliferação, sobrevivência e diferenciação das

células do epitélio mamário (Flint e Gardner, 1994, Furlong et al., 1996, Marshman e Streuli, 2002). As células epiteliais do tecido mamário mantidas em cultura, sofrem apoptose, como ocorre na involução da glândula. No entanto, quando as células epiteliais são revestidas por uma matriz extracelular rica em laminina ocorre a supressão da apoptose, na presença dos hormônios lactogênicos (Furlong et al., 1996).

Os vasos sangüíneos estão presentes em toda a glândula mamária e variam em tamanho, forma e quantidade, durante o desenvolvimento da glândula. Os vasos linfáticos variam de grandes vasos a capilares, são abundantes no tecido conjuntivo, sendo encontrados em maior quantidade durante a involução (Masso-Welch et al., 2000).

Os macrófagos desempenham suas funções no crescimento e diferenciação ductal. Possivelmente, atuando através do suprimento de fatores tróficos para as células epiteliais e para a angiogênese, mas também por suas atividades fagocíticas. Os macrófagos e os eosinófilos distribuem-se, muitas vezes, ao redor dos botões terminais. Tanto os macrófagos, quanto os eosinófilos, são encontrados durante a gestação e a lactação ao redor dos alvéolos, entretanto, os macrófagos são mais numerosos. Mesmo em indivíduos saudáveis de várias espécies, os macrófagos constituem o principal componente celular do leite (Gouon-Evans et al., 2002).

Os macrófagos não são observados no tecido conjuntivo da glândula mamária, durante a gestação e na primeira metade da lactação. Estes são encontrados, em grande quantidade, no tecido conjuntivo da glândula, no final da lactação, pois participam da involução do epitélio. Os

eosinófilos são encontrados, em quantidade moderada, durante todo o período gestacional, no tecido conjuntivo da glândula mamária, atuando como neutralizadores de diferentes proteínas (Peryt et al., 1985).

Os linfócitos T ou B, assim como os neutrófilos não são encontrados entre as estruturas epiteliais da glândula mamária em desenvolvimento, durante a puberdade. No entanto, durante a lactação, os linfócitos são importantes componentes celulares, sendo importantes como fonte dos anticorpos maternos (Gouon-Evans et al., 2002).

Os mastócitos são encontrados, em maior quantidade, durante a primeira metade da gestação. Uma redução gradual dessas células é observada durante a segunda metade da gestação, com posterior aumento nas primeiras 48 horas de lactação, e seguido de nova redução (Peryt et al., 1985, Gouon-Evans et al., 2002). Os mastócitos participam da secreção de compostos biologicamente ativos, como a histamina, que regula a microcirculação e causa aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos e da secreção glandular (Peryt et al., 1985). Acredita-se que a histamina endógena além de participar do desenvolvimento e da diferenciação da glândula mamária normal de ratas participa como mediadora do crescimento de carcinomas mamários experimentais, atuando, especificamente, sobre receptores de membrana para H2 (Bowrey et al., 2000).

### **3.1.1 Desenvolvimento da Glândula mamária**

O crescimento da glândula mamária ocorre durante a vida fetal e pós-natal

sendo mais evidente, durante a puberdade, gestação e lactação. A proliferação e a diferenciação das células epiteliais da glândula mamária estão sob o controle de diversos hormônios e fatores de crescimento. Há variações significativas no requerimento dessas substâncias para o desenvolvimento da glândula mamária nas diferentes espécies. Além do mais, o crescimento e o desenvolvimento do tecido mamário ocorrem em estágios definidos pelo desenvolvimento sexual e pelo estado reprodutivo da fêmea (Walter et al., 1994).

### **3.1.1.1 Pré-puberdade**

A glândula mamária é um dos poucos órgãos dos mamíferos, que completa o seu desenvolvimento morfológico durante a vida pós-natal (Ball, 1998). Ao nascimento, a glândula mamária das roedoras consiste de 15 a 20 ductos ramificados, conectados a papila mamária, por um único ducto (French et al., 1996). No período pós-natal, ocorre proliferação celular ativa, remodelamento da matriz extracelular e invasão celular no tecido adiposo mamário (Knight e Peaker, 1982, Masso-Welch et al., 2000). Antes da puberdade, o crescimento da glândula mamária ocorre na mesma velocidade que qualquer outro tecido do animal (Delouis e Richard, 1993, Masso-Welch et al., 2000). Após duas semanas de idade, observa-se a presença de botões terminais na glândula mamária das ratas, que atingem o número máximo com 21 a 28 dias de idade. Os botões terminais são aglomerados de células epiteliais, sólidos ou semi-sólidos, localizados no final dos ductos. São locais importantes de proliferação das células epiteliais, durante a puberdade, resultando no alongamento e

ramificação dos ductos. Normalmente, os botões terminais estão presentes somente em ratas nulíparas (Masso-Welch et al., 2000). A habilidade dos botões terminais em determinarem a morfogênese dos ductos está associada com a característica de suas células. Estas são indiferenciadas e consideradas pluripotenciais, podendo resultar em células epiteliais não luminiais, luminiais ou mioepiteliais (Ball, 1998).

### **3.1.1.2 Puberdade**

Quando o ciclo estral inicia na rata, por volta de 35 a 42 dias de idade, padrões cíclicos de mitose, migração celular e remodelamento da matriz extracelular começam a ocorrer na glândula mamária (Masso-Welch et al., 2000). O sistema ductal imaturo torna-se maduro, pelo alongamento, ramificação e prolongamento dos botões terminais, sob influência dos hormônios ovarianos (Ruan et al., 1992, French et al., 1996, Masso-Welch et al., 2000). São observados receptores estrogênicos nas células dos compartimentos epitelial e mesenquimal (Cunha et al., 2004).

Nos botões terminais, apoptose e mitose ocorrem concomitantemente. A apoptose resulta na cavitação que forma o ductulo terminal, uma estrutura com lúmen, epitélio luminal e células mioepiteliais. Os ductulos terminais são agrupados em “ilhas” de tecido conjuntivo que passam a se chamar botões alveolares. Estes sofrem diferenciação para formarem os lóbulos, que vão se acumulando, progressivamente, com os múltiplos ciclos estrais, o acúmulo de lóbulos torna-se maior durante a gestação. Após os 55 dias de idade, o número de lóbulos permanece estável nas ratas. Entretanto, durante o ciclo estral

ocorrem alterações no tamanho e na atividade secretória das células dentro de cada lóbulo (Masso-Welch et al., 2000).

Tanto nas ratas púberes virgens como nas multíparas não gestantes, a população de células epiteliais é minoria na glândula mamária, sendo esta constituída, predominantemente, por tecido adiposo (Varas et al., 2002). Observa-se que 74,4% do compartimento epitelial são constituídos por células epiteliais e 24,8%, por células mioepiteliais. Nas ratas púberes virgens a glândula consiste, predominantemente, de ductos, grupos de botões alveolares e botões terminais. Enquanto nas ratas multíparas não gestantes, a glândula é composta de ductos e alvéolos, organizados em lóbulos (Joshi et al., 1986).

### **3.1.1.3 Gestação**

O metabolismo das fêmeas, durante a gestação, está direcionado para o suprimento nutricional dos fetos e da glândula mamária. Observa-se acúmulo de lipídeos na mãe, durante a primeira metade da gestação, e a utilização destes lipídes na segunda metade (Rosato et al., 1992).

Estima-se que cerca de 60% do crescimento total da glândula mamária das ratas ocorre durante a gestação (Knight e Peaker, 1982). Os animais que apresentam um período de gestação longo, como os ruminantes, os primatas e os suínos o desenvolvimento da glândula mamária esta quase que totalmente completo no momento do parto (Delouis e Richard, 1993). Enquanto os animais que apresentam um período de gestação curto, como as ratas e os camundongos fêmeas, o

desenvolvimento da glândula ocorre também durante a lactação (Knight e Peaker, 1982, Delouis e Richard, 1993). Observa-se um rápido e contínuo aumento do epitélio associado à redução do tecido adiposo, durante os 21 dias de gestação (Masso-Welch et al., 2000, Varas et al., 2002). Ocorre o alongamento e ramificação dos ductos em resposta aos elevados níveis de progesterona e estrógeno (Delouis e Richard, 1993, French et al., 1996).

Os botões terminais, se ainda presentes, dividem-se rapidamente para formar os botões alveolares e os alvéolos (Masso-Welch et al., 2000). No quinto dia de gestação, não são mais observados botões terminais (Joshi et al., 1986). Os alvéolos aumentam em tamanho e número, até que, a glândula mamária seja quase que completamente constituída de epitélio (Masso-Welch et al., 2000). A estrutura ductal representa aproximadamente 10% das células da glândula mamária, no início da gestação, passando a representar em torno de 90% das células da glândula, no final da gestação (Delouis e Richard, 1993).

As células mioepiteliais dividem-se ativamente no início da gestação, sendo que, no quinto dia da gestação, passam a constituir 18% das células do compartimento epitelial. Com o progresso da gestação, a velocidade de divisão das células mioepiteliais declina para níveis insignificantes, não sendo mais observado células mioepiteliais em divisão no décimo dia de gestação. Os componentes do estroma, incluindo os vasos também se dividem durante toda a gestação, sendo esta divisão mais ativa até o décimo dia (Joshi et al., 1986).

Durante a segunda metade da gestação, a morfogênese alveolar sofre diferenciações estruturais e funcionais, como preparação para a produção dos constituintes do leite (French et al., 1996). As células epiteliais das ratas multíparas modificam-se mais rapidamente do que as das ratas que estão apresentando a primeira gestação (Joshi et al., 1986). O epitélio alveolar se hipertrofia, devido ao acúmulo intracelular de lipídeos e ao aumento no número de retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas secretórias e ribossomos (Joshi et al., 1986, Delouis e Richard, 1993, Masso-Welch et al., 2000). No décimo nono dia de gestação, o epitélio alveolar praticamente atinge seu desenvolvimento máximo. As células alveolares apresentam-se repletas de lipídeos e os lumens alveolares repletos de leite (Masso-Welch et al., 2000).

A hipertrofia das células alveolares torna a camada de células mioepiteliais mais descontínua, aumentando o contato entre a base do epitélio luminal alveolar e a membrana basal, que se justapõe as células mioepiteliais. As células epiteliais ductais não apresentam contato direto com a membrana basal. Tem-se demonstrado que o contato direto das células epiteliais luminiais mamárias com a membrana basal resulta na diferenciação secretória das células (Masso-Welch et al., 2000).

As papilas mamárias crescem e se desenvolvem durante a segunda metade da gestação. Ocorre ingurgitamento dos vasos sanguíneos e modificações nos componentes da matriz extracelular do estroma. As fibras de colágeno tornam-se menos densas e observa-se um aumento na quantidade de substância amorfa e uma diminuição do comprimento das fibras de elastina.

Estas alterações ocorrem para facilitar a sucção pelos filhotes (Kuenzi e Sherwood, 1992).

O desenvolvimento da glândula mamária, durante a gestação, é parcialmente correlacionado com o número de fetos. As ratas necessitam estar gestando, no mínimo três fetos, para obterem um desenvolvimento máximo da glândula (Knight e Peaker, 1982, Thordarson et al., 1989).

#### **3.1.1.4 Lactação**

A glândula mamária em lactação é um dos tecidos metabolicamente mais ativos (Masso-Welch et al., 2000). A morfologia desta, no início da lactação, difere marcadamente da observada aos 19 dias de gestação nas ratas. Durante a lactação, os lumens estão repletos de secreções basofílicas e micelas de caseína em associação com glóbulos de gordura. Os alvéolos são heterogêneos quanto à distensão luminal e a espessura do epitélio luminal. Esta heterogeneidade ocorre dentro dos lóbulos e entre os lóbulos (Masso-Welch et al., 2000, Varas et al., 2002) e não indica diferenciação incompleta. A morfologia da glândula permanece similar durante todo o período de lactação que compreende cerca de 21 dias pós-parto (Masso-Welch et al., 2000).

As células do epitélio alveolar apresentam uma aparência espongiiforme, devido à presença de lipídeos no citoplasma e vesículas secretoras que contem lactose (Masso-Welch et al., 2000, Varas et al., 2002). O aumento do tamanho alveolar torna a camada de células mioepiteliais mais descontínua do que durante a gestação

(Joshi et al., 1986, Masso-Welch et al., 2000, Varas et al., 2002).

As células alveolares sintetizam o leite a partir dos nutrientes presentes no sangue. A secreção do leite para o lúmen alveolar ocorre através da superfície apical da célula (Delois e Richard, 1993). A contração das células mioepiteliais, em resposta a ocitocina, resulta no esvaziamento do lúmen alveolar para o duto (Masso-Welch et al., 2000).

O leite contém água, proteína, açúcares, principalmente a lactose, lipídeos, sais minerais e vitaminas. Pode conter também fatores de crescimento e hormônios (Delois e Richard, 1993). A concentração de gordura do leite pode variar conforme a dieta da mãe, já a concentração de lactose e de proteína não (Flint e Gardner, 1994). O conteúdo de proteína do leite é estável durante toda a lactação. No entanto, o leite apresenta uma concentração maior de lactose e menor de gordura, no início da lactação, e a concentração destes constituintes vai invertendo à medida que a lactação progride (Delois e Richard, 1993).

A água é o principal componente do leite, na maior parte das espécies. O seu conteúdo é regulado de acordo com a quantidade de lactose, visto que, esta é o principal constituinte osmótico do leite. A lactose é a responsável pela passagem da água para o interior das vesículas de Golgi, que também contêm micelas de caseína, principal proteína do leite (Delois e Richard, 1993, Flint e Gardner, 1994).

A maior parte dos lipídeos do leite é sintetizada na glândula mamária, pela lipogênese a partir de glicose e ácidos graxos (Delois e Richard, 1993, Prado

et al, 1994). A lipase lipoprotéica é a enzima responsável pelo ingresso de ácidos graxos na glândula mamária lactante, a partir de quilomícrons ou de lipoproteínas de baixa densidade. A concentração de lipase lipoprotéica aumenta na glândula mamária e diminui no tecido adiposo de outros tecidos, momentos antes do parto e durante toda a lactação. Este padrão de concentração resulta em um direcionamento do triacilglicerol plasmático para o tecido mamário (Prado et al, 1994). Uma pequena parte dos lipídeos do leite é originada da corrente sangüínea (Delois e Richard, 1993, Prado et al., 1994).

Os glóbulos de gordura são secretados para o lúmen alveolar envoltos pela membrana plasmática (Joshi et al., 1986, Masso-Welch et al., 2000). Esses podem ser secretados juntamente com uma pequena quantidade do citoplasma e de vesículas secretoras derivadas do complexo de Golgi, que contem lactose e proteínas do leite (Masso-Welch et al., 2000).

### **3.1.1.5 Involução**

A involução da glândula mamária que caracteriza-se pela perda do epitélio alveolar secretor após o desmame, tem sido atribuída a vários fatores, tais como: redução dos níveis de prolactina circulante após a cessação da amamentação (Furlong et al., 1996, Masso-Welch et al., 2000), isquemia como resultado do ingurgitamento pelo leite e compressão dos vasos, fatores do leite que promovem a morte celular, distensão física do epitélio luminal e aumento da atividade das enzimas liberadas pela membrana basal degradada (Masso-Welch et al., 2000).

A atividade da glândula mamária e a sobrevivência de suas células dependem dos corticosteróides e da progesterona, mas principalmente, da prolactina e do GH, que atuam em parte, inibindo a apoptose (Accorsi et al., 2002, Varas et al., 2002). O IGF-1 é também um fator de crescimento importante para a sobrevivência das células epiteliais. Enquanto que a IGFBP-5 atua no processo de involução da glândula mamária, visto que, esta proteína liga-se ao IGF-I diminuindo a sua concentração no tecido (Varas et al., 2002).

O processo de involução da glândula mamária apresenta duas fases, inicialmente observa-se a apoptose dos elementos epiteliais da glândula (French et al., 1996, Furlong et al., 1996, Accorsi et al., 2002), resultando numa redução de 80% das células do epitélio lóbulo-alveolar (Furlong et al., 1996, French et al., 1996). A perda celular ocorre exclusivamente por apoptose (Masso-Welch et al., 2000), visto que, as células apresentam alterações bioquímicas e morfológicas características, que incluem, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e perda da parede celular (Furlong et al., 1996). A perda do contato das células e da integridade da matriz extracelular, juntamente com a degradação da membrana basal contribuem, significativamente, como gatilho inicial para a apoptose das células epiteliais (Furlong et al., 1996, Varas et al., 2002).

Numa segunda fase, quando a integridade alveolar já está comprometida, ocorre ativação do plasminogênio em plasmina, que resulta na degradação da matriz extracelular (Allan et al., 2002). A caseína- $\alpha_{S2}$  dimérica, proteína do leite que se acumula nos alvéolos, liga-se ao

plasminogênio e a substância ativadora do plasminogênio, aumentando a ativação do plasminogênio em plasmina. Enquanto que a proteína IGFBP-5 liga-se a substância inibidora da ativação do plasminogênio, presente na matriz extracelular, inibindo a ação da mesma (Tonner et al., 2000). Inicia-se a fase do remodelamento glandular, que está associada ao aumento da degradação proteolítica da matriz extracelular, incluindo a membrana basal, devido ao aumento na atividade de proteases extracelulares (Furlong et al., 1996, Accorsi et al., 2002, Varas et al., 2002).

Histologicamente, no segundo dia de involução, a glândula mamária ainda esta repleta de epitélio secretor. Grande parte dos ductos está preenchida com células, fragmentos de células apoptóticas, lipídeos e substância basofílica. Os alvéolos também estão distendidos e repletos com lipídeos, substância basofílica, e menos freqüentemente, por fragmentos celulares. São observados lóbulos alveolares com epitélio luminal intacto e outros com epitélio luminal degradado. A involução epitelial, tanto alveolar quanto dos ductos é, até certo ponto, mais avançada distalmente a papila mamária (Masso-Welch et al., 2000).

No quarto dia de involução, um aumento no número de adipócitos coincide com a redução do tamanho dos lóbulos alveolares (Masso-Welch et al., 2000). Neste momento há também infiltração leucocitária (Masso-Welch et al., 2000, Gouon-Evans et al., 2002).

Segundo Masso-Welch et al. (2000), a lactação pode ser reiniciada nas ratas após quatro a cinco dias de desmame, mostrando que essas primeiras

alterações são reversíveis. Já segundo Varas et al. (2002), a lactação só poderá ser reiniciada dentro de 36 a 48 horas após o desmame, passando a ser irreversível a retomada da lactação a partir do terceiro dia de desmame.

No sétimo dia de involução, os alvéolos estão ainda menores e com uma aparência desorganizada, devido ao influxo de fibroblastos e mastócitos. A quantidade de estroma que circunda cada alvéolo aumenta rapidamente de volume. Neste momento, sexto a sétimo dia de involução, o epitélio luminal dos alvéolos degenerados está circundado por uma camada espessa e contínua de células mioepiteliais. Estas atuam como uma barreira física entre o epitélio luminal alveolar e a membrana basal. A involução da glândula mamária das ratas é descrita como completa do décimo terceiro ao décimo quarto dia de desmame, em 66,79% dos animais, ou no vigésimo primeiro dia, em 98% dos animais (Masso-Welch et al., 2000).

### **3.2 Hormônios que afetam a atividade da glândula mamária**

O controle hormonal do desenvolvimento e da atividade da glândula mamária é complexo. Os principais hormônios envolvidos neste processo incluem o estrógeno, a progesterona, a prolactina (PRL), o hormônio do crescimento (GH), a insulina, a tiroxina (T4), a triiodotironina (T3), os glicocorticóides, a ocitocina e uma variedade de fatores de crescimento semelhantes à insulina (Thordarson et al., 1992, Marshman, e Streuli., 2000, Varas et al., 2002).

#### **3.2.1 Estrógeno**

O crescimento e a diferenciação da glândula mamária, que ocorre durante a puberdade e a gestação, são desencadeados pelo aumento na secreção dos hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona (Ruan et al., 1992, Delouis e Richard, 1993, French et al., 1996). Esses hormônios atuam nas células epiteliais localizadas no final dos ductos da glândula mamária. A progesterona, isoladamente, não é capaz de promover o crescimento do tecido mamário, mas atua acentuando os efeitos do estrógeno. Este, por sua vez, além de aumentar o número de receptores para a progesterona (Knight e Peaker, 1982, Delouis e Richard, 1993), estimula a secreção de prolactina pela pituitária e aumenta a sensibilidade da glândula mamária a este hormônio (Knight e Peaker, 1982).

Para que o desenvolvimento mamário ocorra é necessário o suporte hormonal da pituitária, visto que, o crescimento da glândula não ocorre em animais hipofisectomizados mantidos apenas com o estrógeno. Entretanto, se observa o desenvolvimento completo da glândula, em animais hipofisectomizados, quando o estrógeno é administrado em combinação com o GH, prolactina, progesterona e glicocorticóides (Ruan et al., 1992).

#### **3.2.2 Progesterona**

A progesterona, como citado acima, atua juntamente com o estrógeno, no crescimento e na diferenciação da glândula mamária, durante a puberdade (Ruan et al., 1992, French et al., 1996) e gestação (Delouis e Richard, 1993, French et al., 1996). Observa-se grande número de receptores para progesterona

nas células da glândula mamária, durante a gestação, não sendo observado durante a lactação (Delouis e Richard, 1993).

A progesterona, juntamente com os hormônios placentários, como os lactogênios placentários, previnem uma lactação precoce, durante a gestação. Esta prevenção ocorre devido a inibição, por esses hormônios, da secreção central de prolactina e da síntese de  $\alpha$ -lactoalbumina na glândula mamária. A diminuição nos valores séricos de progesterona, no final da gestação, é suficiente para induzir a secreção de prolactina, que resulta em aumento acentuado de  $\alpha$ -lactoalbumina e de caseína na glândula mamária. A síntese de caseína se inicia na presença da prolactina e na ausência de receptores para progesterona na glândula mamária (Deis et al., 1989, Thordarson et al., 1989).

No sétimo dia de lactação das ratas, a concentração de progesterona aumenta devido à ovulação pós-parto. Posteriormente, a concentração de progesterona diminui gradualmente durante os dois terços finais da lactação, mas permanece sempre maior do que os valores observados no diestro (Varas et al, 2002).

### 3.2.3 Prolactina

A prolactina exerce função importante no crescimento e na diferenciação da glândula mamária (Thordarson et al, 1992, Capuco et al, 1999, Accorsi et al., 2002, Allan et al, 2002). Camundongos fêmeas com ausência de receptores para prolactina apresentam desenvolvimento normal da glândula até a puberdade. Entretanto, a subsequente ramificação dos ductos é prejudicada, os botões terminais persistem e não ocorre

desenvolvimento alveolar e síntese de leite (Allan et al, 2002). O mecanismo pelo qual a prolactina estimula o crescimento do tecido mamário é multifatorial. Ela aumenta o número de receptores para estrógeno e progesterona, e postula-se que haja um efeito intrínseco mitogênico da prolactina nas células epiteliais mamárias (Thordarson et al., 1989).

A prolactina é considerada o principal hormônio galactopoiético em todas as espécies, exceto nos ruminantes (Djiane e Kelly, 1993, Capuco et al, 1999). A produção de leite é reduzida em 43% e 57%, 24 e 48 horas respectivamente, após inibição da prolactina. A inibição conjunta da ação do GH resulta em uma diminuição de 52% e 88%, 24 e 48 horas, respectivamente (Flint e Gardner, 1994).

