

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

JULIANA APARECIDA MELLO LIMA

**AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE ORDENHAS NO INÍCIO DA  
LACTAÇÃO SOBRE DESEMPENHO PRODUTIVO E DINÂMICA DA  
RENOVAÇÃO CELULAR MAMÁRIA EM VACAS LEITEIRAS**

BELO HORIZONTE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

JULIANA APARECIDA MELLO LIMA

**AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE ORDENHAS NO INÍCIO DA  
LACTAÇÃO SOBRE DESEMPENHO PRODUTIVO E DINÂMICA DA  
RENOVAÇÃO CELULAR MAMÁRIA EM VACAS LEITEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia da Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor  
em Zootecnia.

Curso: Zootecnia

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Sandra Gesteira Coelho

Co-orientadores: Prof. Dr. Ângela M. Q. Lana

Prof. Dr. José Reinaldo Ruas

Prof. Dr. Anilton C. Vasconcelos

Escola de Veterinária da UFMG

Belo Horizonte, MG

L732a Lima, Juliana Aparecida Mello, 1985-  
Avaliação do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre desempenho produtivo e dinâmica da renovação celular mamária em vacas leiteiras / Juliana Aparecida Mello Lima. – 2015.  
119 p. : il.

Orientadora: Sandra Gesteira Coelho

Co-orientadores: Ângela M.Q. Lana, José Reinaldo Ruas, Anilton C. Vasconcelos  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. Vaca – Ordenha – Teses. 2. Apoptose – Teses. 3. Lactação – Teses.  
4. Úbere – Doenças – Teses. 5. Leite – Produção – Teses. 6. Desempenho produtivo – Teses. I. Coelho, Sandra Gesteira. II. Lana, Ângela Maria Quintão. III. Vasconcelos, Anilton César. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.  
V. Título.

CDD – 636.214 08

Tese defendida e aprovada no dia 23 de janeiro de 2015, pela comissão examinadora  
constituída por:

BANCA EXAMINADORA



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Gesteira Coelho - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Samarini Machado  
Universidade Federal de Minas Gerais



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suely de Fátima Costa  
Universidade Federal de Lavras



---

Prof. Dr. Giovanni Dantas Cassali  
Universidade Federal de Minas Gerais



---

Prof. Dr. Helton Mattana Saturnino  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte  
2015

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Josué e Sueli, que sempre foram meus exemplos e grandes amigos.

Ao meu irmão Rodrigo, pelo apoio.

Aos meus professores e amigos, pela paciência e confiança.

## AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade da realização de um sonho, que me fez crescer como pessoa e profissional.

À Fapemig pelo suporte financeiro para realização da etapa experimental.

À Professora Sandra Gesteira Coelho, pelos ensinamentos, apoio, dedicação, confiança durante estes anos.

Aos Professores Ângela Quintão Lana, José Reinaldo Mendes Ruas e Anilton César Vasconcelos, pela orientação e apoio quando precisei.

À CAPES pela bolsa de Doutorado.

À Fazenda Experimental da EPAMIG em Felixlândia, por abrir as portas da Fazenda, em que pude realizar o experimento.

Aos membros da banca examinadora, pela importante contribuição nesse trabalho e pelas sugestões apresentadas.

Aos Professores Antônio Último de Carvalho e Alan Maia Borges, pela amizade, apoio, ensinamentos e confiança.

Ao Arthur C. Prandi, pela paciência, companheirismo, apoio e amor.

Aos novos irmãos conquistados durante estes quatro anos de doutorado, Lú Galega, Amandinha, Rebeca, Celso, Dudu, Paolo, Lú Preta, Flávio, Kissia, Daniel, Fabi e Seu João (que é mais pai do que irmão).

À Mari, Luciele, Isa, Tete, Helena, Bruninha, Betânia e Jú Leão pela amizade, ajuda na confecção deste trabalho e por tornar esses quatro anos de doutorado muito alegres.

Às novas amigas do ICB, Heloísa, Teresa e Luciana pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Aos meus amigos Luciele Gusmão, Manu, Rafael, Sheila, Alexandre, Alessandro, Camila, Guto e Renata que mesmo distantes sempre estiveram presentes me apoiando quando precisei.

Ao Departamento Feminino da Loja Flor de Maio, pelo apoio e carinho.

À equipe do Colegiado de Pós-graduação, pela prestabilidade e atenção.

À todos os colegas de pós-graduação que sempre se dispuseram a servir.