A prolactina é importante na manutenção da viabilidade das células da glândula mamária, bem como na manutenção das *tight junctions*. É considerada um fator inibidor da apoptose (Flint e Gardner, 1994, Accorsi et al., 2002) e está associada com a habilidade materna (Allan et al, 2002). A sucção pelos filhotes é um dos estímulos mais potentes para a secreção de prolactina, a sucção feita por filhotes famintos pode resultar em um aumento de mais de 20 vezes na concentração sérica de prolactina (Deis et al., 1989). A concentração de prolactina diminui progressivamente durante a lactação, atingindo níveis muito baixos no vigésimo primeiro dia de lactação (Varas et al, 2002).

A prolactina é importante na manutenção da composição do leite. A utilização de inibidores de prolactina resulta em redução de 81% na concentração de lactose e de 47% na concentração de proteína do leite de

ratas. A proporção de proteína para lactose aumenta em torno de três vezes (Thordarson et al., 1989, Delouis e Richard, 1993, Flint e Gardner, 1994). A concentração de sódio do leite aumenta, visto que, a prolactina esta envolvida no controle da osmoregulação e da reabsorção do sódio no tecido mamário (Flint e Gardner, 1994). O sinergismo entre os glicocorticóides e a prolactina é importante para a síntese de todas as proteínas do leite, sendo essencial para a síntese de caseína (Thordarson et al., 1989, Delouis e Richard, 1993).

A administração de inibidores da prolactina não afeta a concentração de gordura do leite. Grande parte dos fatores associados com o metabolismo lípidico na glândula mamária, incluindo a atividade da lipase lipoprotéica e a quantidade de acetil coenzima-A carboxilase são inalterados (Flint e Gardner, 1994).

Para que a PRL, e também o GH atuem na glândula mamária é essencial a participação dos hormônios tireoidianos. Por isso, o GH e a PRL aumentam a concentração da 5' desiodinase na glândula mamária (Griffith e Turner, 1961, Kumaresan e Turner, 1965, Kahl et al, 1995, Capuco et al., 1999). Na ausência dos hormônios tireoidianos, a prolactina e o GH não apresentam atividade galactopoiética (Capuco et al, 1999).

Enquanto que os efeitos do GH são mediados pelo IGF-I, a prolactina atua diretamente na glândula mamária (Flint e Vermon, 1998, Accorsi et al., 2002), e não afeta a concentração de IGF-I (Flint e Gardner, 1994), mas inibe a síntese de IGFBP-5 para maximizar os efeitos de sobrevivência e proliferação do IGF-I (Tonner et al, 1997, Marshman e Streuli, 2002, Rosato et al, 2002). Tanto

a prolactina quanto o GH também atuam suprimindo a ativação do plasminogênio em plasmina. Nos animais que apresentam deficiência de prolactina observa-se aumento na concentração de IGFBP-5 e de plasmina, importantes como desencadeadores da apoptose (Allan et al, 2002).

### 3.2.4 GH

Os efeitos do GH e da prolactina na lactogênese são muito mais conhecidos do que os seus efeitos no desenvolvimento e na diferenciação pós-natal da glândula mamária. Entretanto, vários estudos têm salientado a importância do GH no desenvolvimento da glândula mamária de ratas (Ruan et al., 1992, Flint e Gardner, 1994, Alan et al, 2002). Receptores para o GH são observados na glândula mamária tanto no estroma quanto no compartimento epitelial (Slebozinski et al, 1999, Allan et al, 2002) e também tem sido relatado que o GH aumenta o número de receptores para estrógeno no tecido mamário (Allan et al, 2002).

A importância do GH no desenvolvimento da glândula mamária pode ser demonstrada, visto que, camundongos fêmeas sem receptores para o GH apresentam intenso comprometimento do desenvolvimento ductal (Marshman e Streuli, 2000). A implantação de *pellets* contendo GH ou IGF-I, durante a fase de diferenciação e proliferação, aumenta o número de botões terminais e de alvéolos na glândula mamária (Ruan et al., 1992).

O GH é o principal hormônio galactopoiético nos ruminantes (Capuco et al., 1999, Accorsi et al., 2002). O

aumento da produção de leite em fêmeas lactantes, mediante a administração de GH (Armstrong et al., 1994, Kahl et al., 1995, Tonner et al., 1997, Flint e Vermon, 1998), ocorre possivelmente devido a maior atividade metabólica das células secretoras da glândula mamária, e não, devido ao aumento do número de células (Kahl et al., 1995). Nos roedores, o GH é um hormônio com pouca ação lactogênica (Capuco et al., 1999, Allan et al., 2002). Pode substituir a prolactina, somente parcialmente em termos de galactopoiese quando os níveis de prolactina estão baixos (Flint e Gardner, 1994, Allan et al., 2002). A produção de leite, em ratas, é reduzida em 20% e 24%, 24 e 48 horas após o tratamento com anti-rGH, respectivamente. A inibição do GH juntamente com a inibição da prolactina resulta em redução de 52% e 88%, 24 e 48 horas após a inibição, respectivamente (Flint e Gardner, 1994).

O GH não está relacionado com a composição dos principais constituintes do leite, proteína, lactose e gordura. Entretanto, quando se tem ausência de prolactina e de GH observa-se redução na concentração da gordura do leite. Esta diminuição não é observada quando se tem somente ausência de prolactina. Isto sugere que o GH é importante na manutenção da concentração de gordura do leite (Flint e Gardner, 1994). Segundo Thordarson et al. (1989), o GH estimula a síntese tanto de caseína quanto a de  $\alpha$ -lactoalbumina.

### 3.2.5 IGFs E IGFbPs

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são polipeptídeos de cadeia única, sintetizados e secretados por vários tecidos. Podem atuar

localmente, como fatores autócrinos ou parácrinos, ou circulando pelo plasma, como fatores endócrinos (Ruan et al., 1992, Marshman e Streuli, 2000). Os IGFs e suas proteínas ligadoras estão relacionados ao crescimento e a diferenciação de vários tecidos (Rosato et al 2002). O IGF-1 é o mediador primário das ações do GH na glândula mamária das ratas (Flint e Vermon, 1998, Marshman, e Streuli, 2002, Rosato et al., 2002). Entretanto, o IGF-II é considerado o principal IGF sintetizado pelas células epiteliais da glândula mamária das vacas, e o IGF-I não é detectado na glândula desses animais (Slebodzinski et al., 1999).

Os IGFs também são sintetizados pelos fibroblastos e adipócitos da glândula mamária, o que confirma que a interação entre o estroma e o compartimento epitelial é essencial para o desenvolvimento completo da glândula mamária (Marshman e Streuli, 2002, Gouon-Evans et al., 2002).

O próprio IGF-I regula a sua produção pelo fígado, principal fonte de IGF-I circulante, e pode também modular a produção local dos IGFs (Marshman e Streuli, 2002). O GH, a insulina, os hormônios tireoidianos (Rosato et al 2002) e a condição nutricional do animal também modulam a expressão do IGF-I (Flint e Vernon, 1998, Rosato et al., 2002). Os IGFs podem se ligar aos seus receptores, exercendo suas ações biológicas, e nos receptores para insulina, ativando-os (Marshman e Streuli, 2002).

Os IGFs exercem funções importantes na proliferação e sobrevivência das células da glândula mamária, particularmente durante a puberdade e a gestação (Marshman e Streuli, 2002). Durante a gestação das ratas, são

observadas alterações na concentração dos receptores para os IGFs. Durante a primeira metade da gestação, a concentração de IGF-II encontra-se elevada. Entretanto, a concentração de IGF-I eleva-se no final da gestação. Esse padrão de concentração sugere que o IGF-II participa do início da mamogênese. O IGF-I estimula a proliferação das células epiteliais, no estágio final de diferenciação da glândula mamária, e inibe a atividade de proteínas pró-apoptóticas. O pico na concentração de IGF-I, no final da gestação, pode estar relacionado ao aumento na concentração de GH e estrógeno circulantes neste período. Visto que, esses hormônios induzem a expressão de IGF-I no tecido mamário (Rosato et al., 2002).

As ações dos IGFs são também reguladas por uma família de seis proteínas ligadoras dos fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFBPs 1 a 6) (Accorsi et al., 2002, Allan et al., 2002, Marshman e Streuli, 2002, Rosato et al., 2002). Todas as seis proteínas ligadoras estão presentes nos botões terminais da glândula durante a puberdade, sendo que as IGFBP-3 e IGFBP-5 aparecem em maior quantidade. Durante a gestação, as IGFBP-3 e IGFBP-5 aumentam sua expressão no estroma e no epitélio ductal e alveolar. As IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-6 podem ser detectadas somente no estroma (Marshman e Streuli, 2002, Rosato et al., 2002). Não foi detectada expressão da IGFBP-1 na glândula mamária de ratas durante a gestação e início da lactação (Rosato et al., 2002).

A IGFBP-5 é sintetizada pelas células epiteliais secretoras em apoptose (Tonner et al., 1997). Os níveis da IGFBP-5 encontram-se elevados no

leite, 48 horas após o desmame. Esta proteína participa do início da involução da glândula, sendo um gatilho para a ocorrência de apoptose (Tonner et al., 1997, Accorsi et al., 2002). Na glândula mamária em involução, os receptores para IGF-I apresentam uma afinidade maior para a IGFBP-5 do que para o IGF-I (Tonner et al., 2000). A síntese de IGFBP-4 e IGFBP-2 no tecido mamário aumenta durante a involução da glândula mamária de ratas (Tonner et al., 1997, Accorsi et al., 2002). As proteínas IGFBP-1, 3 e 6 não são detectadas na glândula mamária de ratas em lactação e durante a involução (Tonner et al., 1997).

### **3.2.6 Hormônios Tireoidianos**

Os hormônios tireoidianos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), participam da morfogênese e diferenciação da glândula mamária (Prado et al., 1994, Ramos et al., 2000, Rosato et al., 2002), estimulam a síntese e a secreção de alfa-lactoalbumina (Thordarson et al., 1989, Ramos et al., 2000), aumentam a atividade da lactose sintetase (Ziska et al., 1988) e modulam o número de receptores para a prolactina (Thordarson et al., 1992, Prado et al., 1994). A importância dos hormônios tireoidianos na morfogênese da glândula mamária pode ser demonstrada, em ratas adultas com hipofunção tireoidiana, na qual a morfologia da glândula permanece semelhante à da fase de puberdade, enquanto ratas adultas com hiperfunção tireoidiana apresentam maior desenvolvimento lóbulo-alveolar (Vonderhaar e Greco, 1979).

Os hormônios tireoidianos, isoladamente, são capazes de estimular a síntese de  $\alpha$ -lactoalbumina (Thordarson et al., 1992). Entretanto,

um estímulo máximo é obtido somente quando esses estão associados com outros hormônios, como a insulina, a prolactina e os corticosteróides (Thordarson et al., 1989, Thordarson et al., 1992). A T3 e a T4 não estão envolvidas na síntese de caseína (Thordarson et al., 1992).

A enzima 5' desiodinase converte a T4 em T3, forma metabolicamente ativa do hormônio tireoidiano (Prado et al., 1994, Kahl et al., 1995, Capuco et al., 1999, Slebodzinski et al., 1999, Ramos et al., 2000). Enquanto a T4 é sintetizada somente na tireóide, quase toda a T3 circulante é produzida por 5' desiodinação na tireóide ou em outros tecidos. São encontradas duas isoenzimas da 5' desiodinase (Jack et al., 1994). A 5' desiodinase tipo I esta presente, nos ratos, em altas concentrações no fígado, nos rins e na tireóide (Capuco et al., 1999, Slebodzinski et al., 1999), sendo encontrada também na musculatura esquelética, no coração, nos pulmões, no intestino (Jack et al., 1994) e na glândula mamária, neste último tecido é encontrada também em camundongos fêmeas. Toda a T3 plasmática é produzida pela 5' desiodinase I na tireóide, no fígado e nos rins. A 5' desiodinase tipo I é específica do epitélio alveolar da glândula mamária. Está presente neste tecido somente quando a glândula está em atividade, durante a lactação, ou quando o epitélio alveolar está se diferenciando, durante a puberdade ou no final da gestação (Slebozinski et al., 1999).

A 5' desiodinase tipo II está presente no cérebro, na pituitária anterior, no tecido adiposo marrom (Capuco et al., 1999, Slebozinski et al., 1999), na placenta, na glândula pineal, no plasma seminal (Slebozinski et al., 1999) e na glândula

mamária de vacas (Jack et al., 1994, Slebozinski et al., 1999) e porcas. Está envolvida na produção de T3 para as necessidades locais, exercendo sua função por sinalização parácrina (Slebozinski et al., 1999). Em ratos, a pituitária e o cérebro podem apresentar a 5' desiodinase I e a II, dependendo do *status* tireóideo do tecido (Jack et al., 1994).

Durante a lactação, fase de maior atividade da glândula mamária, observa-se redução da concentração plasmática de T3 e T4 e elevação da concentração da tireotropina plasmática (TSH) (Jack et al., 1994, Prado et al., 1994, Slebozinski et al., 1999, Ramos et al., 2000) e de T3 reverso. Este rearranjo particular das tironinas circulantes está associado com a diminuição na atividade da 5' desiodinase no fígado e rins (Jack et al., 1994, Prado et al., 1994, Kahl et al., 1995, Capuco et al., 1999, Slebozinski et al., 1999, Ramos et al., 2000). Ocorre aumento na atividade dessa enzima na glândula mamária, proporcional a intensidade lactacional (Kahl et al., 1995, Capuco et al., 1999, Slebozinski et al., 1999, Ramos et al., 2000) e um aumento no número de receptores para T3 no tecido mamário (Prado et al., 1994). Esta mudança na atividade da 5' desiodinase, proporcional a intensidade lactacional, é consistente com a prioridade metabólica e o fluxo de nutrientes para a glândula mamária, mantendo o tecido mamário em estado eutireóideo ou hipertireóideo (Jack et al., 1994, Capuco et al., 1999). A administração de GH, durante o final da gestação de vacas, aumenta a atividade da 5' desiodinase na glândula mamária e a produção de leite. Já durante a metade da lactação, diminui a atividade da 5' desiodinase no fígado enquanto

mantém a atividade da enzima na glândula (Capuco et al., 1999).

A quantidade de T4 ou T3 reverso no leite humano varia de concentrações indetectáveis a muito baixas. No entanto, a T3 é reportada, freqüentemente, em quantidades facilmente mensuráveis. A T4 no leite representa uma pequena fração do soro, em torno de 1/30, e a T3, aproximadamente 1/3, com diferenças entre as espécies. A diferença na concentração de T4 e T3 no leite é devido a diferente permeabilidade para estes hormônios na barreira sangue-glândula mamária, ou a habilidade de se transformar a T4 em T3 na glândula mamária, devido a presença da enzima 5' desiodinase (Slebozinski et al., 1999).

### 3.2.7 Corticosteróides

Os glicocorticóides são essenciais para a diferenciação normal do tecido mamário secretor (Thordarson et al., 1992). O sinergismo dos glicocorticóides com a prolactina é importante para a síntese de proteína e caseína láctea (Thordarson et al., 1989, Thordarson et al., 1992). Os corticosteróides, isoladamente, são capazes de estimular, discretamente, a síntese de alfa-lactoalbumina (Thordarson et al., 1992). Entretanto, estímulo máximo é obtido somente quando estão associados com outros hormônios, como a insulina, a prolactina e os hormônios tireoidianos (Thordarson et al., 1989, Thordarson et al., 1992).

Os glicocorticóides estão relacionados com o retardo da involução da glândula mamária, em torno de três a quatro dias após o desmame (Tonner et al., 1997).

No entanto, a concentração de corticosteróide não apresenta variação durante a lactação de ratas (Varas et al., 2002).

### 3.2.8. Insulina

Os efeitos da insulina, de forma específica sobre a glândula mamária não são claros. De fato, a insulina induz a utilização de glicose pelas células, mas, a glândula mamária pode utilizar glicose, acetato,  $\beta$ -OH-butirato e triglicerídeos de forma independente da insulina. Acredita-se que a insulina atua estimulando a síntese de proteínas e lipídeos e aumente a utilização de acetato no tecido adiposo (Collier et al., 1984).

A glândula mamária requer níveis basais de insulina, emtretanto, é um hormônio necessário para que as células da glândula mamária entrem na fase S do ciclo celular, permitindo a sua diferenciação. Este hormônio pode também se ligar, com baixa afinidade, aos receptores do IGF-I (Delouis e Richard, 1993).

### 3.2.9. Ocitocina

A ocitocina é o principal hormônio responsável pelo reflexo de sucção e ejeção do leite. O estímulo dos receptores sensoriais, no ato da amamentação, localizados nas papilas mamárias dos animais, dispara impulsos nervosos que desencadeiam a liberação de ocitocina pelo eixo hipotalâmico-hipófise. A ocitocina é secretada na corrente sanguínea, atinge a glândula mamária e induz a contração das células mioepiteliais, que envolvem os alvéolos. Esta contração resulta na expulsão do leite do lúmen alveolar para

os ductos. A ocitocina apresenta receptores específicos, que aparecem no final da gestação induzido pelo 17 $\beta$ -estradiol, atingem sua concentração máxima durante a lactação e desaparecem após o desmame (Delouis e Richard, 1993).

O estresse das mães, no momento da amamentação, inibe o reflexo de sucção, visto que, a ativação simpática provoca inibição central e periférica da ação hormonal do reflexo. A inibição periférica ocorre, visto que, a vasoconstrição retarda a chegada da ocitocina nas células mioepiteliais (Delouis e Richard, 1993).

### 3.2.10. Lactogênios placentários

Os lactogênios placentários são essenciais para a mamogênese normal. Esta importância pode ser demonstrada, visto que, a retirada dos fetos de ratas gestantes não tem nenhum efeito na mamogênese, quando a placenta é mantida intacta, sendo que quando esta é retirada, a mamogênese cessa (Knight e Peaker, 1982).

## 4. MATERIAL e MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos Laboratórios de Experimentação Animal e Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG e o Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### 4.1. Experimento 1

Foram utilizadas 36 ratas Wistar adultas com 45 dias de idade. Os animais foram alojados em caixas plásticas (seis animais/caixa), receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de sete dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, em dois grupos, tratado e controle, cada um composto por 18 animais. O grupo tratado recebeu L-tiroxina<sup>1</sup> na água de beber, na concentração de 2 $\mu$ g/ml até o final do experimento. Os animais do grupo não tratado (controle) receberam apenas água, como placebo.

O consumo de ração e água, por caixa, foi mensurado diariamente. A quantidade de L-tiroxina ingerida diariamente por cada animal do grupo tratado foi estimada, deduzindo-se a quantidade diária de água consumida da quantidade de água fornecida, dividindo-se o valor encontrado pelo número de animais da caixa.

Após 60 dias do início do tratamento, 18 animais de cada grupo eram colocados com ratos machos adultos, em uma proporção de quatro fêmeas para cada macho, durante a noite por um período de 12 horas. Posteriormente era realizada citologia vaginal em todas as ratas. A cópula era confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e este dia foi designado como dia 0. As fêmeas que não apresentaram espermatozoides na citologia vaginal eram colocadas

---

<sup>1</sup> L-Thyroxine, Sigma, St Louis, USA.

novamente com machos na noite seguinte, até que se encontrasse espermatozóides na citologia vaginal.

Após sete, 14 e 19 dias de gestação, seis animais de cada grupo foram sacrificados. O sacrifício, por punção cardíaca, foi precedido de anestesia pelo uso de pentobarbital sódico 2,5% (30 mg/Kg) por via intra-peritoneal.

#### **4.2. Experimento 2**

Foram utilizadas 46 ratas Wistar adultas com 45 dias de idade. Os animais foram alojados e manejados como no experimento 1. Após sete dias de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos experimentais, controle e tratado, cada um composto por 23 animais. Os animais do grupo tratado receberam tiroxina na água de beber, na concentração de 1,6µg/ml, durante a indução, e de 0,8µg/ml, durante a gestação e a lactação. Os animais do grupo não tratado (controle) receberam apenas água, como placebo.

O consumo de ração e água, por caixa, foi mensurado diariamente. A quantidade de L-tiroxina ingerida diariamente por cada animal do grupo tratado foi estimada, deduzindo-se a quantidade diária de água consumida da quantidade de água administrada, dividindo-se o valor encontrado pelo número de animais da caixa.

Após dois meses do início do tratamento, as ratas de cada grupo eram colocadas com ratos machos adultos, em uma proporção de quatro fêmeas para cada macho, durante a noite por um período de 12 horas. Os cinco animais restantes de cada grupo, tratado e não tratado, não foram acasalados para serem utilizados para a determinação da altura do epitélio

folicular da tireóide, já que a lactação por si só reduz a altura do epitélio folicular da tireóide (Miranda et al., 2001), dificultando, por este parâmetro, atestar o efeito de *feedback* negativo da tiroxina administrada sobre a glândula. Após o acasalamento, pela manhã, era realizada citologia vaginal nas ratas que estavam com os machos. A cópula era confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, e este dia era designado como dia 0. As fêmeas que não apresentaram espermatozóides na citologia vaginal eram colocadas novamente com machos na noite seguinte, até que se encontrasse espermatozóides na citologia vaginal.

A partir dos 19 dias de gestação até o momento da eutanásia, as fêmeas foram colocadas, isoladamente, nas caixas plásticas. Logo após o parto, foi realizada a sexagem (Fig.2) e a quantificação dos filhotes vivos e mortos de cada mãe. O peso médio dos filhotes machos e fêmeas foi determinado no dia do nascimento, e posteriormente, a cada 48 horas. Diariamente, eram verificados quantos filhotes tinham aberto os olhos na ninhada. A partir destes dados, foi calculada a média ponderada da idade de abertura dos olhos dos filhotes de cada ninhada.

O comportamento materno também foi avaliado, diariamente, durante os 21 dias de amamentação, quanto à presença ou não de um ou mais filhotes não aquecidos e não higienizados na ninhada.

Seis fêmeas dos grupos, tratado e controle, foram sacrificadas no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame. Os filhotes foram sacrificados com sobredose de pentobarbital sódico 2,5% (30 mg/Kg),

por via intra-peritoneal. O sacrifício das fêmeas foi realizado por punção cardíaca precedida por anestesia com pentobarbital sódico, por via intra-peritoneal. As fêmeas não gestantes tratadas e não tratadas foram sacrificadas da mesma forma ao final de todo o experimento.

### **4.3 Procedimentos comuns aos dois experimentos**

À necropsia, os pares de glândula mamária, abdominal caudal e inguinal (Fig.1), e a tireóide foram colhidas, fixadas em formol a 10%, neutro e tamponado, e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet, 1992). Nas ratas não gestantes foi colhida somente a tireóide. Cortes histológicos de 4 $\mu$ m da glândula mamária e da tireóide foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica.

Uma secção da tireóide corada em HE foi submetida à análise morfométrica para atestar o efeito de *feedback* negativo da tiroxina administrada sobre a glândula. Foi mensurado, ao acaso, a altura do epitélio de 30 folículos, em quatro pontos distintos, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio de uma ocular micrométrica, objetiva de 40 $\times$  e ocular de 10 $\times$ . Às médias foi aplicado um fator de correção obtido com a escala de uma lâmina micrométrica.

No segundo experimento, foi realizada a dosagem de T4 total plasmática, pela técnica da quimioluminescência<sup>2</sup> utilizando kits comerciais e seguindo as recomendações do fabricante. Nos animais não gestantes tratados e não

tratados foi realizada a dosagem de T4 total e T4 livre pela mesma técnica.

Nas secções histológicas da glândula mamária coradas pela HE foram determinadas, com objetiva de 20 $\times$  (primeiro experimento) e objetiva de 40 $\times$  (segundo experimento), ambos na ocular de 10 $\times$ , a porcentagem de epitélio, de tecido adiposo, de estroma e de secreção. Na glândula mamária obtida de ratas no quinto dia de desmame, a determinação da porcentagem dos componentes estruturais da glândula foi realizada em cortes histológicos corados pelo tricrômio de Masson, pela dificuldade, neste período, em se diferenciar o estroma do compartimento epitelial em secções coradas pela hematoxilina-eosina. A contagem foi determinada em um total de 40 campos escolhidos aleatoriamente, que abrangiam toda a área da secção histológica. Para determinação dessas variáveis foi realizada a captura de imagens em câmera digital Spot Insign Color adaptado a um Microscópio Olympus BX-40, e utilizado o software de captura SPOT<sup>®</sup> versão 3.4.5. Utilizou-se o software Corel DRAW<sup>®</sup> versão 7.468 para análise das imagens. Foram determinados 25 pontos equidistantes no campo da imagem histológica obtida, com contabilização de 1000 pontos por lâmina examinada.

Em secções histológicas da glândula mamária coradas pelo Giemsa foi determinado, com objetiva de 40 $\times$  e ocular de 10 $\times$ , o número de mastócitos/campo. A contagem foi determinada em um total de 150 campos escolhidos aleatoriamente, em toda a área da secção histológica.

---

<sup>2</sup> Immulite, DPC, Los Angeles, USA

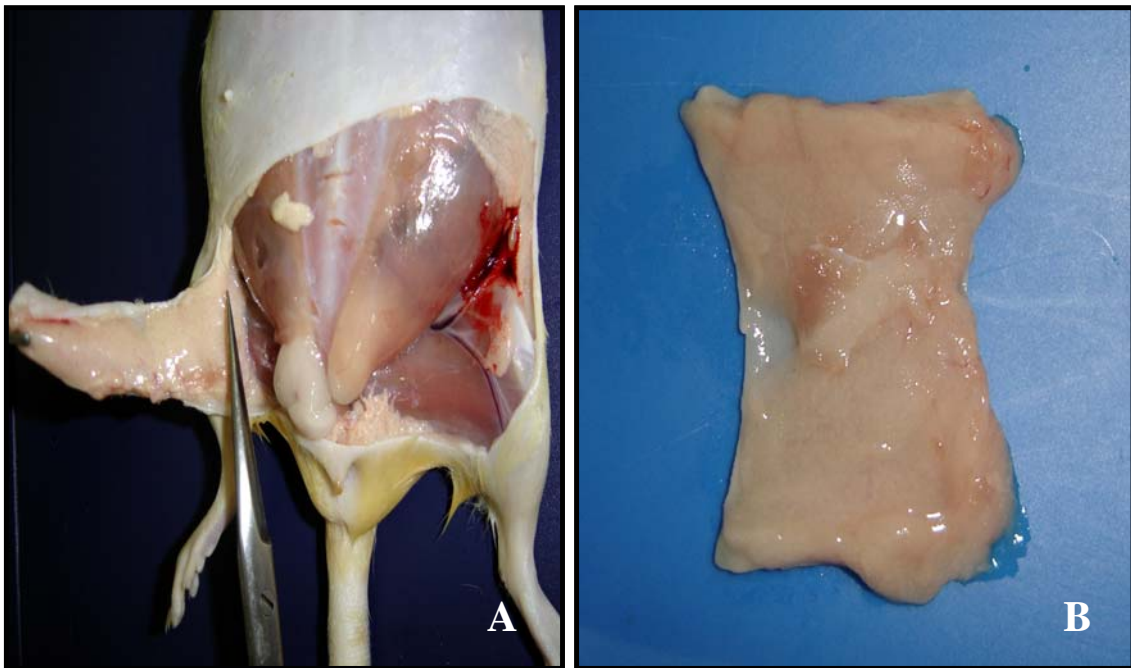


Figura 1. A) Rata gestante, colheita dos pares da glândula mamária abdominal caudal e inguinal. B) Fragmento dos pares da glândula mamária abdominal caudal e inguinal colhido de rata gestante.

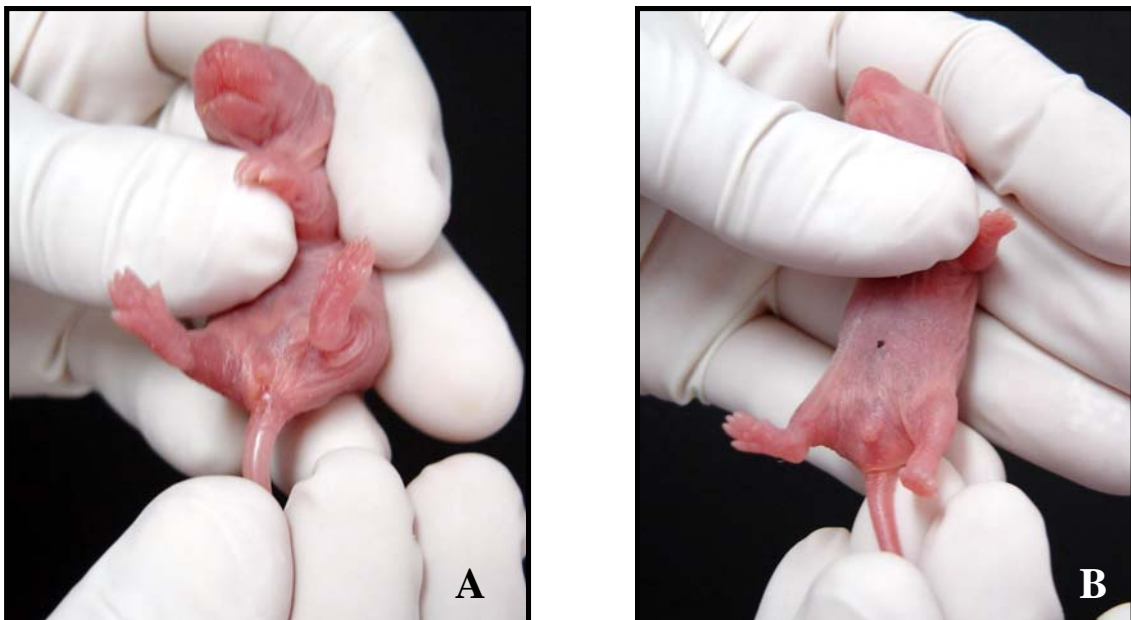


Figura 2. Filhote de rata. Sexagem de filhotes, no dia do nascimento. A) Filhote fêmea, vulva próxima ao ânus. B) Filhote macho, genitália protuberante e mais cranial, quando comparada à fêmea.

O número de campos utilizados para análise morfométrica descrita anteriormente foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra que os originou. Em um corte histológico da glândula mamária do grupo não tratado foi determinada a porcentagem de epitélio, de tecido adiposo, de estroma e de secreção em 100 campos. A seguir os dados foram sorteados ao acaso em dez grupos. Foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação de cada variável em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 campos. Após verificar que o desvio padrão e o coeficiente de variação se estabilizavam em torno de 40 campos, este número foi adotado para se determinar as porcentagens das estruturas do tecido mamário.

A atividade proliferativa e a detecção de apoptose na glândula mamária foram avaliadas pelo estudo imunoistoquímico com a utilização do marcador de proliferação celular CDC47-Clone 47DC141 (NeoMarkers) e o anticorpo anti-caspase-3 Clone RB-1197-P (NeoMarkers)<sup>3</sup>, respectivamente.

Para a análise imunoistoquímica foram obtidos cortes histológicos de 4µm da glândula mamária. Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase<sup>4</sup>, sendo empregada a técnica de recuperação antigênica através da utilização de solução Retrieval, durante 20 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora com o anticorpo primário (CDC47 -

diluição de 1:200 ou Caspase 3 – 1:300)<sup>5</sup> e por 15 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio<sup>6</sup>, anticorpo secundário<sup>7</sup> e estreptavidina peroxidase<sup>8</sup>. O cromógeno utilizado foi o DAB<sup>9</sup>, em incubação durante 10 minutos. As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris.

Como controle positivo interno para o CDC47 utilizou-se a própria pele da glândula mamária e como controle positivo para a caspase 3 foram utilizados cortes de baço de ratas previamente testados. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS.

A quantificação do número médio/campo de células marcadas pelo anticorpo CDC47 e do número médio/campo de células marcadas pelo anticorpo caspase 3 foi realizada em 10 campos. A contagem foi determinada, com objetiva de 60×, em campos escolhidos aleatoriamente, que abrangiam toda a área da secção histológica. Para a quantificação também foi realizada a captura de imagens em câmara digital Spot Insign Color adaptado a um Microscópio Olympus BX-40, e utilizado o software de captura SPOT<sup>®</sup> versão 3.4.5. Utilizou-se o software Corel DRAW<sup>®</sup> versão 7.468 para análise das imagens.

O delineamento utilizado, nos dois experimentos, foi inteiramente ao acaso com fatorial 2×3 (dois grupos × 3 períodos). Para cada variável, a média e

---

<sup>3</sup>Dako, USA

<sup>4</sup> Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use- Lab Vision.

<sup>5</sup> Novacastra Laboratories, United Kingdom

<sup>6</sup> Ultra Vison Block, Lab Vision

<sup>7</sup> Biotin Goat, Lab Vision

<sup>8</sup> Streptavidin Peroxidase, Lab Vision

<sup>9</sup> DAB Substrate System, Lab Vision

o desvio padrão foram determinados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA do programa estatístico Instat<sup>10</sup> e as médias foram comparadas pelo teste SNK. O peso dos filhotes foi submetido à análise de covariância a fim de retirar o efeito do tamanho da ninhada no peso médio dos filhotes. A correlação entre o número de mastócitos e a porcentagem de epitélio e de tecido conjuntivo da glândula mamária foi verificada. O comportamento materno foi avaliado pelo teste de  $X^2$ , considerando-se a presença ou a ausência de ninho, presença ou ausência de filhotes sujos e presença ou ausência de filhotes hipotérmicos. A idade de abertura dos olhos dos filhotes e o consumo de água e ração foram analisados pelo teste t não pareado (Sampaio, 2002).

## 5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1. Experimento 1

#### 5.1.1. Histomorfometria da tireóide e consumo de água e ração

A tireóide dos animais do grupo controle aos sete, 14 e 19 dias de gestação apresentava-se com folículos redondos ou ovais, de tamanhos variados, preenchidos por colóide pouco denso, e revestidos por epitélio ora cuboidal ora colunar. Já a tireóide das ratas tratadas com tiroxina apresentava folículos redondos ou ovais, grandes, preenchidos por grande quantidade de colóide e revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso (Fig.3). A diferença entre grupos foi

confirmada pela morfometria, que demonstrou redução significativa da altura do epitélio folicular da tireóide das ratas tratadas com tiroxina em todo o período gestacional (gráfico 1, anexo 7.1.1, Fig.3).

A redução do epitélio folicular das tireóides de ratas tratadas com tiroxina, já era esperada, pois a tiroxina foi administrada ao animal, em quantidade maior do que a fisiológica, o que resulta em elevação da concentração sérica de tiroxina, que exerce *feedback* negativo com o hipotálamo e com a hipófise, diminuindo a produção de TRH e de TSH, respectivamente. Assim, pode-se dizer que os animais do grupo tratado apresentavam hipertireoidismo iatrogênico e as suas tireóides estavam em estado inativo, caracterizado pelo achatamento do epitélio folicular e aumento da quantidade de colóide, devido à redução da síntese e secreção hormonal (Dickson, 1993; Serakides et al., 1999).

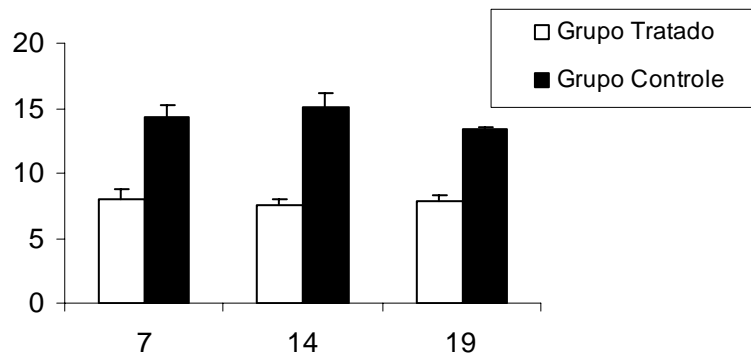
Clinicamente, as ratas tratadas com tiroxina apresentavam pêlos arrepiados, não se aglomeravam dentro da caixa, eram agressivas e apresentavam polifagia e polidipsia, sinais clínicos freqüentemente observados no hipertireoidismo (Trivalle, 1996). Durante os dois meses de tratamento e durante todo o período gestacional a média do consumo diário individual de ração (gráfico 2, anexo 7.1.2) e de água (gráfico 3, anexo 7.1.2) foi significativamente maior no grupo tratado. A partir do consumo médio de água/animal/dia, estimou-se que a dose diária de tiroxina/animal/dia foi de  $80,28\mu\text{g} \pm 7,07$ . Sabe-se que 70 a 80% da tiroxina administrada, via oral, é absorvida (Nobre et al, 2004), ou seja, no mínimo  $56,2\mu\text{g}$  de tiroxina neste

<sup>10</sup> Graph Pad Software, Versão 3.00, 32 Win 95/NT, Created December 23 1997.

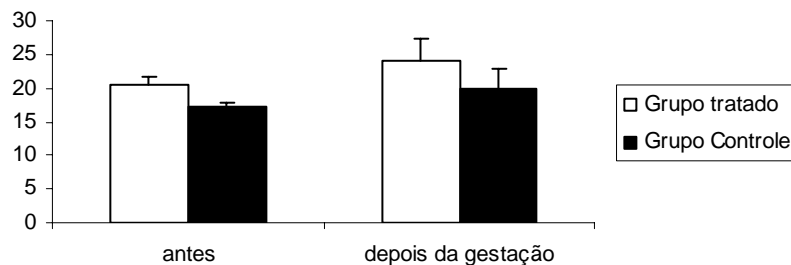
caso foi absorvida. Esta dose é suficiente para induzir o hipertireoidismo em ratas (Serakides et al., 1999). Utilizando doses bem menores (20µg de tiroxina/animal/dia),

Varas et al. (2002) induziu satisfatoriamente o estado hipertireóideo em ratas.

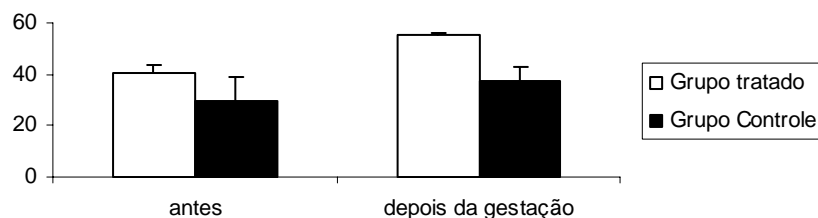
**Gráfico 1. Altura do epitélio folicular (µm) das tireóides de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



**Gráfico 2. Média do consumo diário individual de ração (g) nos grupos controle e tratado com tiroxina antes e durante a gestação.**



**Gráfico 3. Média do consumo diário individual de água (ml) nos grupos controle e tratado com tiroxina antes e durante a gestação.**



Com base nesses dados, nos sinais clínicos dos animais do grupo tratado e

na avaliação histomorfométrica da tireóide pode-se afirmar que as ratas

tratadas com tiroxina manifestaram os sinais do hipertireoidismo.

### **5.1.2. Histomorfometria da glândula mamária**

Aos sete dias de gestação a glândula mamária das ratas do grupo controle apresentava ninhos de células epiteliais envoltos por grande quantidade de tecido adiposo. As células epiteliais eram cuboidais com limites citoplasmáticos indefinidos e núcleo com cromatina frouxa. Algumas vezes, essas células já se dispunham em alvéolos. Os ductos eram constituídos por epitélio pseudoestratificado constituído por células cuboidais e envoltos por moderada quantidade de estroma. Alguns ductos apresentavam discreta quantidade de material amorfo, acelular e ligeiramente basofílico no lúmen. Entremeadado ao estroma havia moderada quantidade de mastócitos e discreta quantidade de eosinófilos. A glândula mamária das ratas do grupo tratado aos sete dias de gestação apresentava morfologia semelhante à das ratas controle. Apesar de haver maior porcentagem de epitélio e menor porcentagem de tecido adiposo, não foram observadas diferenças significativas entre grupos com relação a nenhum dos componentes estruturais da glândula (Fig.4, gráficos 4-7, anexos 7.1.3-7.1.6).

Aos 14 dias de gestação a glândula mamária das ratas do grupo controle apresentava ninhos de células epiteliais cuboidais com limites citoplasmáticos indefinidos e núcleo com cromatina frouxa. Diferente dos sete dias, o citoplasma apresentava-se vacuolizado e as células epiteliais já se organizavam em padrão alveolar com pequena quantidade de secreção em seu interior. Os ductos eram constituídos por epitélio

pseudoestratificado de células cuboidais e com o lúmen contendo moderada quantidade de secreção. Entremeadado ao estroma, observa-se discreta quantidade de mastócitos. As ratas do grupo tratado apresentaram maior porcentagem de epitélio constituído por células volumosas com citoplasma claro e intensamente vacuolizado. Além disso, havia maior quantidade de secreção no interior de ductos e alvéolos e menor porcentagem de tecido adiposo que a das ratas do grupo controle. Apesar dessas diferenças, a análise morfométrica demonstrou diferença significativa entre grupos somente quando da análise da porcentagem de tecido adiposo (Fig.5, gráfico 5, anexo 7.1.4).

Dois dias antes do parto, ou seja, aos 19 dias de gestação a glândula mamária das ratas do grupo controle apresentava supremacia de epitélio em relação ao tecido adiposo. As células epiteliais apresentavam-se cuboidais com limites citoplasmáticos indefinidos, citoplasma intensamente vacuolizado e núcleo com cromatina frouxa. O epitélio formava alvéolos bem desenvolvidos contendo grande quantidade de secreção láctea. Os ductos também se apresentavam distendidos e com moderada secreção láctea. Entremeadado ao estroma, que se apresentava bem menos expressivo em comparação aos períodos anteriores, havia discreta quantidade de mastócitos. As ratas tratadas com tiroxina apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo controle. Havia maior porcentagem de epitélio, menor porcentagem de tecido adiposo e alvéolos e ductos mais distendidos e com maior quantidade de secreção (Fig.6, gráficos 4-6, anexos 7.1.3-7.1.5).

Em resumo, apesar da quantidade de epitélio mamário ter sido aparentemente

maior no grupo tratado com tiroxina em todo o período gestacional, esta diferença somente foi significativamente maior ao final da gestação. Esses achados corroboram com Griffith e Turner. (1961) e Rosato et al. (1992). No entanto, a atividade secretora do epitélio mamário das ratas do grupo tratado já era evidente aos 14 dias, momento em que quase não havia secreção na glândula mamária das ratas controle, intensificando-se aos 19 dias. Este resultado sugere que a administração de tiroxina tenha induzido diferenciação precoce e maior das células epiteliais em comparação ao grupo controle. A partir destes achados os seguintes questionamentos são suscitados: mães hipertireóideas têm maior capacidade de produzir leite? A maior porcentagem de epitélio e de secreção na glândula mamária de ratas tratadas com tiroxina ocorre devido ao aumento da proliferação ou da diferenciação das células do epitélio mamário? Esses questionamentos serão esclarecidos posteriormente com a determinação pela imunoistoquímica da taxa de proliferação do epitélio mamário e com o acompanhamento do desenvolvimento pós-natal dos filhotes de mães tratadas com tiroxina.

### **5.1.3. Proliferação celular e apoptose no epitélio mamário**

O gene CDC47, membro da família MCM, é o responsável por permitir somente uma única duplicação do DNA por ciclo celular. A identificação de núcleos que estejam expressando o CDC47 é utilizada para a determinação das células que estão em duplicação (Dalton e Whitbread, 1995; Hiraiwa et al., 1996).

Por meio da expressão do CDC47 observa-se que tanto no grupo tratado

com tiroxina quanto no grupo controle, a atividade proliferativa das células epiteliais mamárias é mais intensa aos sete dias de gestação reduzindo-se significativamente nos períodos subsequentes. Interessante, é que apesar da porcentagem de epitélio ter sido significativamente maior no grupo tratado aos 19 dias de gestação, o índice de proliferação das células epiteliais mamárias não diferiu significativamente entre grupos em nenhum período gestacional (Fig.7-9, gráfico 8 e anexo 7.1.7).

O mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos no ciclo celular ainda é bastante controverso. Sabe-se que, em concentrações fisiológicas, eles estimulam a síntese de DNA em hepatócitos, por aumentarem os níveis de ciclina D1 e cdk 4, que controlam a fase G1 e também por estimularem a atividade de proteínas, como o complexo ciclina E/A – cdk, que estão envolvidos na progressão da fase G1 para a fase S (Incerpi et al., 2005, Alisi et al., 2004). Por outro lado, o tratamento, *in vitro*, de hepatócitos com hormônios tireoidianos ativa enzimas inibitórias do estímulo na fase S do ciclo celular, por reprimirem a atividade da ciclina - cdk2 (Alisi et al., 2004). Além disso, o tratamento de uma linhagem de células ductais pancreáticas humanas com T3 interrompeu a proliferação celular e aumentou o número dessas células na fase G0/G1 do ciclo celular. Além disso, evidências indicaram que essas células eram capazes de secretar maior quantidade de insulina (Misiti et al., 2005). Também em células tumorais de neuroblastoma o T3 inibiu a proliferação celular e bloqueiou a expressão da ciclina D1 pelo tumor (García-Silva e Aranda, 2004).

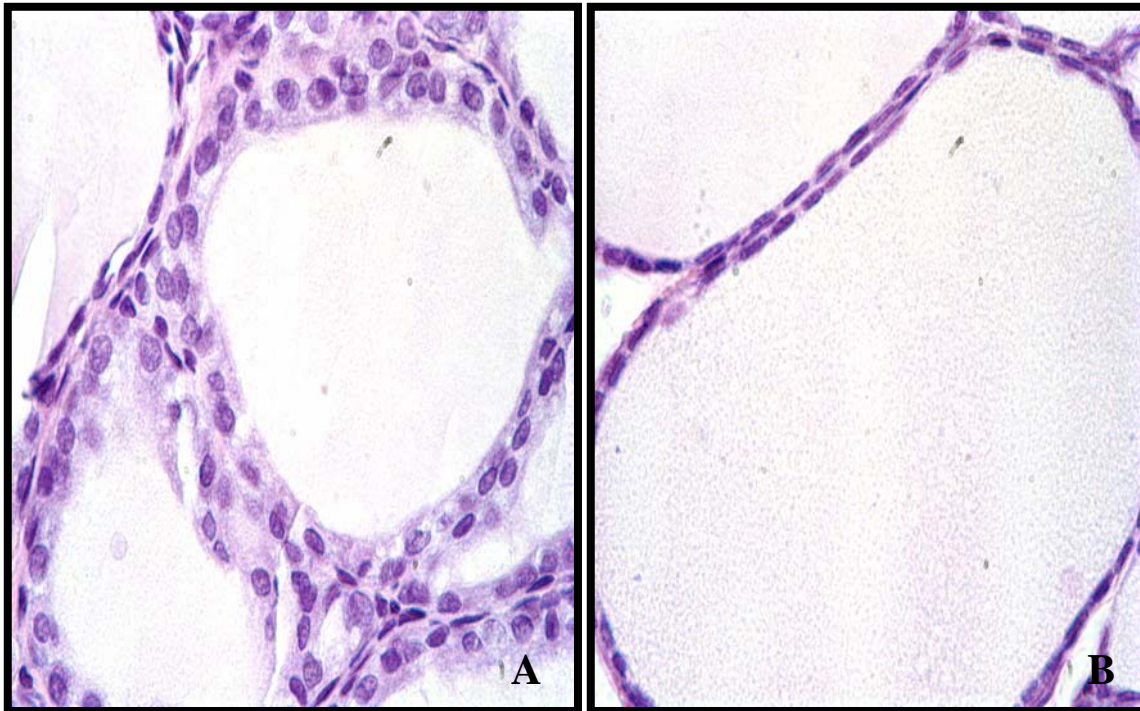


Figura 3. Tireóide das ratas do experimento 1. HE, 309,86x. A) Grupo controle, folículos redondos ou ovais revestidos por epitélio cuboidal. B) Grupo tratado com tiroxina, folículos ovais, grandes, preenchidos por grande quantidade de colóide e revestidos por epitélio pavimentoso.