À todos os alunos da graduação que de alguma forma também participaram do meu aprendizado.

Expresso meu agradecimento a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização desse trabalho.

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando... Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive, já morreu...”

**Sarah Westphal**

---

## SUMÁRIO

---

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	ANATOMIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	14
2.2	DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	15
2.2.1	Gestação.....	15
2.2.2	Lactação.....	17
2.2.3	Período seco.....	20
2.3	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	22
2.3.1	Célula-tronco.....	23
2.3.2	Ciclo celular.....	23
2.3.2.1	Mecanismos de controle.....	25
2.3.2.2	Sinalização intracelular ou intrínseca.....	25
2.3.2.3	Sinalização extracelular ou extrínseca.....	27
2.3.3	Métodos de detecção da proliferação celular.....	29
2.4	APOPTOSE CELULAR.....	30
2.4.1	Morfologia da apoptose.....	31
2.4.2	Mecanismos da apoptose.....	32
2.4.2.1	Caspases.....	33
2.4.2.2	Via intrínseca.....	34
2.4.2.3	Via extrínseca.....	35
2.4.2.4	Via de execução.....	36
2.5	Métodos de detecção da apoptose celular.....	36
2.5	ADAPTAÇÕES DA GLÂNDULA MAMÁRIA AO NÚMERO DE ORDENHAS	38
2.5.1	REGULAÇÃO LOCAL DA PRODUÇÃO DE LEITE.....	41
2.5.1.1	Fatores inibidores da lactação (FIL).....	41
2.5.1.2	Captação de nutrientes, pressão e fluxo sanguíneo intramamário.....	42
2.5.1.3	Resposta celular.....	43
2.5.1.4	Efeito da frequência de ordenha sobre a expressão gênica.....	45
2.6	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA.....	47
<b>3.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	66
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	66

### CAPÍTULO I

#### Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield

<b>Abstract</b> .....	67
<b>Implications</b> .....	67
<b>Introduction</b> .....	68
<b>Materials and methods</b> .....	69
<i>Animals, Management and Sampling</i> .....	69
<i>Tissue Sampling and Analysis</i> .....	70
<i>Histological procedures</i> .....	71
<i>Statistical Analysis</i> .....	72
<b>Results and Discussion</b> .....	72
<i>Evaluation of Biopsy Samples</i> .....	72
<i>Udder Health</i> .....	74
<i>Production and milk composition</i> .....	76

<b>Conclusions.....</b>	77
<b>Acknowledgments.....</b>	77
<b>References.....</b>	77

## CAPÍTULO II

### Efeito do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre produção de leite, proliferação e apoptose celular mamária em vacas leiteiras

<b>RESUMO.....</b>	86
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	87
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	88
<i>Animais, Tratamentos e Amostragem.....</i>	88
<i>Biopsia mamária.....</i>	89
<i>Procedimentos histológicos.....</i>	90
<i>Imunohistoquímica.....</i>	90
<i>TUNEL.....</i>	90
<i>Ki-67.....</i>	91
<i>Quantificação da imunohistoquímica e histomorfometria.....</i>	92
<i>Análises estatísticas.....</i>	93
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	93
<i>Produção e composição do leite.....</i>	93
<i>Apoptose e proliferação celular mamária.....</i>	96
<i>Morfologia mamária.....</i>	99
<b>CONCLUSÕES.....</b>	100
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	101
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	117

---

## LISTA DE TABELAS

---

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1.	Principais eventos que ocorrem durante as fases que representam a mitose celular.....	24
Tabela 2.	Principais complexos ciclina-CDK, envolvidos no ciclo celular.....	25
Tabela 3.	Resultados de trabalhos publicados sobre os efeitos do aumento da frequência de ordenhas (AFO) no início da lactação sobre produção e composição do leite em vacas da raça Holandesa e mestiças.....	40

### CAPÍTULO I

Tabela 2.	Effect of two (2X) ou four (4X) milkings daily during the first 21 days of lactation, followed by twice a day milking until 28 days of lactation on frequency of occurrence of hematoma, intramammary bleeding, blood clots, edema, areas of fibrosis, mastitis and duration in days (d) of intramammary bleeding, blood clots and edema of F1 Holstein × Zebu cow after the biopsy procedure.....	80
Tabela 2.	Effect of biopsy procedure on body weight, milk composition, milk somatic cell count (SCC), and body condition score (BCS) of F1 Holstein × Zebu milking cows before and after the biopsy procedure.....	81
Tabela 3.	Effect of biopsy procedure on day two, seven, 14, 21, 28 of lactation on estimated average milk production (kg/d) of F1 Holstein × Zebu milking cows one day before biopsy (-1), on the day of biopsy (0) and five consecutive days after biopsy procedure (1, 2, 3, 4, 5).....	82