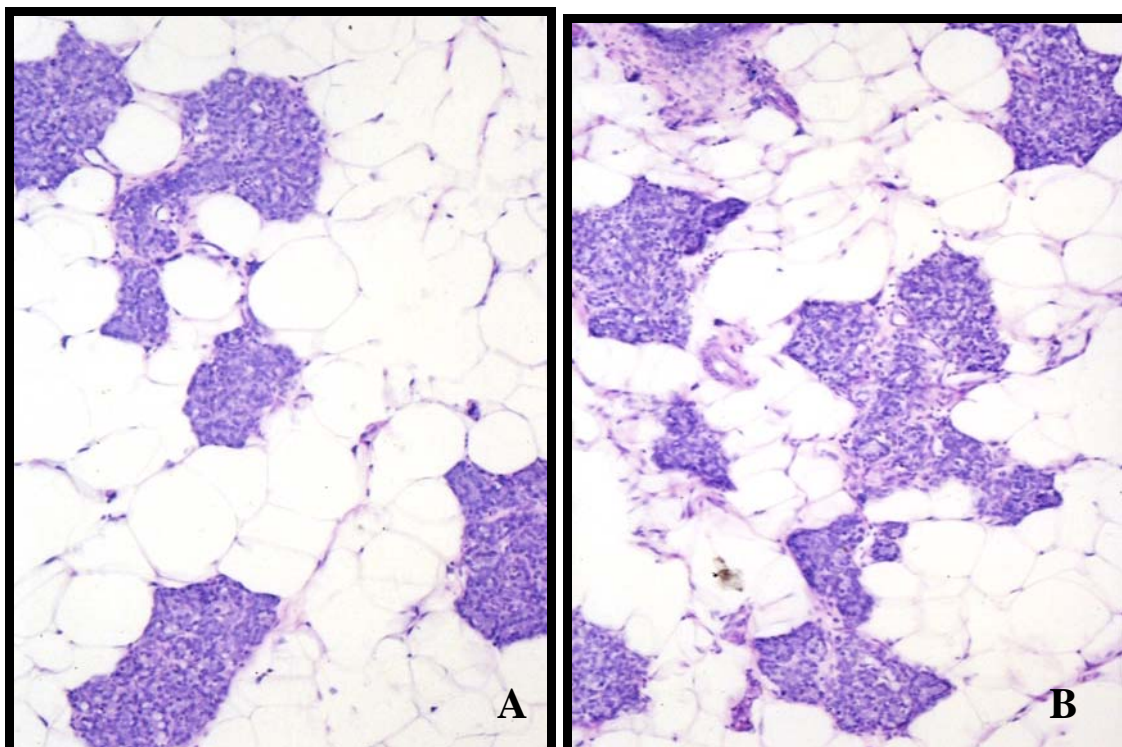


Figura 4. Glândula mamária de ratas, no 7º dia de gestação, experimento 1. HE, 117x. A) Grupo controle, ninhos de células epiteliais envoltos por grande quantidade de tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina, ninhos de células epiteliais envoltos por grande quantidade de tecido adiposo.

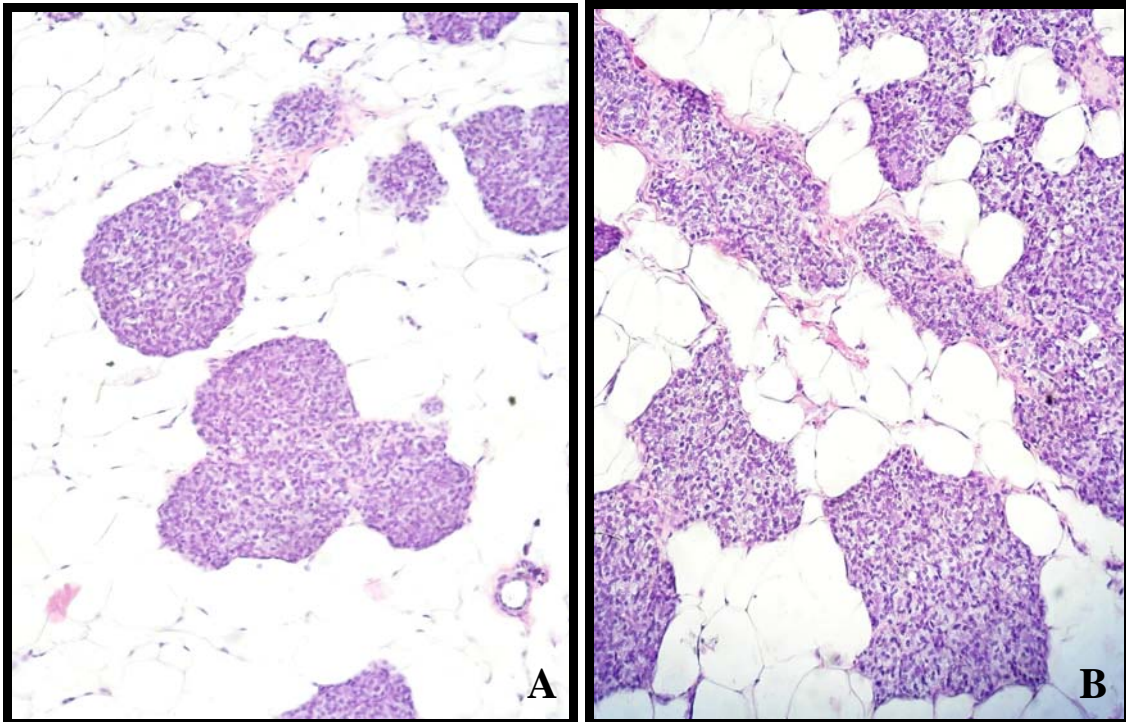


Figura 5. Glândula mamária de ratas, no 14º dia de gestação, experimento 1. HE, 119,28×. A) Grupo controle, ninhos de células epiteliais envolvidos por grande quantidade de tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina, ninhos de células epiteliais envolvidos por pequena quantidade de tecido adiposo.

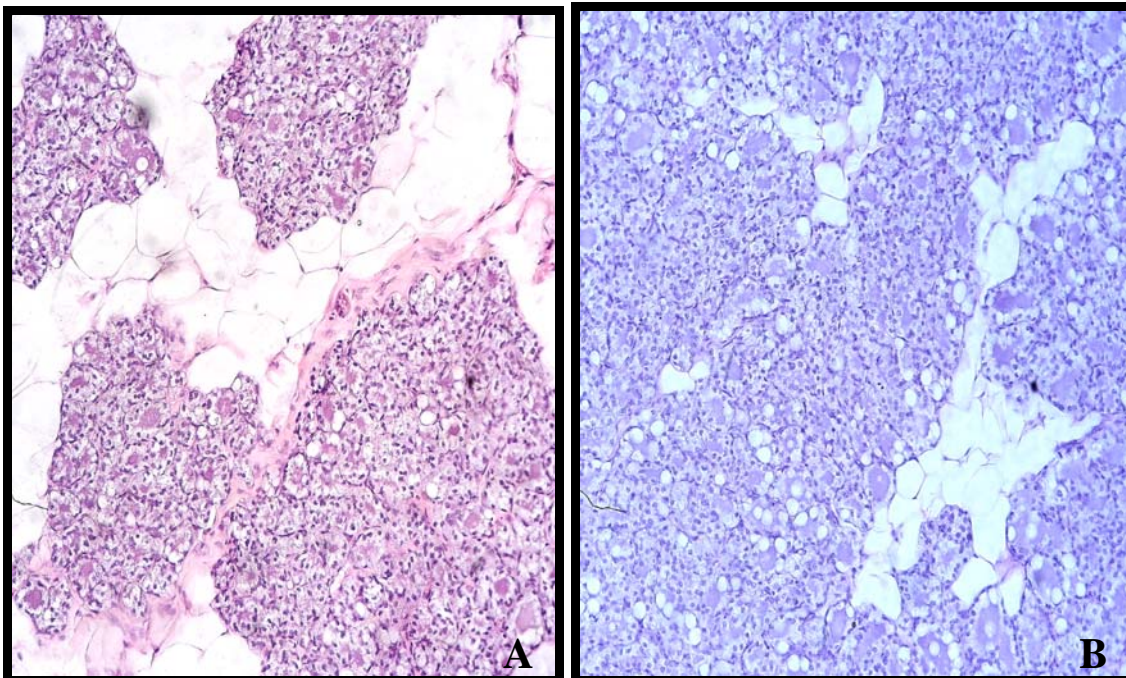
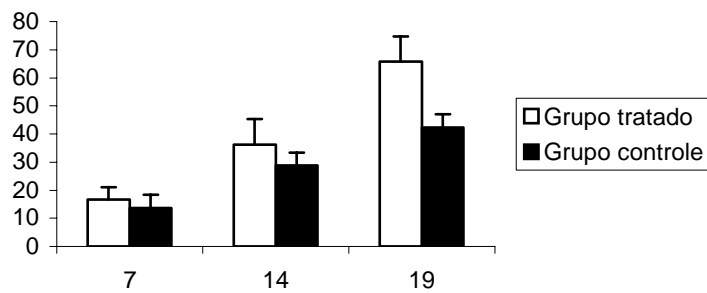
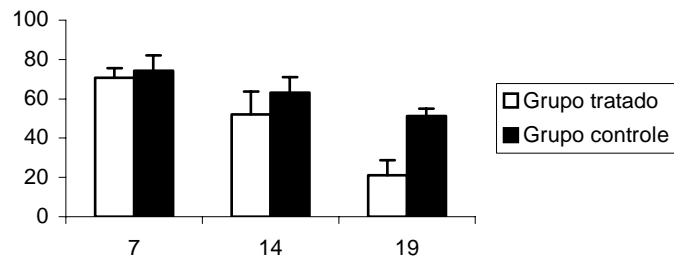


Figura 6. Glândula mamária de ratas, no 19º dia de gestação, experimento 1. HE, 130×. A) Grupo controle, supremacia de epitélio em relação ao tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina com maior porcentagem de epitélio em relação ao grupo controle.

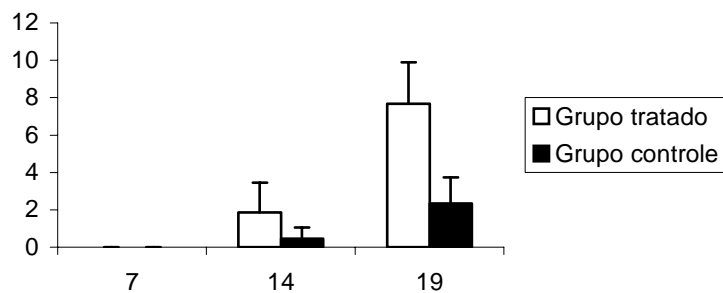
**Gráfico 4. Porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



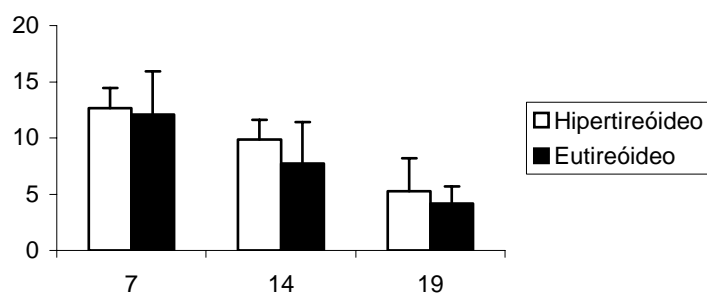
**Gráfico 5: Porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



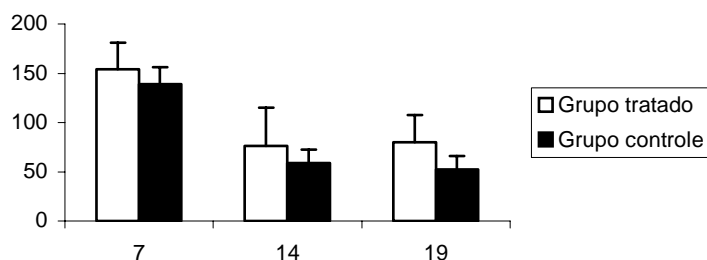
**Gráfico 6. Porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



**Gráfico 7. Porcentagem de estroma na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



**Gráfico 8. Número médio de células epiteliais/campo com expressão de CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



A partir dos resultados aqui demonstrados e com base na literatura, mas contrariando a nossa hipótese inicial, conclui-se que o tratamento com tiroxina não altera o índice de proliferação celular, mas acelera a diferenciação das células epiteliais mamárias, já que as ratas tratadas com tiroxina apresentaram mais precocemente os primeiros sinais de lactogênese. Como a diferenciação das células do tecido mamário, a partir da segunda metade da gestação, caracteriza-se pela hipertrofia das células alveolares devido ao acúmulo intracelular de lipídeos e ao aumento no número de retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas secretórias e ribossomos, como preparo para a produção dos constituintes do leite (Joshi et al., 1986, Delouis e Richard,

1993, Masso-Welch et al., 2000), provavelmente a maior porcentagem de epitélio na glândula mamária das ratas tratadas com tiroxina aos 19 dias de gestação ocorreu devido à hipertrofia das células alveolares dessas ratas, assim como ocorreu com as células ductais pancreáticas do experimento de Misiti et al. (2005).

As caspases pertencem a uma família de proteases aspartato cisteína específica. A ativação dessas proteases é o evento principal e irreversível do processo de apoptose (Marti et al., 2000). A primeira caspase a ser ativada é a caspase 8, que desencadeia a liberação do citocromo c da mitocôndria, que por sua vez ativa a caspase 9 e a caspase 3, sendo que a caspase 8 pode ativar diretamente a caspase 3. Esta caspase é

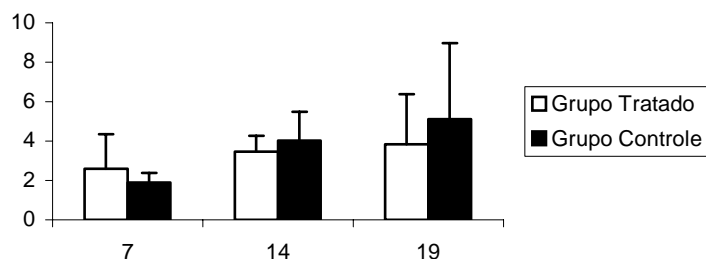
considerada a mediadora chave do processo de apoptose nas células de mamíferos, apresenta numerosos receptores citoplasmáticos e nucleares e também ativa a caspase 6. A ativação destas caspases resulta na liberação de endonucleases que provocam a fragmentação do DNA (Widtak, 2000). A identificação da caspase 3, pela imunistoquímica, tem sido utilizada para determinação das células em apoptose (Stute et al., 2004).

Sabe-se que, durante a gestação, também ocorre apoptose de células epiteliais da glândula mamária, visto que algumas células do tecido mamário, durante a gestação, expressam genes que estão relacionados com a apoptose

(Yi et al., 2004). No entanto, não se tem estudos quantificando-se a porcentagem de células em apoptose, na glândula mamária, durante a gestação. Observa-se também, carência na literatura sobre a ação dos hormônios tireoidianos na apoptose, na glândula mamária, durante a gestação.

A partir da expressão de caspase 3, pode-se inferir que o índice de apoptose é relativamente baixo durante a gestação e não altera significativamente entre os períodos estudados. Além disso, o tratamento com tiroxina não alterou significativamente a taxa de apoptose celular (gráfico 9, anexo 7.1.8).

**Gráfico 9. Número médio de células epiteliais/campo com expressão de caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**



#### **5.1.4. Número de mastócitos na glândula mamária**

Foi observada redução significativa do número de mastócitos do terço inicial para o final da gestação no grupo tratado com tiroxina. No entanto, o número de mastócitos na glândula mamária não diferiu entre grupos aos sete, 14 e 19 dias de gestação (Fig10,

Tab.1). Ou seja, apesar do tratamento com tiroxina alterar a porcentagem dos constituintes epiteliais da glândula mamária e de haver correlação negativa entre o número de mastócitos e a porcentagem de epitélio mamário (Tab.2), a administração de tiroxina não influencia o número de mastócitos da glândula mamária durante a gestação.

**Tabela 1. Número médio de mastócitos/campo na glândula mamária de ratas gestantes do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Grupo	Número médio de mastócitos/campo		
	7 dias	14 dias	19 dias
<b>Tratado</b>	5,89±1,4 <sup>Aa</sup>	4,78±1,42 <sup>Aa</sup>	3,57±0,55 <sup>Ba</sup>
<b>Controle</b>	4,67±0,97 <sup>Aa</sup>	5,40±1,4 <sup>Aa</sup>	4,23±1,11 <sup>Aa</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

Segundo Pery et al. (1985) e Gouon-Evans et al. (2002), a quantidade de mastócitos no tecido mamário diminui com o desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação. Acredita-se que a histamina endógena atue como mediadora do crescimento de carcinomas mamários experimentais, exercendo função no desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária normal de ratas (Bowrey et al., 2000). Mas caso a histamina proveniente dos mastócitos aumentasse o desenvolvimento da glândula mamária, não seria esperada correlação negativa entre estes dois componentes, tal como observado nesse estudo.

Observa-se também, correlação positiva do número de mastócitos com a porcentagem de estroma na glândula mamária (Tab.2), isto provavelmente ocorre, visto que, os mastócitos são encontrados, na maioria das vezes, entremeados ao tecido conjuntivo que circunda os ductos e vasos sanguíneos. Sendo assim, pode-se sugerir que o número de mastócitos não tenha diferido entre grupos pelo fato do tratamento com tiroxina não ter alterado a porcentagem de estroma em nenhum período gestacional.

## 5.2. Experimento 2

### 5.2.1. Morfofisiologia da tireóide e consumo de água e de ração

As tireóides dos animais do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina durante a lactação e após o desmame apresentavam-se com folículos redondos ou ovais, de tamanhos variados, preenchidos por colóide denso, e revestidos por epitélio ora cuboidal ora pavimentoso. Não houve diferença significativa na altura do epitélio folicular da tireóide entre os dois grupos (Fig.11, gráfico 10, anexo 7.2.1).

A altura do epitélio das tireóides nos dois grupos pode ter sido igual, apesar do grupo tratado estar recebendo tiroxina exógena, devido ao estado pouco ativo da tireóide durante a lactação, ou seja, a lactação, por si só, reduz a altura do epitélio (Miranda et al., 2001). Conseqüentemente, mesmo que a concentração de TSH nas ratas do grupo tratado diminua devido à tiroxina exógena e ao *feedback* negativo, provavelmente a altura do epitélio da tireóide não diminuiu por ter atingido o limite adaptativo máximo da glândula. A altura média do epitélio folicular das tireóides do grupo controle neste segundo experimento, em todos os períodos, foi numericamente menor do que a altura do epitélio das tireóides do grupo tratado com tiroxina do primeiro experimento, onde foi utilizada inclusive uma dose de tiroxina muito maior.

Mas os grupos não lactantes tratados com tiroxina apresentaram altura do epitélio folicular significativamente menor do que a altura do epitélio da tireóide dos animais não tratados (Fig.12, gráfico 11, anexo 7.2.2). Vale ressaltar que o manejo desses animais foi semelhante ao dos demais animais, inclusive quanto à dose, via e período de administração de tiroxina.

A partir do resultado da morfometria da tireóide partiu-se para a dosagem de T4 total plasmática. No entanto, os animais do grupo tratado apresentaram concentração de T4 total significativamente maior somente no 2º dia de lactação (gráfico 12, anexo 7.2.3). É provável que não tenha havido diferença significativa na concentração de T4 total plasmática entre os grupos no 21º dia de lactação e no 5º dia de desmame, visto que durante a lactação a concentração plasmática dos hormônios tireoidianos diminui (Jack et al., 1994, Prado et al., 1994, Slebodzinski et al., 1999, Ramos et al., 2000) e o número de receptores para T3 (Prado et al., 1994) e a quantidade de 5' desiodinase na glândula mamária aumenta, sendo este rearranjo proporcional a intensidade lactacional (Kahl et al., 1995, Capuco et al., 1999, Slebodzinski et al., 1999, Ramos et al., 2000).

No grupo de ratas não lactantes a concentração de T4 livre do grupo tratado com tiroxina somente não foi significativamente maior porque o

número de cinco animais por grupo, para dosagem hormonal, é considerado pequeno e insuficiente pela variação individual (gráfico 13, anexo 7.2.4). Com base nestes resultados, optou-se por não denominar os animais do grupo tratado com tiroxina como hipertireóideo, apesar dos animais do grupo tratado com tiroxina apresentarem maior concentração plasmática de T4 total no segundo dia de lactação.

A partir do consumo médio de água ingerido por animal, por dia, estimou-se que a dose diária de tiroxina ingerida por animal foi de  $60,43\mu\text{g} \pm 8,82$ , durante a indução e de  $39,72\mu\text{g} \pm 8,85$ , durante a gestação e lactação. Como descrito anteriormente, apenas 70 a 80% da tiroxina, administrada por via oral é absorvida (Nobre et al., 2004), ou seja, é provável que a dose mínima de tiroxina absorvida tenha sido de  $42,3\mu\text{g}$  durante o período de indução e de  $27,8\mu\text{g}$  durante a gestação e a lactação. Em comparação ao primeiro experimento, foi realizada redução de aproximadamente 32,85% na dose de tiroxina durante a indução, e posteriormente, de aproximadamente 52,14% durante a gestação e lactação. Esta redução foi feita com o objetivo de se evitar a morte dos filhotes por uma overdose tiroxina, via leite, como ocorreu no experimento de Rosato et al. (1992), em que os filhotes morreram dentro de 48 horas pós-parto.

**Tabela 2. Coeficiente de correlação entre o número de mastócitos da glândula mamária de ratas gestantes e a porcentagem de epitélio e conjuntivo.**

Variável	Número de Mastócitos
Porcentagem de epitélio	-0,39*
Porcentagem de estroma	0,36*

\*p<0,05

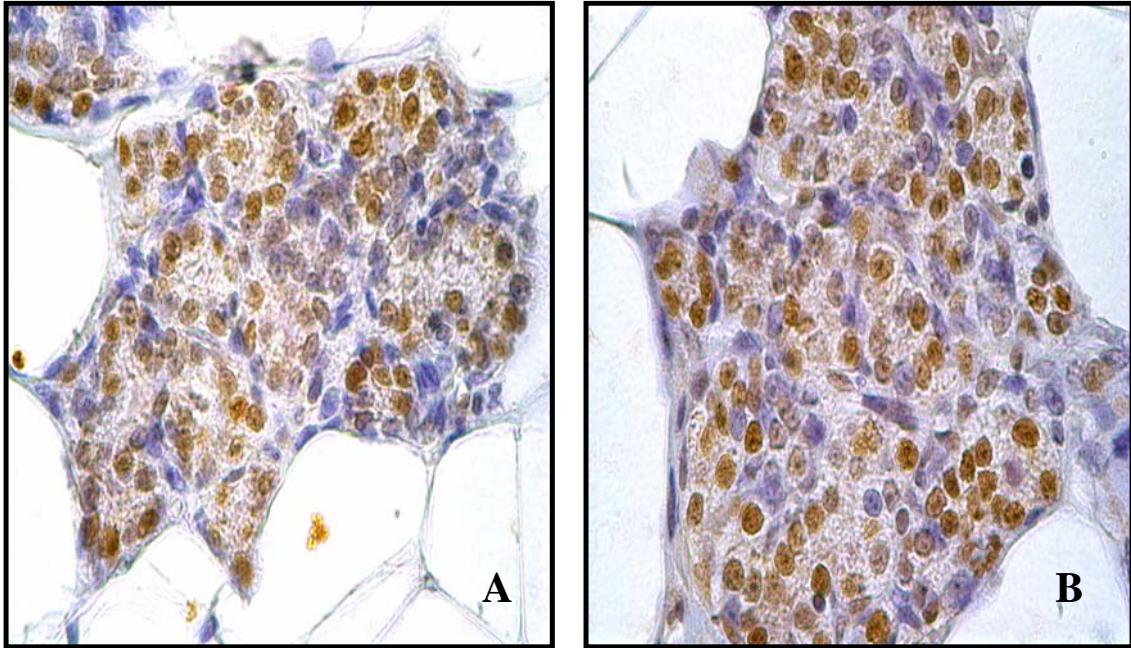


Figura 7. Glândula mamária de ratas, no 7º dia de gestação, experimento 1. Imunomarcagem para CDC-47, estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 607,86 $\times$ . As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle. B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.

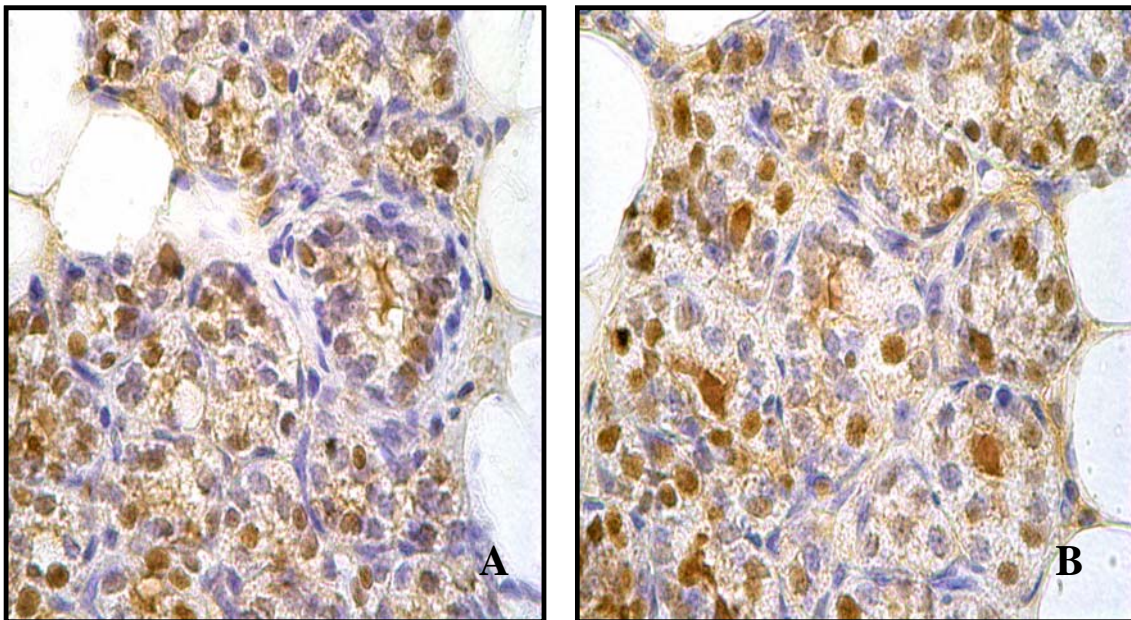


Figura 8. Glândula mamária de ratas, no 14º dia de gestação, experimento 1. Imunomarcagem para CDC-47, estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 580 $\times$ . As células marcadas pelo anticorpo CDC 47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle. B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.

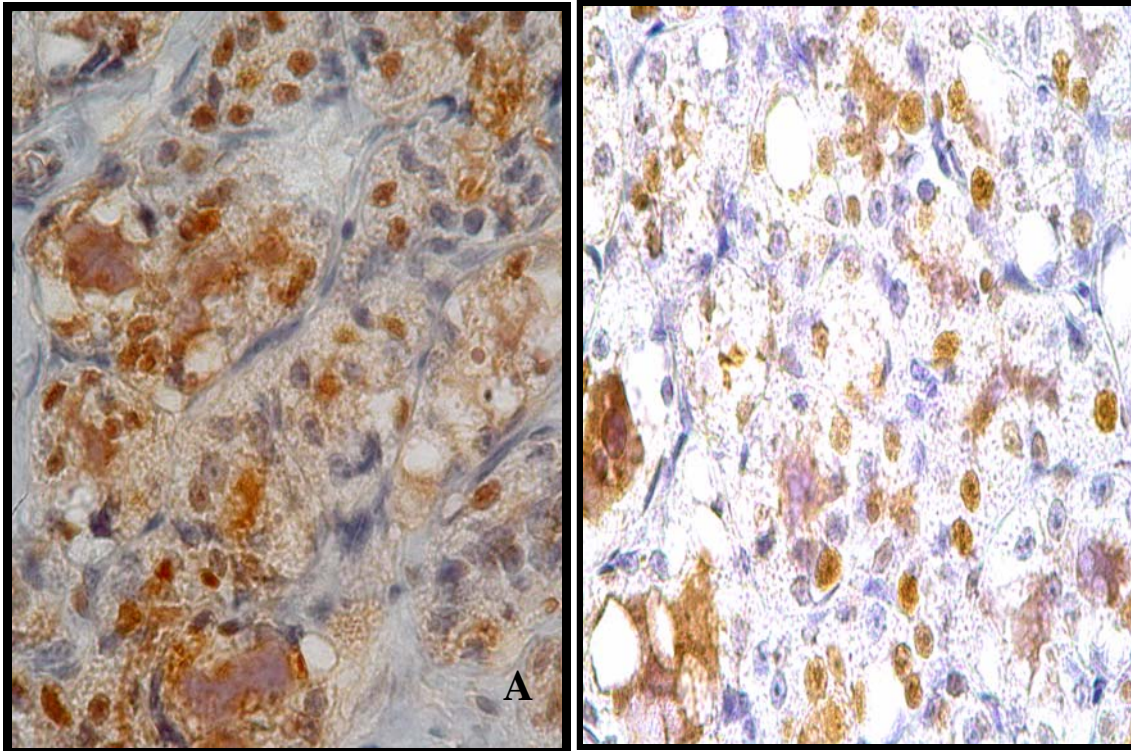


Figura 9. Glândula mamária de ratas, no 19º dia de gestação, experimento 1. Imunomarcacão para CDC-47, estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloraçã por hematoxilina de Harris, 583,57x. As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloraçã amarronzada. A) Grupo controle. B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.

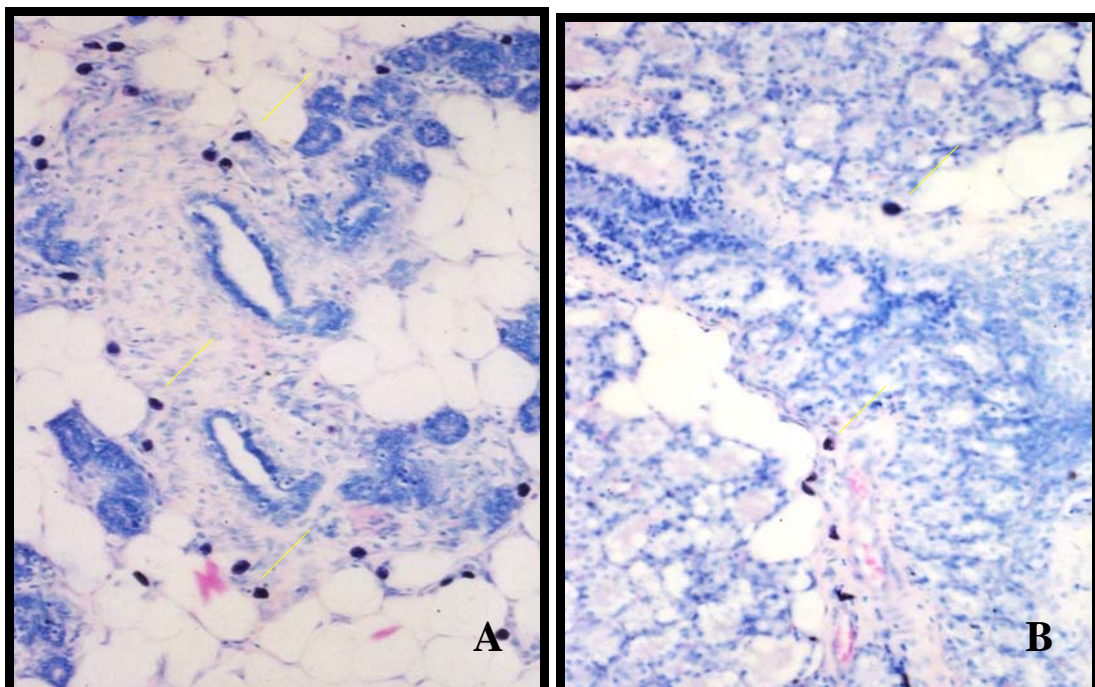


Figura 10. Glândula mamária de ratas, experimento 1, Giemsa, 249,43x. A) Grupo controle, 7 dias de gestaçã, grande número de mastócitos/campo (setas). B) Grupo controle, 19 dias de gestaçã, pequeno número de mastócitos/campo (setas).

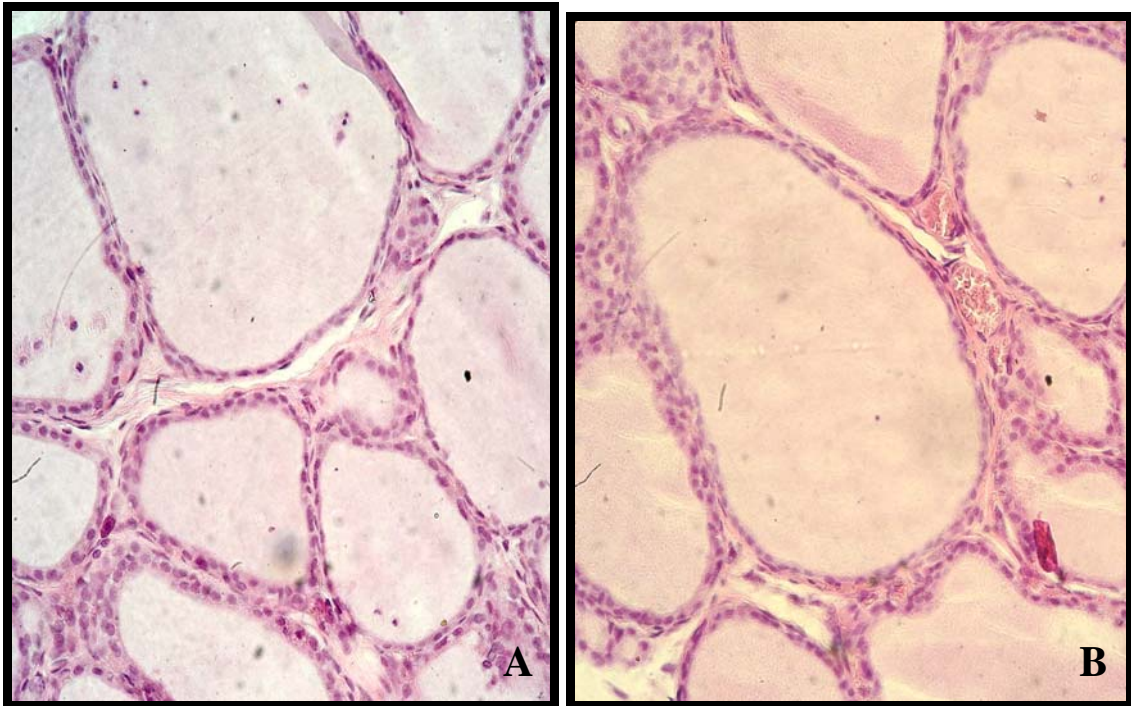


Figura 11. Tireóide das ratas lactantes do experimento 2. HE, 312,43×. A) Grupo controle, foliculos redondos ou ovais, revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso. B) Grupo tratado com tiroxina, foliculos redondos ou ovais, revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso, semelhante ao grupo controle.

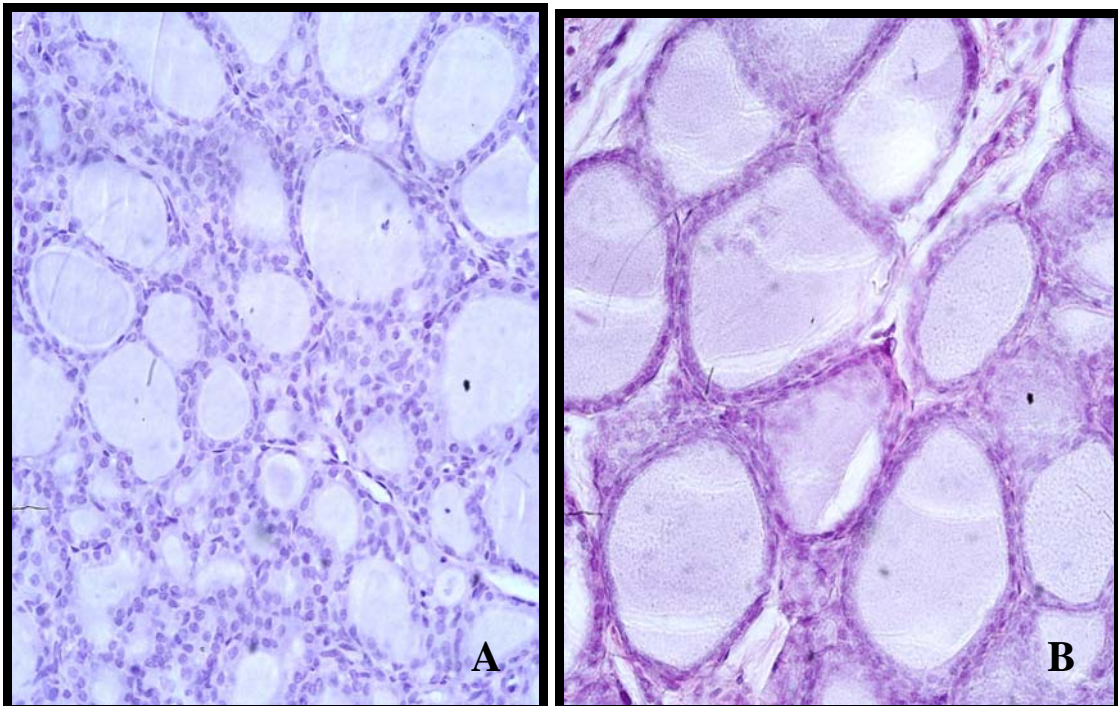
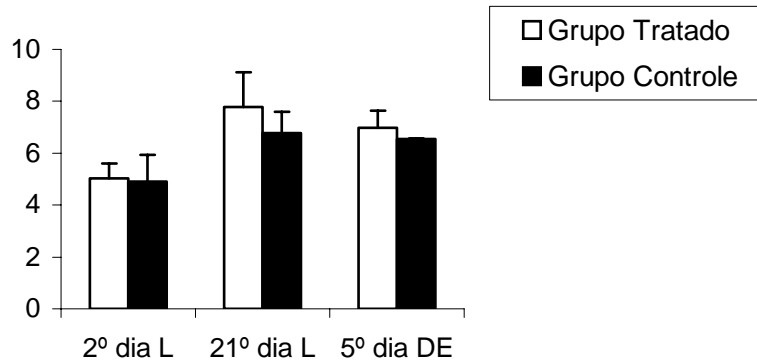
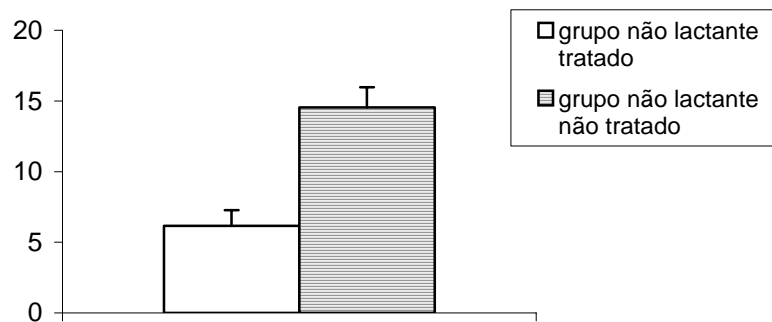


Figura 12. Tireóide das ratas não lactantes do experimento 2. HE, 312,86× A) Grupo não tratado, foliculos redondos ou ovais, de tamanhos variados e revestidos por epitélio cuboidal. B) Grupo tratado com tiroxina, foliculos ovais, grandes, preenchidos por grande quantidade de colóide e revestidos por epitélio predominantemente pavimentoso.

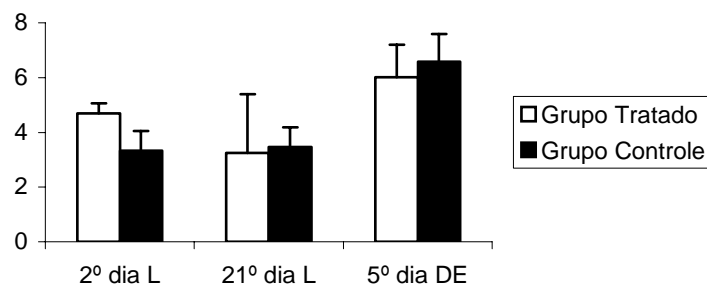
**Gráfico 10. Altura média do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ ) das tireóides de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



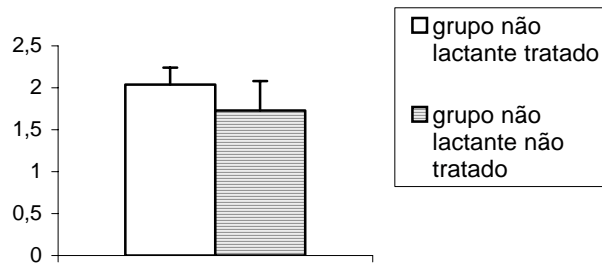
**Gráfico 11. Altura média do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ ) das tireóides de ratas não lactantes não tratadas e tratadas com tiroxina.**



**Gráfico 12. Concentração plasmática de T4 total ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) nas ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



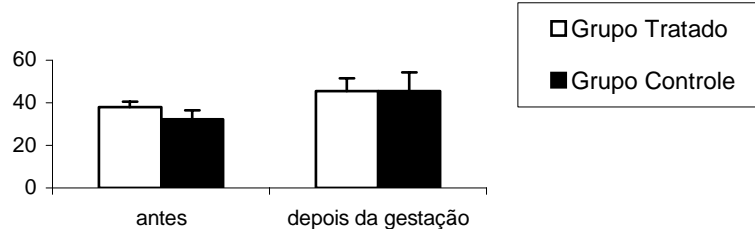
**Gráfico 13. Concentração plasmática de T4 livre (nanog/dl) nas ratas dos grupos não lactante tratado com tiroxina e não tratado.**



O consumo médio de água, durante os dois meses de tratamento e durante a gestação, foi estatisticamente semelhante no grupo tratado e no grupo controle (gráfico 14, anexo 7.2.5). Já o consumo de ração no grupo tratado com tiroxina foi significativamente maior

durante a indução, mas semelhante ao do grupo controle durante a gestação (gráfico 15, anexo 7.2.5). Em comparação ao primeiro experimento, este abrandamento nos sinais clínicos já era de se esperar, devido à redução da dose de tiroxina administrada.

**Gráfico 14. Consumo diário individual de água (ml) das ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina antes e durante a gestação.**



**Gráfico 15. Consumo diário individual de ração (g) das ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina antes e durante a gestação.**



### 5.2.2. Histomorfometria da glândula mamária

No 2<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de lactação a glândula mamária, independentemente dos grupos, apresentava alvéolos muito distendidos e repletos por secreção láctea e revestido por epitélio pavimentoso. Os ductos também se apresentavam um pouco distendidos e às vezes repletos de secreção e revestidos por epitélio pseudoestratificado. Havia ainda moderada quantidade de tecido adiposo entremeado aos alvéolos. O estroma era moderado. A análise morfométrica comprovou a semelhança da glândula mamária entre os grupos, não havendo nenhuma diferença significativa entre os componentes estruturais (Fig. 13 e 14, gráficos 16 a 19, anexos 7.2.6-7.2.9).

No 5<sup>o</sup> dia após o desmame a morfologia e morfometria da glândula mamária mais uma vez não apresentou diferenças significativas entre grupos (Fig. 15, gráficos 16 a 19, anexos 7.2.6-7.2.9). Os alvéolos distribuíam-se desorganizadamente pela secção histológica, os lúmens alveolares apresentavam pequena quantidade de secreção láctea com células epiteliais descamadas com núcleos pequenos e condensados ou fragmentados, características de apoptose. As células do epitélio alveolar apresentam-se cuboidais, de permeio a células mioepiteliais e moderada quantidade de estroma. Havia ainda grande quantidade de tecido adiposo entremeado aos alvéolos e moderada infiltração multifocal de leucócios, principalmente, mastócitos, monócitos, linfócitos e eosinófilos.

A diminuição na quantidade de secreção que ocorre no quinto dia de desmame, na glândula mamária das ratas dos dois

grupos, em relação ao vigésimo primeiro dia de lactação, está associada à redução do tamanho dos alvéolos, fenômeno normal do processo de involução da glândula mamária (Masso-Welch et al., 2000). Embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre os grupos estudados, nota-se que em comparação ao período de lactação, houve, no quinto dia de desmame, aumento significativo da porcentagem de epitélio somente na glândula mamária das ratas do grupo tratado. É provável que este aumento esteja relacionado ao aumento das células mioepiteliais, que também são componentes do compartimento epitelial presentes em maior quantidade durante a involução da glândula e que neste período são difíceis de serem diferenciadas das outras células epiteliais sem o uso de imunoistoquímica. Essas células envolvem os alvéolos formando uma barreira espessa entre o epitélio luminal alveolar e a membrana basal (Masso-Welch et al., 2000). O aumento na quantidade de epitélio ocorrido somente na glândula mamária de ratas do grupo tratado com tiroxina, sugere a ocorrência de involução mais acelerada na glândula destes animais.

A redução da porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária, independente do grupo, que ocorre do segundo dia de lactação para o vigésimo primeiro dia de lactação, está relacionado com o desenvolvimento da glândula mamária, que nas ratas completa-se durante a lactação (Knight e Peaker, 1982, Delouis e Richard, 1993). Já o aumento na quantidade de tecido adiposo na glândula mamária, que ocorre do vigésimo primeiro dia de lactação para o quinto dia de desmame, está relacionado ao processo de involução da glândula e coincide com a

diminuição no tamanho dos lóbulos alveolares (Masso-Welch et al., 2000).