### CAPÍTULO II

Tabela 3.	Produção de leite e componentes do leite (%), durante 4-21 d, 22-210 d e 4-210 d da lactação, de vacas ordenhadas duas (2X) e quatro vezes ao dia (4X) do 2-21 d pós-parto (PP) e seguidas por duas ordenhas no restante da lactação.....	105
Tabela 2.	Produção dos componentes do leite (kg/d) e da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (kg/d), durante 4-21 d, 22-210 d e 4-210 d da lactação, de vacas ordenhadas duas (2X) e quatro vezes ao dia (4X) do 2-21d pós-parto (PP) e seguidas por duas ordenhas no restante da lactação.....	106
Tabela 3.	Diferença entre a taxa de proliferação e apoptose no epitélio celular mamário de vacas ordenhadas quatro vezes diariamente, do segundo ao 21° dia da lactação (4X) e vacas ordenhas duas vezes ao dia durante toda a lactação (2X).....	107

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO I

- Figura 4. Micrograph of (A) alveoli with poorly differentiated cells at d 2 after calving, (B) engorged alveoli at d 2 after calving, and (C) alveoli with poorly differentiated cells at d 7 after calving, from mammary tissue samples obtained from a single cow milked twice/d until 28 DIM..... 83
- Figura 2. Micrograph of alveoli and cells of mammary tissue sample obtained at (A) 14, (B) 21, and (C) 28 d after calving from cows milked two or four times/d until 21 DIM and twice/d from 22 to 28 DIM..... 84
- Figura 3. Distribution of number of biopsied quarters by days after biopsy for quarters that presented milk with blood, milk with blood clots, or edema..... 85

### CAPÍTULO II

- Figura 5. Rotina de ordenha e horário das biopsias mamárias..... 108
- Figura 2. Mudança na produção de leite em resposta ao aumento da frequência de ordenha (AFO)..... 109
- Figura 3. Fotomicrografia mostrando células imunorreativas ao anticorpo Ki-67 no epitélio (setas vazadas) e no estroma mamário (setas pretas) de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação..... 110
- Figura 4. Percentagem de células epiteliais mamárias (CEM) marcadas por Ki-67 de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação..... 111
- Figura 5. Percentagem de células do estroma mamárias marcadas por Ki-67 de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação..... 112
- Figura 6. Fotomicrografia mostrando célula TUNEL positiva no epitélio (A e B; setas pretas) e no estroma mamário (C e D; setas vazadas) de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação..... 113
- Figura 7. Percentagem de apoptose em células epiteliais e luminal de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação..... 114
- Figura 8. Percentagem de apoptose em células do estroma em biopsias mamárias coletadas de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação..... 115
- Figura 9. Proporções em percentagem de área (%) ocupada pelos alvéolos (epitélio e lúmen mamário), estroma, epitélio celular mamário e lúmen de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação, seguidas por duas ordenhas até o final da lactação..... 116

---

**LISTA DE ANEXOS**

---

Anexo 6.	Comprovante de submissão do artigo que tem como título “Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield.....	118
----------	---	-----