### **5.2.3. Proliferação celular e apoptose no tecido mamário**

O índice de proliferação celular na glândula mamária não diferiu significativamente entre os grupos, em nenhum período. Mas nos dois grupos, houve redução significativa da taxa de proliferação no final do período de lactação em comparação ao início, e somente no grupo tratado, houve um aumento significativo no número de células marcadas, no quinto dia de desmame. Além disso, o aumento da porcentagem de epitélio observado no grupo tratado no quinto dia após o desmame, acompanha o aumento do

Ao contrário do primeiro experimento a taxa de apoptose das células epiteliais mamárias é bem mais expressiva durante a lactação e após o desmame. Embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre grupos no que concerne à taxa de apoptose no epitélio mamário durante a lactação, após o desmame, o número de células em apoptose na glândula mamária das ratas do grupo tratado é quase o dobro do número encontrado na glândula mamária das ratas do grupo controle, diferindo significativamente entre os grupos (Fig. 19, gráfico 21, anexo 7.2.11). A partir deste resultado, conclui-se que o tratamento com tiroxina acelera o processo de involução da glândula mamária. Mas é importante ressaltar que este processo não se caracteriza somente pela regressão dos elementos epiteliais por apoptose, mas também engloba o processo de remodelamento glandular, que está associada ao aumento da degradação proteolítica (Furlong et al., 1996, Accorsi et al., 2002).

índice de proliferação celular (Fig. 16, 17 e 18; gráfico 20; anexo 7.2.10).

Esta diminuição no número de células epiteliais que expressam o CDC-47 com 21 dias de lactação provavelmente ocorreu devido a menor concentração sérica de prolactina e GH nas ratas neste período. Estes hormônios estão relacionados com a habilidade materna e são importantes fatores sobreviventes para as células epiteliais da glândula mamária (Accorsi et al., 2002, Varas et al., 2002). Como os filhotes neste período já estão com idade para desmamar, a concentração sérica desses hormônios provavelmente já era menor, não ocorrendo assim, estímulo para a proliferação das células, e sim, para a apoptose.

Varas et al. (2002) encontraram maior expressão de SGP-2, gene relacionado à apoptose, na glândula mamária de ratas hipertireóideas, no décimo quarto e no vigésimo primeiro dia de lactação. No vigésimo primeiro dia de lactação também foi observado maior número de células em apoptose na glândula mamária de ratas hipertireóideas, confirmados pela reação de Tunel. No entanto, neste experimento, não houve diferença significativa com relação à expressão de caspase 3 nas células do epitélio mamário no final da lactação. Provavelmente isso se deve à diferença na dose de tiroxina utilizada.

### **5.2.4. Quantificação do número de mastócitos.**

Não foi observada diferença significativa entre grupos no que concerne ao número de mastócitos na glândula mamária durante a lactação e

após o desmame (Fig. 20, Tab.3). Ao contrário do que foi observado no experimento 1, o número de mastócitos apresentou correlação positiva com a porcentagem de epitélio da glândula e não apresentou correlação com a porcentagem de estroma (Tab.4). Além disso, somente no grupo tratado com tiroxina a porcentagem de epitélio e o número de mastócitos foram significativamente maior no quinto dia de desmame em comparação aos períodos anteriores. Estes achados corroboram com Peryt et al. (1985) e Gouon-Evans et al. (2002), que observaram que o número de mastócitos na glândula mamária aumenta gradualmente a partir de 48 horas após a lactação até a involução da glândula.

#### **5.2.5. Comportamento Materno**

As mães do grupo controle mantinham os seus filhotes sempre bem juntos e no centro de um ninho bem formado. Quando um filhote se separava dos demais, a mãe do grupo controle prontamente se preocupava em colocá-lo junto aos outros, diferindo-se da mãe tratada com tiroxina. Apesar destas observações, não houve diferença significativa no que se refere ao comportamento das mães entre os dois grupos. Isto provavelmente ocorreu porque não se quantificou o número de filhotes frios ou sujos, mas sim, a

presença ou a ausência de algum filhote frio ou sujo na ninhada (Tab. 5 e 6).

Esta observação quanto ao comportamento materno era esperada, visto que, a dose de tiroxina fornecida aos animais foi menor que a dose do experimento de Rosato et al. (1992), no qual as mães hipertireóideas apresentaram inadequada habilidade materna, os filhotes não ganharam peso e vieram a óbito dentro de 48 horas pós-parto. No entanto a dose utilizada aqui foi maior que a de outro estudo (Varas et al., 2002), no qual as mães hipertireóideas não apresentaram alteração no comportamento materno, mas seus filhotes apresentaram menor peso durante a amamentação, quando comparados com os filhotes das mães eutireóideas.

Para se avaliar a habilidade materna criteriosamente, o peso dos filhotes deve ser considerado, entretanto, uma avaliação mais adequada leva em consideração o sexo dos filhotes, visto que, os machos, na maioria das vezes, são mais pesados e o tamanho da ninhada. Esta avaliação não foi feita no experimento de Varas et al. (2002), e por isto, foi realizada neste experimento que também avaliou o peso dos filhotes a cada 48 horas, durante todo o período de amamentação.

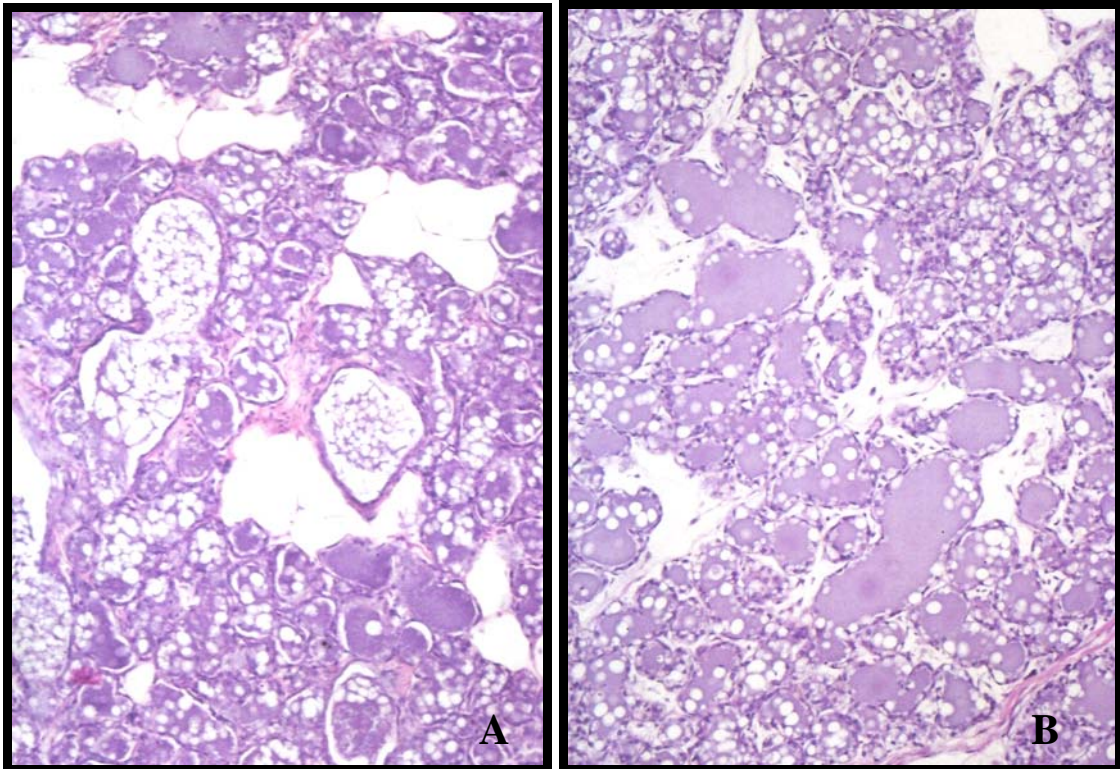


Figura 13. Glândula mamária de ratas, 2º dia de lactação, experimento 2. HE, 257,71×. A) Grupo controle, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso. B) Grupo tratado com tiroxina, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso semelhante ao grupo controle.

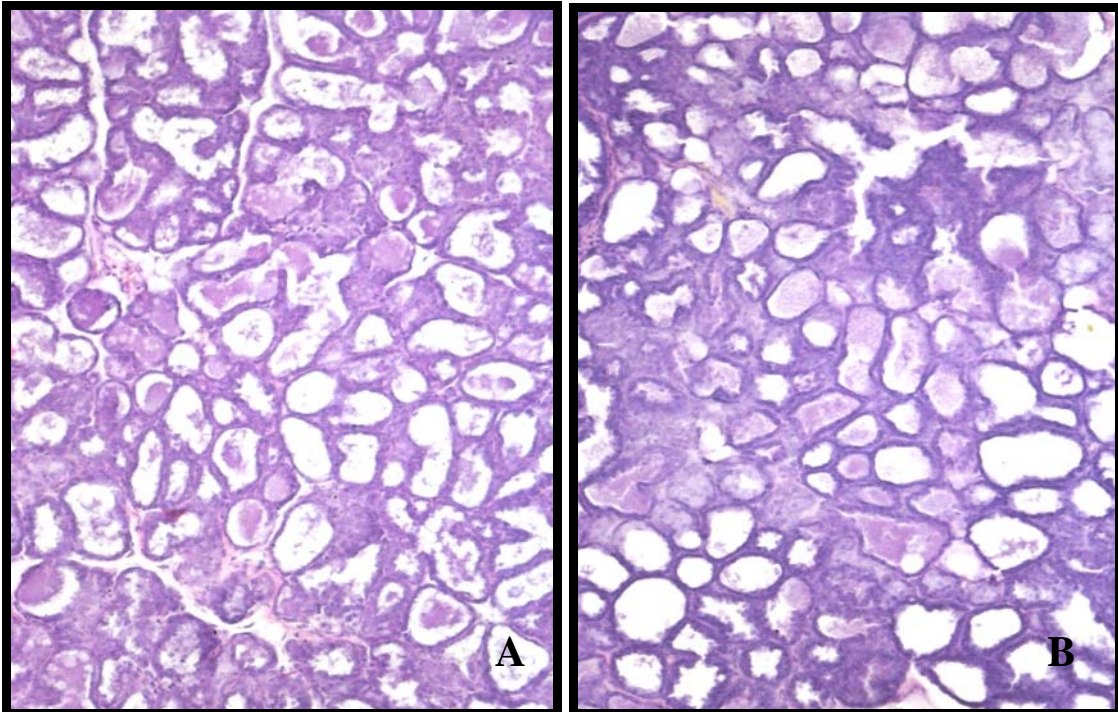
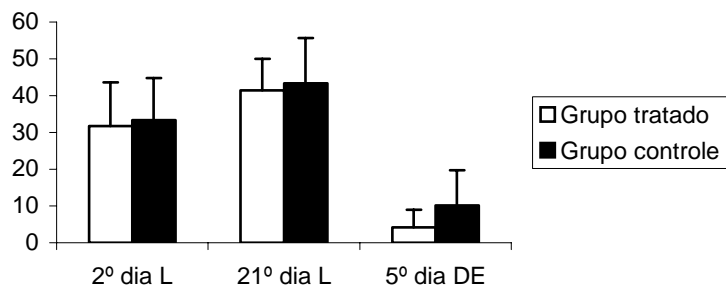
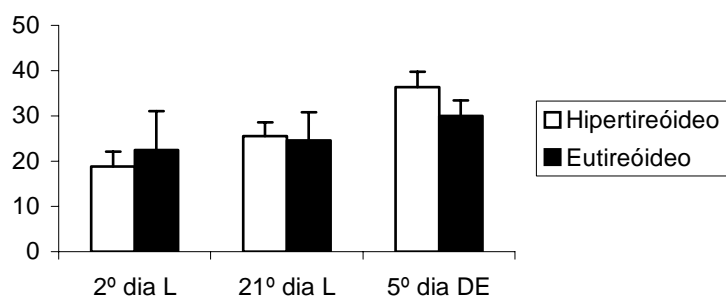


Figura 14. Glândula mamária de ratas, 21º dia de lactação, experimento 2. HE, 249,43×. A) Grupo controle, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso. B) Grupo tratado com tiroxina, alvéolos distendidos, revestidos por epitélio pavimentoso semelhante ao grupo controle.

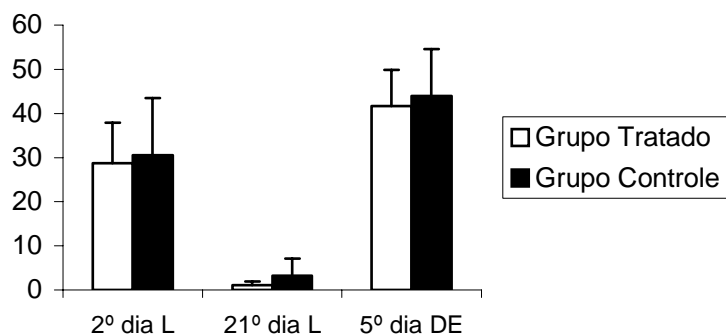
**Gráfico 16. Porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



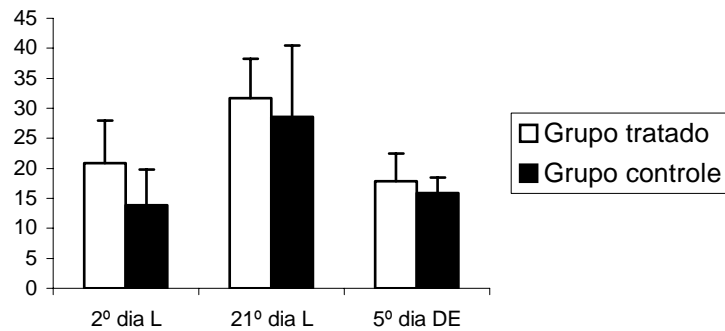
**Gráfico 17. Porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



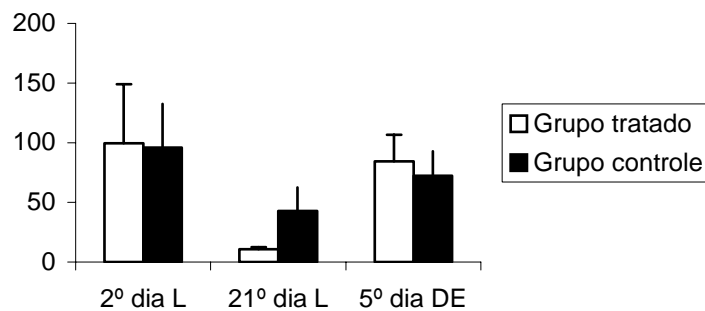
**Gráfico 18. Porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



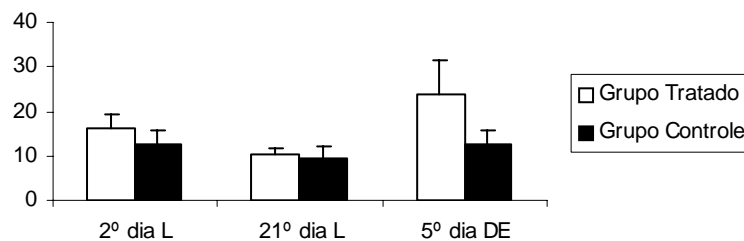
**Gráfico 19. Porcentagem de estroma na glândula mamária de ratas do grupo controle e tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



**Gráfico 20. Número médio de células epiteliais/campo com expressão de CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



**Gráfico 21. Número médio de células epiteliais/campo com expressão de caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**



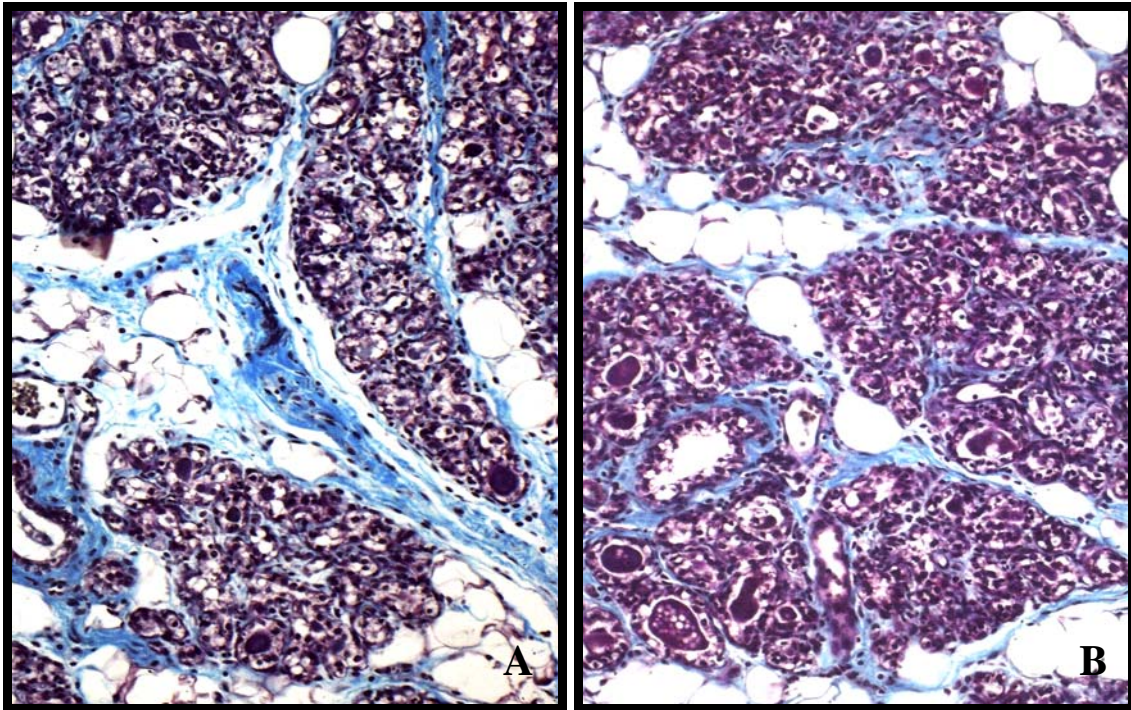


Figura 15. Glândula mamária de ratas, 5º dia de desmame, experimento 2. Tricrômio de Masson, 259,14×. A) Grupo controle, alvéolos distribuídos desorganizadamente, lúmens alveolares com secreção láctea e pequena quantidade de tecido adiposo. B) Grupo tratado com tiroxina, alvéolos distribuídos desorganizadamente, lúmens alveolares com secreção láctea e moderada quantidade de tecido adiposo entremeados aos alvéolos.

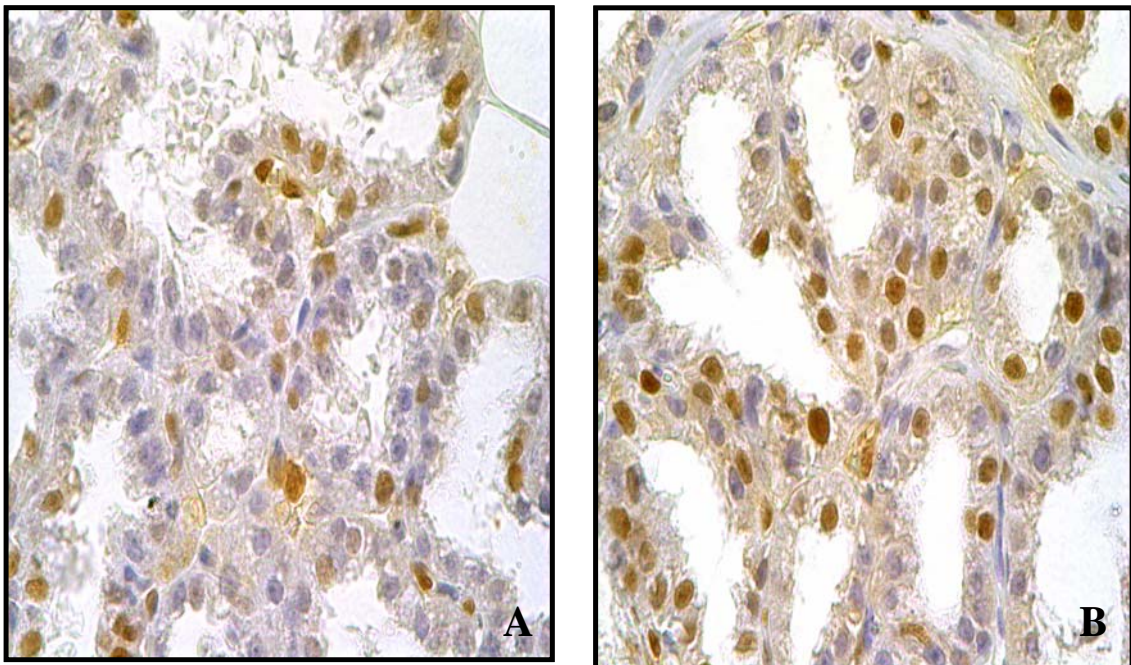


Figura 16. Glândula mamária de ratas, no 2º dia de gestação, experimento 2. Imunomarcagem para CDC-47, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 615,71×. As células marcadas pelo anticorpo CDC 47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle, B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.

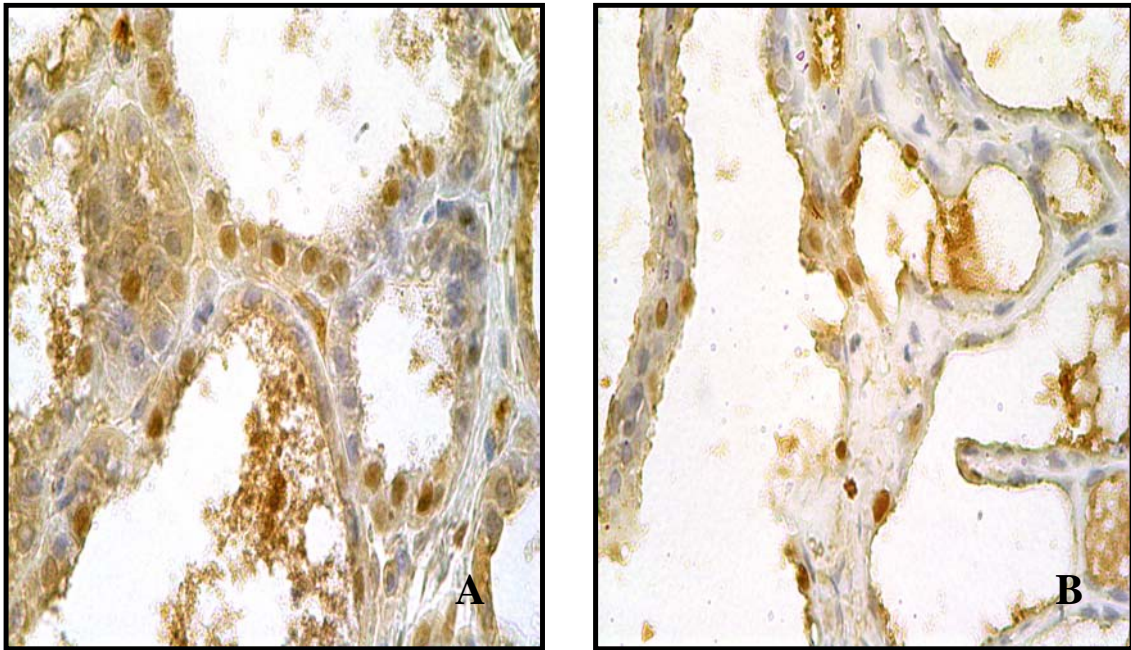


Figura 17. Glândula mamária de ratas, no 21º dia de gestação, experimento 2. Imunomarcção para CDC-47, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 607,86 $\times$ . As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle, B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.

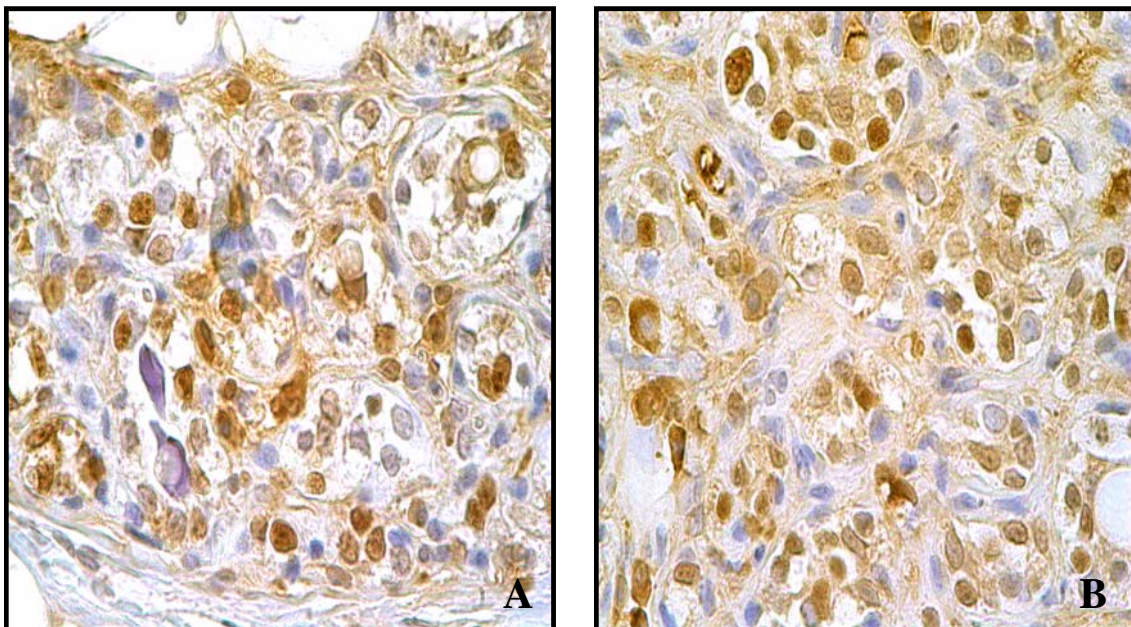


Figura 18. Glândula mamária de ratas, no 5º dia de desmame, experimento 2. Imunomarcção para CDC-47, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 587,14 $\times$ . As células marcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo com coloração amarronzada. A) Grupo controle, B) Grupo tratado com tiroxina semelhante ao grupo controle.

**Tabela 3: Número médio de mastócitos na glândula mamária de ratas gestantes do grupo controle e do grupo tratado com tiroxina no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame.**

Grupo	Número médio de mastócitos		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	4,51±1,01 <sup>Ba</sup>	4,72±2,25 <sup>Ba</sup>	8,22±1,3 <sup>Aa</sup>
Não tratado	4,75±0,98 <sup>Aa</sup>	5,66±2,21 <sup>Aa</sup>	6,84±2,25 <sup>Aa</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**Tabela 4: Coeficiente de correlação entre o número de mastócitos na glândula mamária de ratas gestantes e a porcentagem de epitélio e de estroma durante e após a lactação.**

Variável	Número de Mastócitos
Porcentagem de epitélio	0,4251*
Porcentagem de estroma	-0,1721

\*p<0,05

### 5.2.6. Desenvolvimento dos Filhotes

Como neste experimento a dose de tiroxina utilizada foi bem menor que a dose utilizada no experimento de Rosato et al. (1992), o risco da indução de hipertireoidismo nos filhotes foi bem menor, o que poderia influenciar negativamente nossos resultados. O peso médio dos filhotes machos e fêmeas das mães tratadas com tiroxina não diferiu significativamente do peso médio dos filhotes machos e fêmeas das mães não tratadas, em nenhum período.

No grupo de mães tratadas com tiroxina, o peso médio dos filhotes fêmeas, no décimo sétimo dia de amamentação, foi significativamente menor em comparação ao peso dos filhotes machos (Gráfico 22, anexo 7.2.12). Essa diferença comprova a importância de se considerar o sexo do filhote na avaliação do peso. No experimento de Varas et al. (2002), por exemplo, a ninhada das mães hipertireóideas poderia apresentar maior número de fêmeas, e por isto, foi encontrado menor peso da ninhada.

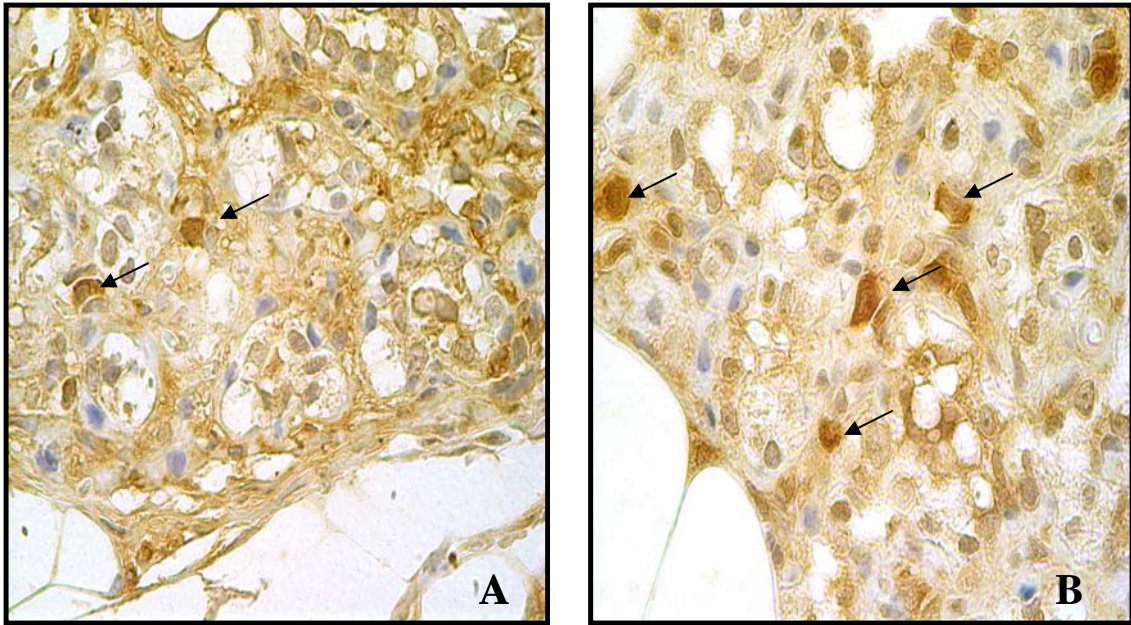


Figura 19. Glândula mamária de ratas, no 5º dia de desmame, experimento 2. Imunomarcagem para caspase-3, estreptoavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 583,57 $\times$ . As células marcadas pelo anticorpo anti-caspase 3 apresentam o núcleo e o citoplasma com coloração amarronzada (setas). A) Grupo controle, pequeno número de células marcadas. B) Grupo tratado com tiroxina, grande número de células marcadas.

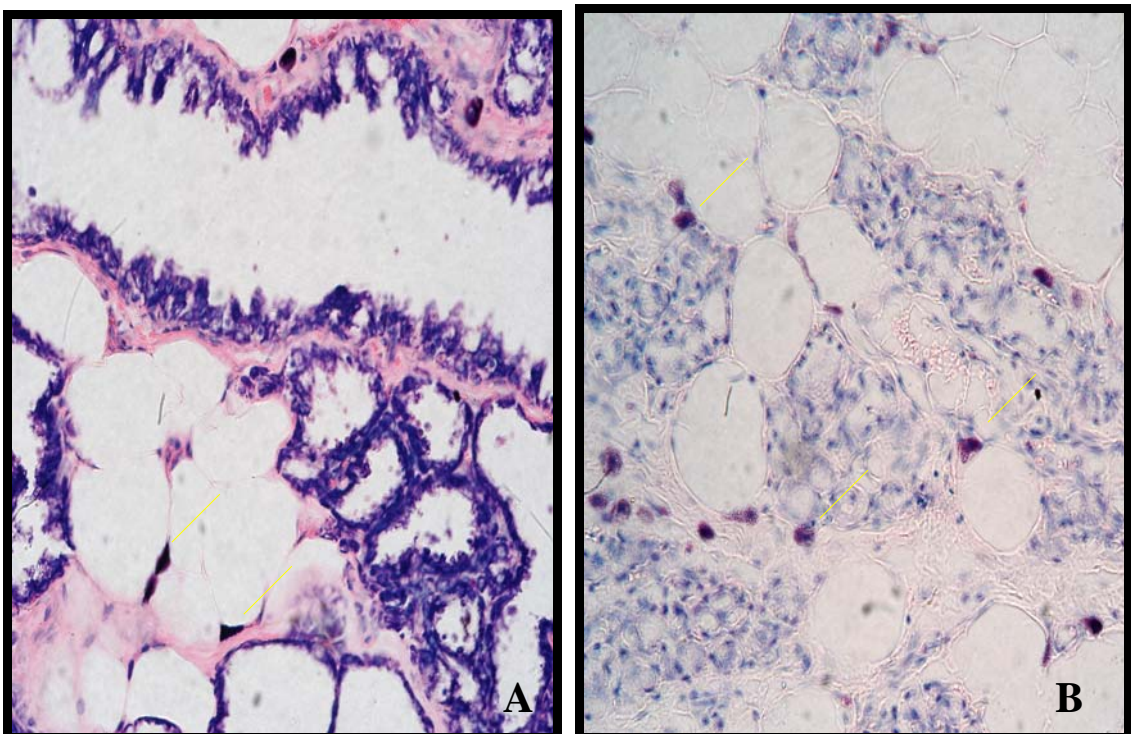


Figura 20. Glândula mamária de ratas, experimento 2. Giemsa, 615,71 $\times$ . A) Grupo controle, 2º dia de lactação, pequeno número de mastócitos/campo (setas). B) Grupo controle, 5º dia de desmame, grande número de mastócitos/campo (setas).

**Tabela 5. Avaliação das mães tratadas ou não com tiroxina quanto a higienização dos filhotes.**

Grupo	Higienização dos filhotes			Porcentagem de observações de filhotes sujos.
	Filhotes sujos/n° de observações	Ausência de filhotes sujos/n° de observações	Total de observações	
<b>Tratado</b>	5	247	252	1,98%
<b>Controle</b>	2	208	210	0,95%

X<sup>2</sup>=1,52 (P>0,05)

**Tabela 6. Avaliação das mães tratadas ou não com tiroxina quanto ao aquecimento dos filhotes.**

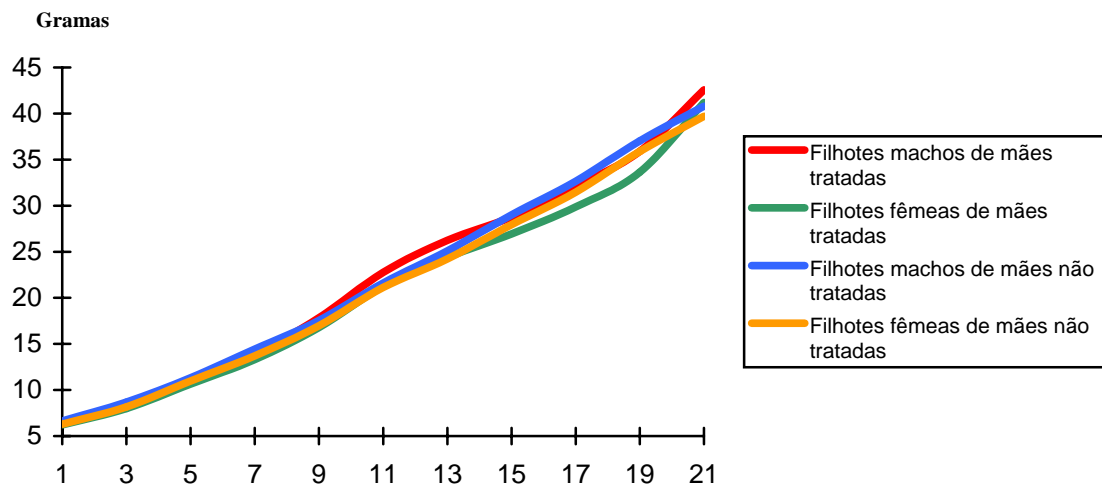
Grupo	Higienização dos filhotes			Porcentagem de observações de filhotes frios.
	Filhotes frios/n° de observações	Ausência de filhotes frios/n° de observações	Total de observações	
<b>Tratado</b>	7	245	252	2,78%
<b>Controle</b>	4	206	210	1,9%

X<sup>2</sup>=2,38 (P>0,05)

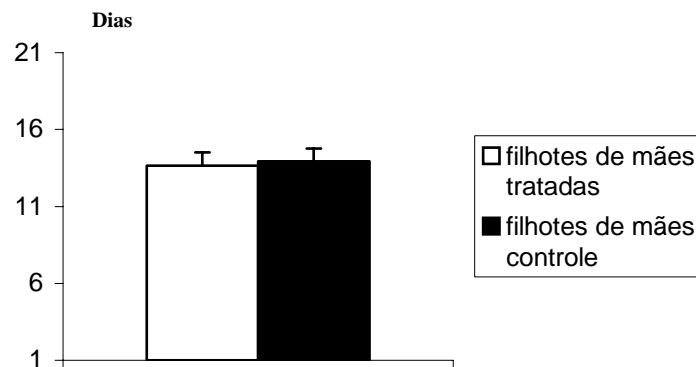
Como não houve diferença no peso médio dos filhotes entre o grupo tratado com tiroxina e não tratado, pode-se concluir que as mães tratadas com tiroxina apresentaram adequada habilidade materna, apesar da diferença

observada no cuidado dessas mães com os filhotes. Além disso, não houve diferença entre grupos com relação à idade de abertura dos olhos dos filhotes (Gráfico 23, anexo 7.2.28).

**Gráfico 22. Peso médio ajustado (g) dos filhotes machos e fêmeas de mães do grupo controle e tratado com tiroxina do 1º ao 21º dia de idade.**



**Gráfico 23. Idade média (dias) de abertura dos olhos dos filhotes de mães controle e tratadas com tiroxina.**



## 6. CONCLUSÕES

6.1. O tratamento com tiroxina acelera o desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação, sem alterar o índice de proliferação e a taxa de apoptose das células epiteliais.

6.2. O tratamento com tiroxina induz maior diferenciação das células epiteliais da glândula mamária, com conseqüente lactogênese precoce durante a gestação.

6.3 Durante a lactação, o tratamento com tiroxina não altera as características histomorfométricas, o índice de proliferação e a taxa de apoptose da glândula mamária.

6.4. Após o desmame, o tratamento com tiroxina aumenta a taxa de apoptose,

acelerando o processo de involução da glândula mamária.

6.5 O número de mastócitos na glândula mamária, durante a gestação, apresenta correlação negativa com a porcentagem de epitélio e correlação positiva com a porcentagem de estroma. Entretanto, durante a lactação e após o desmame o número de mastócitos tem correlação positiva com a porcentagem de epitélio.

6.6 O tratamento com tiroxina não altera o número de mastócitos na glândula mamária em nenhum dos períodos estudados.

6.7 O tratamento com tiroxina não altera a habilidade materna, já que não causa alteração do peso médio e da idade de abertura dos olhos dos filhotes.

## 7.REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS

- ACCORSI, P.A.; PACIONI, B.; PEZZI, C. et al. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci*, v.85, p.507-513, 2002.
- ALLAN, G.J.; TONNER, E.; BARBER, M.C. et al. Growth hormone, acting in part through the insulin-like growth factor axis, rescues developmental, but not metabolic, activity in the mammary gland of mice expressing a single allele of the prolactin receptor. *Endocrinology*, v.143, n.11, p.4310-4319, 2002.
- ALISI, A.; SPAGNUOLO, S.; NAPOLETANO, C. et al. Thyroid hormones regulate DNA-synthesis and cell-cycle proteins by activation of PKC $\delta$  and protein kinase M1K in chick embryo hepatocytes. *J Cell Physiol*, v.201, p.259-265, 2004.
- ARMSTRONG, J.D.; COFFEY, M.T.; ESBENSHADE, K.L. et al. Concentrations of hormones and metabolites, estimates of metabolism, performance, and reproductive performance of sows actively immunized against growth hormone-releasing factor. *J. Anim. Sci*, v.72, p.1570-1577, 1994.
- BALL, S.M. The development of the terminal end bud in the prepubertal-pubertal mouse mammary gland. *The anatomical record*, v.250, p.459-464, 1998.
- BOWREY, P.F.; KING, J.; MAGAREY, C. et al. Histamine, mast cells and tumor cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect? *British Journal of Cancer*, v.82, n.1, p.167-170, 2000.
- CAPUCO, A.V.; KAHL, S.; JACK, L.J.W. et al. Prolactin and growth hormone stimulation of lactation in mice requires thyroid hormones. *P.S.E.B.M*, v.221, p.345-351, 1999.
- COLLIER, R.J.; McNamara, J.P.; Wallace, C.R. et al. A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *J Animal Sci*, v.59, n.2, p.498-510, 1984.
- CUNHA, G.R.; COOKE, P.S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*, v.67, n.5, p.417-434, 2004.
- DALTON, S.; WHITBREAD, L. Cell cycle regulation of thyroid hormone receptor of PKC $\delta$  and protein kinase M1K in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, p.2514-2518, 1995.
- DEIS, R.P.; CARRIZO, D.G.; JAHN, G.A. Suckling-induced prolactin release potentiates mifepristone-induced lactogenesis in pregnant rats. *J.Reprod.Fert*, v.87, p.147-153, 1989.
- DELOIUS, C.; RICHARD, P. Lactation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. *Reproduction in Mammals and Man*, Ellipses, Paris, p.503-529, 1993.
- DICKSON, W.M. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Fisiologia dos animais domésticos*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, p.571-602, 1993.
- DJIANE, J.; KELLY, P.A. Prolactin. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. *Reproduction in*

*Mammals and Man*, Ellipses, Paris, p.121-133, 1993.

FLINT, D.J.; GARDNER, M. 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*, v.135, n.3, p.1119-1124, 1994.

FLINT, D.J.; VERMON, R.G. Effects of food restriction on the responses of the mammary gland and adipose tissue to prolactin and growth hormone in the lactating rat. *Journal of Endocrinology*, v.156, p.299-305, 1998.

FRENCH, L.E.; SORIANO, J.V.; MONTESANO, R. et al. Modulation of clusterin gene expression in the rat mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Biology of reproduction*, v.55, p.1213-1220, 1996.

FURLONG, E.E.M.; KEON, N.K.; THORNTON. et al. Expression of a 74-kDa nuclear factor 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution. *The Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.47, p.29688-29697, 1996.

GARCÍA-SILVA, S.; ARANDA, A. The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. *Molecular and cellular biology*, v.24, n.17, p.7514-7523, 2004.

GOUON-EVANS, V.; LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res*, v.4, n.4, p.155-164, 2002.

GRIFFITH, D.R.; TURNER, C.W. Thyroxine and mammary gland growth in rat. *P.S.E.B.M*, v.106, p.873-874, 1961.

HIRAIWA, A.; FUJITA, M.; NAGASAKA, T. et al. Immunolocalization of hCDC47 protein in normal and neoplastic human tissues and its relation to growth. *Int. J. Cancer*, v.74, p.180-184, 1997.

INCERPI, S.; SCAPIN, S.; D'AREZZO. et al. Short-term effects of thyroid hormone in prenatal development and cell differentiation. *Steroids*, v.70, p.434-443, 2005.

JACK, L.J.W.; KAHL, S.; ST GERMAIN, D.L.; CAPUCO, A.V. Tissue distribution and regulation of 5'-deiodinase processes in lactating rats. *Journal of Endocrinology*, v.142, p.205-215, 1994.

JOSHI, K.; ELLIS, J.T.B.; HUGHES, C.M. et al. Cellular proliferation in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Laboratory investigation*, v.54, n.1, p.52-61, 1986.

KAHL, S.; CAPUCO, A.V.; BINELL, M. et al. Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropin: thyroid status of lactating, primiparous cows. *J Dairy Sci*, v.78, p.2150-2158, 1995.

KNIGHT, C.H.; PEAKER, M. et al. Development of the mammary gland. *J.Reprod. Fert*, v.65, p.521-536, 1982.

KUENZI, M.J.; SHERWOOD, O.D. Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. VII. Passive Immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy prevents

- development of normal mammary nipple morphology and function in rats. *Endocrinology*, v.131, n.4, p.1841-1848, 1992.
- KUMARESAN, P.; TURNER, C.W. Effect of growth hormone and thyroxine on mammary gland growth in the rat, *J Dairy Sci*, v.48, p.492-495, 1965.
- MARSHMAN, E.; STREULI, C.H. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Res*, v.4, n.231-239, 2002.
- MARTI, A.; GRABER, H.; LAZAR, H. et al. Caspases: decoders of apoptotic signals during mammary involution. Caspase activation during involution. *Adv Exp Med Biol*, v.480, p.195-201, 2000.
- MASSO-WELCH, P.A.; DARCY, K.M.; STANGLE-CASTOR, N.C. et al. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.5, n.2, p.165-185, 2000.
- MIRANDA, B.A.; MAGALHÃES, D.L.; SERAKIDES, R. et al. Morfologia da tireóide de ratas na gestação e lactação. *Resumos da X Semana de Iniciação Científica da UFMG*, p.5, 2001.
- MISITI, S.; ANASTASI, E.; SCIACCHITANO, S. et al. 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine enhances the differentiation of a human pancreatic duct cell line (hPANC-1) towards a beta-cell-Like phenotype. *J Cell Physiol*, v.204, n.1, p.286-296, 2005.
- NOBRE, E.L.; JORGE, Z.; ANSELMO, J. et al. Má absorção das hormonas tiroideias. *Acta Med Port*, v.17, p.487-491, 2004.
- PERYT, A.; SPORNIK, M.; ZARZYCKI, J. Stromal cells of the mammary gland in various function states. *Folia Morphol*, v.2, p.118-124, 1985.
- PRADO, M.D.; DA COSTA, T.H.M.; WILLIAMSON, D.H. Effects of triiodothyronine administration on the disposal of oral [ $^{14}\text{C}$ ]triolein, lipoprotein lipase activity and lipogenesis in the rat during lactation and on removal of the litter. *Biochem. J*, v.301, p.495-501, 1994.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. *Afip Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington: Am. Registry of Pathology, p.278, 1992.
- RAMOS, C.F.; TEIXEIRA, S.V.; PASSOS, M.C.F. et al. Low-protein diet changes thyroid function in lactating rats. *P.S.E.B.M*, V.224, 2000.
- ROSATO, R.R.; JIMÉNEZ, M.S.; JAHN, G.A. Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. *Acta Endocrinologica*, v.127, p.547-554, 1992.
- ROSATO, R.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D.; NECK, J. et al. Effect of chronic thyroxine treatment on IGF-I, IGF-II and IGF-binding protein expression in mammary gland and liver during pregnancy and early lactation in rats. *European Journal of Endocrinology*, v.146, p.729-739, 2002.
- RUAN, W.; NEWMAN, C.B.; KLEINBERG, D.L. Intact and amino-terminally shortened forms of insulin-

like growth factor I induce mammary gland differentiation and development. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.89, p.10872-10876, 1992.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, p.265, 2002.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; SANTOS, R.L. et al. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer region (NORs) in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. *Vet Pathol*, v.36, n.6, p.574-582, 1999.

SLEBODZINSKI, A.B.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; STYCZYNSKA, E. et al. Presence of thyroxine deiodinases in mammary gland: possible modulation of the enzyme-deiodinating activity by somatotropin. *Domestic Animal Endocrinology*, v.17, p.161-169, 1999.

STUTE, P.; WOOD, C.E.; KAPLAN, J.R. Cyclic changes in the mammary gland of cynomolgus macaques. *Fertil Steril*, v.3, p.1160-1170, 2004.

THORDARSON, G.; FIELDER, P.; LEE, C. et al. Mammary gland differentiation in hypophysectomized, pregnant mice treated with corticosterone and thyroxine. *Biology of Reproduction*, v.47, p.676-682, 1992.

THORDARSON, G.; OGREN, L.; DAY, J.R. et al. Mammary gland development and  $\alpha$ -lactalbumin production in hypophysectomized, pregnant mice. *Biology of reproduction*, v.40, p.517-524, 1989.

TONNER, E.; ALLAN, G.J.; FLINT, D.J. Hormonal control of plasmin and tissue-type plasminogen activator

activity in rat milk during involution of the mammary gland. *Journal of Endocrinology*, v.167, p.265-273, 2000.

TONNER, E.; BARBER, M.C.; TRAVERS, M.T. et al. Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology*, v.138, n.12, p.5101-5107, 1997.

TRIVALLE, C.; DOUCET, J.; CHASSAGNE, P. et al. Differences in the signs and symptoms of hyperthyroidism in older and younger patients. *J Am Geriatr Soc*, v.44, n.1, p.50-53, 1996.

VARAS, S.M.; MUÑOZ, E.M.; HAPON, M.B. et al. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary gland of lactating rats. *Reproduction*, v.124, p.691-702, 2002.

VONDERHAAR, B.K.; GRECO, A.E. Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology*, v.104, n.2, p.409-417, 1979.

ZISKA, S.E.; BHATTACHARJEE, M.; HERBER, R.L. et al. Thyroid hormone regulation of  $\alpha$ -lactalbumin: differential glycosylation and messenger ribonucleic acid synthesis in mouse mammary glands. *Endocrinology*, v.123, n.5, 1988.

YI, Y.; SHEPARD, A.; KITRELL, F. et al. P19<sup>ARF</sup> Determines the balance between normal cell proliferation rate and apoptosis during mammary gland development. *Molecular Biology of the cell*, v.15, p.2302-2311, 2004.

WALTER, I.; YANG, J.; GUZMAN, R. et al. Control of mammary gland

development. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.; GREENWALD, G.S. et al. The Physiology of Reproduction. 2 ed. New York, Raven Press, p.1033-1063, 1994.

WATSON, S.G.; RADFORD, A.D.; KIPAR, A. et al. Somatic mutations of the thyroid-stimulation hormone receptor gene in feline hyperthyroidism:

parallels with human hyperthyroidism. *J Endocrinol*, v.186, n.3, p.523-537, 2005.

WIDTAK, P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, v.47, n.4, p.1037-1044, 2000.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexos do experimento 1

#### 8.1.1 Média e desvio padrão da altura do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ ) das tireóides de ratas gestantes tratadas e não tratadas pela tiroxina.

Grupo	Altura do epitélio folicular ( $\mu\text{m}$ )		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$7,95 \pm 0,875^{\text{Ab}}$	$7,6 \pm 0,335^{\text{Ab}}$	$7,8 \pm 0,542^{\text{Ab}}$
Controle	$14,37 \pm 0,825^{\text{Aa}}$	$15,15 \pm 1,01^{\text{Aa}}$	$13,37 \pm 0,18^{\text{Ba}}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P > 0,05$ ).

#### 8.1.2 Média e desvio padrão do consumo diário individual de água (ml) e de ração (g) nos grupos controle e tratado durante o período de tratamento e gestação

Variáveis	Grupo	
	Controle	Tratado
Consumo de água/antes da gestação	$29,5 \pm 1,11^{\text{B}}$	$40,14 \pm 3,53^{\text{A}}$
Consumo de ração/antes da gestação	$17,2 \pm 0,52^{\text{B}}$	$20,43 \pm 1,21^{\text{A}}$
Consumo de água/durante a gestação	$37,4 \pm 5,21^{\text{B}}$	$55,01 \pm 9,76^{\text{A}}$
Consumo de ração/durante a gestação	$19,9 \pm 2,97^{\text{B}}$	$24,07 \pm 3,14^{\text{A}}$

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 8.1.3 Porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação

Grupo	Porcentagem de epitélio		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$16,75 \pm 4,2^{\text{Ca}}$	$36,2 \pm 9,15^{\text{Ba}}$	$65,84 \pm 8,89^{\text{Aa}}$
Controle	$13,61 \pm 4,7^{\text{Ca}}$	$28,76 \pm 4,68^{\text{Ba}}$	$42,21 \pm 4,85^{\text{Ab}}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P > 0,05$ ).

#### 8.1.4 Porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação

Grupo	Porcentagem de tecido adiposo		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$70,6 \pm 4,9^{\text{Aa}}$	$52,08 \pm 11,58^{\text{Bb}}$	$21,20 \pm 7,57^{\text{Cb}}$
Controle	$74,29 \pm 7,83^{\text{Aa}}$	$63,11 \pm 7,84^{\text{Aa}}$	$51,26 \pm 3,83^{\text{Ba}}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P > 0,05$ ).

### 8.1.5 Porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação

Grupo	Porcentagem de secreção		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$0 \pm 0,00^{Ba}$	$1,86 \pm 1,59^{Ba}$	$7,68 \pm 2,22^{Aa}$
Controle	$0 \pm 0,00^{Ba}$	$0,46 \pm 0,59^{Ba}$	$2,33 \pm 1,39^{Ab}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P>0,05$ ).

### 8.1.6 Porcentagem de estroma na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação

Grupo	Porcentagem de estroma		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$12,65 \pm 1,8^{Aa}$	$9,86 \pm 1,77^{Aa}$	$5,28 \pm 2,93^{Ba}$
Controle	$12,08 \pm 3,85^{Aa}$	$7,71 \pm 3,7^{Ba}$	$4,15 \pm 1,55^{Ba}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P>0,05$ ).

### 8.1.7 Número de células epiteliais com expressão de CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação

Grupo	Número médio de células marcadas		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$154,2 \pm 26,78^{Aa}$	$76,16 \pm 38,98^{Ba}$	$79,88 \pm 27,48^{Ba}$
Controle	$139,02 \pm 17,34^{Aa}$	$58,72 \pm 13,92^{Ba}$	$52,53 \pm 13,5^{Ba}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P>0,05$ ).

### 8.1.8 Número médio de células epiteliais/campo com expressão de caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação

Grupo	Número médio de células marcadas		
	7 dias	14 dias	19 dias
Tratado	$2,63 \pm 1,76^{Aa}$	$3,0 \pm 1,24^{Aa}$	$3,8 \pm 2,53^{Aa}$
Controle	$1,90 \pm 0,47^{Aa}$	$4,0 \pm 1,47^{Aa}$	$5,1 \pm 3,86^{Aa}$

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $P>0,05$ ).

**8.1.9 Análise de variância da altura do epitélio folicular das tireóides de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	368,64	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	352,33	70,465	116,62	0,4438
<b>Erro</b>	27	16,315	0,6042	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 6,81%

**8.1.10 Análise de variância do consumo diário de água de ratas do grupo tratado e não tratado.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	21	2855	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	3	1970,8	656,92	13,372	0,0001
<b>Erro</b>	18	884,28	49,13	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 11,05%

**8.1.11 Análise de variância do consumo diário de ração de ratas do grupo tratado e não tratado.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	21	262	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	3	127,9	42,634	5,722	0,0062
<b>Erro</b>	18	134,1	7,45	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 9,59%

**8.1.12 Análise de variância da porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	10935	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	9880,4	1976,1	50,568	0,3754
<b>Erro</b>	27	1055,1	39,078	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 20,96%

**8.1.13 Análise de variância da porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	11314	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	9802,3	1960,5	35,005	0,3073
<b>Erro</b>	27	1512,1	56,005	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 15,88%

**8.1.14 Análise de variância da porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	262,9	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	221,81	44,363	29,154	0,0001
<b>Erro</b>	27	41,08	1,522	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 75,51%

**8.1.15 Análise de variância da porcentagem de tecido conjuntivo na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	562,01	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	353,98	70,797	9,189	9,189
<b>Erro</b>	27	208,03	7,705	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 34,15%

**8.1.16 Análise de variância do número médio de células marcadas pelo anticorpo CDC-47 na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	52972	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	68847	10594	18,019	0,2047
<b>Erro</b>	27	15875	587,96	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 27,47%

**8.1.17 Análise de variância do número médio de células marcadas pelo anticorpo Caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	30	145,47	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	35,208	7,042	1,597	0,0066
<b>Erro</b>	25	110,26	4,410	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 51,85%

**8.1.18 Análise de variância do número médio mastócitos na glândula mamária de ratas gestantes do grupo tratado e do grupo controle aos 7, 14 e 19 dias de gestação.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	56,44	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	18,429	3,686	2,618	0,5634
<b>Erro</b>	27	38,011	1,408	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 23,64%

## 8.2 Anexos do experimento 2

**8.2.1 Altura do epitélio folicular das tireóides de ratas do grupo controle e tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame**

Grupo	Altura do epitélio folicular (µm)		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	5,04±0,56 <sup>BA</sup>	7,78±1,34 <sup>Aa</sup>	6,98±0,66 <sup>Aa</sup>
Controle	4,9±1,03 <sup>Ba</sup>	6,78±0,82 <sup>Aa</sup>	6,56±0,02 <sup>Aa</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.2 Altura do epitélio folicular das tireóides de ratas do grupo não lactante tratado e não tratado.**

Grupo	Altura do epitélio folicular (µm)
Não gestante tratado	6,16±1,12 <sup>b</sup>
Não gestante não tratado	14,55±1,429 <sup>a</sup>

Médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

### 8.2.3 Concentração sérica de T4 total do soro de ratas do grupo tratado e controle.

Grupo	Concentração sérica de T4 total (MCG/DL)		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	4,7±0,36 <sup>a</sup>	3,26±2,13 <sup>a</sup>	6,02±1,19 <sup>a</sup>
Controle	3,33±0,71 <sup>b</sup>	3,46±0,72 <sup>a</sup>	6,58±1,01 <sup>a</sup>

Médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

### 8.2.4 Concentração sérica de T4 livre do soro de ratas do grupo não lactante tratado e do grupo não lactante não tratado.

Grupo	Concentração sérica de T4 livre (NANO/DL)
Não lactante tratado	2,04±0,199 <sup>a</sup>
Não lactante não tratado	1,73±0,352 <sup>a</sup>

Médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

### 8.2.5 Média e desvio padrão do consumo diário individual de água (ml) e de ração (g) nos grupos controle e tratado durante o período de indução e gestação e lactação

Variáveis	Grupo	
	Controle	Tratado
Consumo de água/antes da gestação	32,21 ± 4,26 <sup>A</sup>	37,98 ± 2,44 <sup>A</sup>
Consumo de ração/antes da gestação	18,98 ± 0,47 <sup>B</sup>	20,28 ± 0,34 <sup>A</sup>
Consumo de água/gestação	45,51 ± 8,8 <sup>A</sup>	45,44 ± 5,96 <sup>A</sup>
Consumo de ração/gestação	24,24 ± 3,66 <sup>A</sup>	24,28 ± 2,68 <sup>A</sup>

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

### 8.2.6 Porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo controle e tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame

Grupo	Porcentagem de secreção		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	31,67±11,91 <sup>Aa</sup>	41,4±8,62 <sup>Aa</sup>	4,17±4,87 <sup>Ba</sup>
Controle	33,33±11,39 <sup>Aa</sup>	43,4±12,3 <sup>Aa</sup>	10,2±9,52 <sup>Ba</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

### 8.2.7 Porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame

Grupo	Porcentagem de epitélio		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	18,8±3,31 <sup>Ba</sup>	25,54±3,07 <sup>Ba</sup>	36,37±3,39 <sup>Aa</sup>
Controle	22,42±8,67 <sup>Aa</sup>	24,64±6,17 <sup>Aa</sup>	30,02±3,42 <sup>Aa</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.8 Porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame**

Grupo	Porcentagem de tecido adiposo		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	28,68±9,21 <sup>Ba</sup>	1,14±0,77 <sup>Ca</sup>	41,65±8,21 <sup>Aa</sup>
Controle	30,5±12,97 <sup>Ba</sup>	3,2±3,96 <sup>Ca</sup>	43,92±10,68 <sup>Aa</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.9 Porcentagem de estroma na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame**

Grupo	Porcentagem de estroma		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	20,82±7,14 <sup>Ba</sup>	31,7±6,57 <sup>Aa</sup>	17,85±4,59 <sup>Ba</sup>
Controle	13,88±5,92 <sup>Ba</sup>	28,62±11,81 <sup>Aa</sup>	15,86±2,6 <sup>Ba</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.10 Número médio de células epiteliais/campo com expressão de CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame**

Grupo	Número médio de células		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	99,62±49,44 <sup>Aa</sup>	10,5±1,9 <sup>Ba</sup>	84,43±22,17 <sup>Aa</sup>
Controle	95,89±36,88 <sup>Aa</sup>	42,77±19,92 <sup>Ba</sup>	72,35±20,32 <sup>ABa</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.11 Número médio de células epiteliais/campo com expressão de caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo controle e do grupo tratado no 2º e 21º dia de lactação e no 5º dia após o desmame**

Grupo	Número médio de células		
	2º dia L	21º dia L	5º dia DE
Tratado	16,15±3,2 <sup>Ba</sup>	10,28±1,43 <sup>Ba</sup>	23,95±7,71 <sup>Aa</sup>
Controle	12,73±2,84 <sup>Aa</sup>	9,42±2,71 <sup>Aa</sup>	12,64±3,02 <sup>Ab</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.12 Média, em gramas, dos filhotes de cada sexo de dentro de cada grupo, a partir do primeiro dia de nascimento, e posteriormente, a cada 48 horas até o dia de desmame, quando os filhotes estavam com 21 dias.**

Dia	Grupo Tratado				Grupo Controle			
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas	
	Média	Média ajustada	Média	Média ajustada	Média	Média ajustada	Média	Média ajustada
1	6,54±0,47	6,53 <sup>A</sup>	6,27±0,4	6,21 <sup>A</sup>	6,6±0,55	6,64 <sup>A</sup>	6,25±0,51	6,29 <sup>A</sup>
3	8,15±0,9	8,14 <sup>AB</sup>	8,03±0,62	7,98 <sup>B</sup>	8,65±0,81	8,68 <sup>A</sup>	8,13±0,65	8,16 <sup>AB</sup>
5	11,17±1,63	10,95 <sup>A</sup>	11,01±1,42	10,65 <sup>A</sup>	11,41±1,3	11,32 <sup>A</sup>	11,07±1,49	10,98 <sup>A</sup>
7	13,88±2,12	13,88 <sup>A</sup>	13,55±1,83	13,3 <sup>A</sup>	14,28±1,87	14,43 <sup>A</sup>	13,54±1,54	13,69 <sup>A</sup>
9	17,83±2,44	17,83 <sup>A</sup>	16,77±2,69	16,77 <sup>A</sup>	17,54±2,86	17,54 <sup>A</sup>	16,97±2,48	16,97 <sup>A</sup>
11	23,02±4,41	22,77 <sup>A</sup>	22,03±4,42	21,25 <sup>A</sup>	21,02±3,54	21,62 <sup>A</sup>	20,53±2,98	21,13 <sup>A</sup>
13	26,55±4,98	26,25 <sup>A</sup>	25,42±5,02	24,39 <sup>A</sup>	24,34±4,51	25,11 <sup>A</sup>	23,47±4,09	24,24 <sup>A</sup>
15	29,13±4,59	28,76 <sup>A</sup>	28,24±4,75	26,95 <sup>A</sup>	28,04±6,05	29,01 <sup>A</sup>	26,98±5,4	27,95 <sup>A</sup>
17	32,6±5,28	32,12 <sup>A</sup>	31,53±6,19	29,87 <sup>B</sup>	31,41±7,66	32,66 <sup>A</sup>	30,23±7,03	31,48 <sup>AB</sup>
19	36,52±6,94	35,91 <sup>A</sup>	35,74±7,17	33,64 <sup>A</sup>	35,46±10,1	37,03 <sup>A</sup>	34,31±9	35,88 <sup>A</sup>
21	42,57±8,09	42,57 <sup>A</sup>	41,2±7,78	41,2 <sup>A</sup>	40,79±11,85	40,79 <sup>A</sup>	39,7±10,32	39,7 <sup>A</sup>

Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.13 Idade média de abertura dos olhos dos filhotes de mães do grupo controle e do grupo tratado.**

Grupo	Idade (dias)
Tratado	13,65±0,87 <sup>a</sup>
Controle	13,94±0,81 <sup>a</sup>

Médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si (P>0,05).

**8.2.14 Análise de variância da altura do epitélio folicular das tireóides de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	29	49,849	-	-	-
Tratamentos	5	32,486	6,497	8,981	0,0525
Erro	24	17,362	0,7264	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 11,86%

**8.2.15 Análise de variância da altura do epitélio folicular das tireóides de ratas do grupo não gestante tratado e não tratado.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Teste F	Significância
<b>Total</b>	9	-	-
<b>Tratamentos</b>	1	1,596	0,3308
<b>Erro</b>	8	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 14%

**8.2.16 Análise de variância da concentração sérica de T4 total do soro de ratas do grupo tratado e controle.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	91,250	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	56,776	11,355	8,893	0,0174
<b>Erro</b>	27	34,474	1,277	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 25,04%

**8.2.17 Análise de variância da concentração sérica de T4 livre do soro de ratas do grupo não gestante tratado e do grupo não gestante não tratado.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Teste F	Significância
<b>Total</b>	9	-	-
<b>Tratamentos</b>	1	3,133	0,1473
<b>Erro</b>	8	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 15,05%

**8.2.18 Análise de variância do consumo diário de água de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	22	1385,2	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	3	540,81	180,27	4,056	0,0219
<b>Erro</b>	19	844,36	44,44	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 13,02%

**8.2.19 Análise de variância do consumo diário de ração de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	22	248,53	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	3	103,34	34,446	4,508	0,015
<b>Erro</b>	19	145,19	7,641	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 7,57%

**8.2.20 Análise de variância da porcentagem de secreção na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	10035	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	7292,3	1458,5	14,357	0,533
<b>Erro</b>	27	2742,7	101,58	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 55,18%

**8.2.21 Análise de variância da porcentagem de epitélio na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	1846,7	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	1121,8	224,36	8,357	0,1134
<b>Erro</b>	27	724,89	26,848	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 19,01%

**8.2.22 Análise de variância da porcentagem de tecido adiposo na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	11049	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	8925	1785	22,695	0,0016
<b>Erro</b>	27	2123,6	78,65	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 46,98%

**8.2.23 Análise de variância da porcentagem de tecido conjuntivo na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	2651,5	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	1358,2	271,64	5,671	0,127
<b>Erro</b>	27	1293,3	47,9	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 26,82%

**8.2.24 Análise de variância do número médio de células marcadas/campo pelo anticorpo CDC 47 na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	56709	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	31974	6394,7	6,980	0,0004
<b>Erro</b>	27	24735	916,12	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 34,18%

**8.2.25 Análise de variância do número médio de células marcadas pelo anticorpo Caspase 3 na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	31	1978,3	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	1523,1	304,63	17,4	0,0232
<b>Erro</b>	26	455,9	17,507	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 23,48%

**8.2.26 Análise de variância do número médio de mastócitos na glândula mamária de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado no 2° e 21° dia de lactação e no 5° dia de desmame.**

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
<b>Total</b>	32	142,93	-	-	-
<b>Tratamentos</b>	5	65,262	13,052	4,538	0,2207
<b>Erro</b>	27	77,665	2,876	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 29,74%

**8.2.27. Análise de variância do peso médio dos filhotes de mães do grupo tratado e do grupo não tratado.**

<b>Dia</b>	<b>Fontes de Variação/dia</b>	<b>Gl</b>	<b>Soma de quadrados do peso</b>	<b>Soma de quadrados do tamanho da ninhada</b>	<b>Soma de produtos: peso x tamanho da ninhada</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1</b>	<b>Total</b>	42	9,99	544,05	-28,91	6,86
	<b>Trat</b>	3	0,89	18,95	1,5	
	<b>erro</b>	39	9,1	525,1	-30,41	
<b>3</b>	<b>Total</b>	42	24,7	576,05	-24,55	8,98
	<b>Trat</b>	3	2,42	16,07	4,07	
	<b>erro</b>	39	22,28	559,98	-28,62	
<b>5</b>	<b>Total</b>	42	85,21	580,47	-99,37	11,83
	<b>Trat</b>	3	0,74	17,87	2,49	
	<b>erro</b>	39	84,47	562,6	-101,86	
<b>7</b>	<b>Total</b>	42	138,55	578,65	-173,88	15,06
	<b>Trat</b>	3	3,74	12,35	3,47	
	<b>erro</b>	39	134,76	566,3	-177,35	
<b>9</b>	<b>Total</b>	42	276,35	588,75	-301,46	9,55
	<b>Trat</b>	3	7,67	22,37	4,51	
	<b>erro</b>	39	268,68	566,38	-305,97	
<b>11</b>	<b>Total</b>	42	641,2	547,86	-399,98	13,44
	<b>Trat</b>	3	38,72	29,3	-24,77	
	<b>erro</b>	39	602,48	518,56	-375,21	
<b>13</b>	<b>Total</b>	42	915,99	542,42	-539,72	12,19
	<b>Trat</b>	3	56,2	26,06	-27,41	
	<b>erro</b>	39	859,79	516,36	-512,31	
<b>15</b>	<b>Total</b>	42	1075,81	542,42	-655,6	9,22
	<b>Trat</b>	3	24,46	26,06	-14,4	
	<b>erro</b>	39	1051,35	516,36	-641,2	
<b>17</b>	<b>Total</b>	42	1704,59	542,42	7,79	9,73
	<b>Trat</b>	3	29,53	26,06	-16,01	
	<b>erro</b>	39	1675,06	516,36	-1041,78	
<b>19</b>	<b>Total</b>	42	2721,59	338,79	-1057,79	17,75
	<b>Trat</b>	3	25,91	7,29	-16,01	
	<b>erro</b>	39	2695,68	331,5	-1041,78	
<b>21</b>	<b>Total</b>	42	3586,11	542,42	-1199,15	11,49
	<b>Trat</b>	3	44,37	26,06	-19,46	
	<b>erro</b>	39	3541,74	516,36	-1179,69	

**8.2.28 Análise de variância da idade de abertura dos olhos dos filhotes de ratas do grupo tratado e do grupo não tratado.**

<b>Fontes de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Teste F</b>	<b>Significância</b>
<b>Total</b>	21	-	-
<b>Tratamentos</b>	1	1,153	0,4221
<b>Erro</b>	20	-	-

**Coefficiente de variação (CV) = 6,19%**