## RESUMO

O aumento da frequência de ordenha (AFO) no início da lactação resulta em estímulo positivo na produção de leite, que se mantém parcialmente ao longo de toda a lactação. Contudo, os efeitos do AFO sobre a renovação celular e saúde do úbere ainda não foram completamente entendidos. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de biopsias mamárias sobre as características dos tecidos obtidos, a saúde do úbere pós-biopsia e determinar os efeitos do aumento da frequência de ordenhas (AFO) durante o início da lactação sobre a produção, composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite, histomorfometria, proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias. Dezesesseis vacas mestiças F1 Holandês x Zebu (HxZ) foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. O grupo controle foi ordenhado duas vezes ao dia (2X) durante toda lactação, e o grupo submetido ao AFO foi ordenhado quatro vezes (4X) a partir do segundo dia (d) da lactação até 21 d, e duas ordenhas do dia 22 até 210 da lactação. Biopsias mamárias foram realizadas em oito vacas por grupo nos dias dois, sete, 14, 21, 28 após o parto. Avaliações qualitativas e quantitativas dos tecidos foram realizadas por exame histológico. A saúde do úbere foi avaliada diariamente até 60 dias da lactação pela presença visual de alterações no leite, como sangue, grumo e coágulos, pelo California Mastitis Test (CMT) e por registro sinais clínicos de mastite. A composição do leite e contagem de células somáticas foram avaliadas pré e pós-biopsia. A produção de leite foi avaliada antes, no dia e durante cinco dias após a biopsia. A produção, composição e CCS também foram avaliadas diariamente do 4 d até 30 d e quinzenalmente até 210 d após o parto. As biopsias resultaram em média na obtenção de 10 campos, contados com a objetiva de 40x. Não houve mudanças na morfologia mamária entre os grupos 2X e 4X em nenhum dos tempos avaliados. Hemorragias intramamária e alterações do CMT foram observadas em 96 e 75% das biopsias, respectivamente. Mastite clínica foi diagnosticada em 12% dos quartos biopsiados. A produção de leite reduziu nos dias posteriores a biopsia realizada nos dias dois, 14 e 21 da lactação, restabelecendo-se em dois dias. A composição e a contagem de células somáticas do leite sofreram alterações transitórias. Durante os primeiros 21 dias da lactação, o grupo 4X produziu  $2,6 \pm 0,2$  kg/d a mais de leite do que o grupo controle ( $P < 0,05$ ) e após este dia manteve produção de leite semelhante a do grupo controle até o final da lactação ( $P > 0,05$ ). Não houve diferença na produção de leite ao longo dos 210 dias da lactação ( $P > 0,05$ ). Nos três períodos avaliados não houve diferença na percentagem de gordura, proteína e lactose ( $P > 0,05$ ). No período do AFO a CCS, o rendimento de gordura e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foram maiores em 4X do que 2X ( $P < 0,05$ ), não havendo diferença após este período e ao longo da dos 210 dias da lactação ( $P > 0,05$ ). A proliferação e apoptose do epitélio, estroma e total de células mamárias, bem como a proporção de tecido mamário ocupado por alvéolos, estroma, epitélio e lúmen não foram afetadas pelo AFO ( $P > 0,05$ ). Mudanças na frequência de ordenha durante o início da lactação não altera a dinâmica população de células.

**Palavras-chave:** apoptose, CCS, histologia, histomorfometria, número de ordenhas, proliferação

## **ABSTRACT**

The increased milking frequency (IMF) during early lactation stimulates an increase in milk yield that partially persists through the remainder of lactation. However, the effects of IMF on cellular turnover and udder health have not been clearly established. The objectives of the present study were to evaluate the effects of mammary biopsies on tissue characteristics post-biopsy, udder health and determine the effect of increased milking frequency (IMF) during early lactation on milk yield, composition and somatic cell count (SCC), histomorphometry, proliferation and apoptosis in mammary epithelial cells. Sixteen cows  $\frac{1}{2}$  Holstein  $\times$  Zebu (HxZ) were randomly distributed into two groups. The control group was milked twice a day (2X) throughout the entire lactation, and the group subjected to IMF was milked four times a day (4X) from two to 21 DIM, and twice a day (2X) from 22 to 210 DIM. Mammary biopsies were performed in eight cows from each group on days 2, 7, 14, 21, and 28 postpartum. Qualitative and quantitative analyses of the tissues were conducted by histologic examination. Udder health was assessed daily from calving to 60 DIM with California Mastitis Test (CMT) and by noting alterations in the milk such as blood, milk clots, blood clots, clinical signs of mastitis. Milk composition and SCC were analyzed before and after the biopsies. Milk production was evaluated before biopsy, on the day of biopsy, and after the biopsy. Milk production, composition and SCC were measured daily from 4 to 30 DIM and then each 15 days until 210 d postpartum. An average of 10 fields at 40 $\times$  magnification was obtained from each sample. There were no evident changes in mammary morphology as result of milking two or four times/d at any of the evaluated time points. Biopsy wounds healed rapidly without infection. Intramammary bleeding and CMT alterations were observed in 96% and 75% of the biopsied mammary quarters, respectively. Clinical mastitis was diagnosed in 12% of the biopsied quarters. Milk production decreased after biopsies done on days 2, 14, and 21, but it returned to pre-biopsy values within two days. Milk composition and SCC were affected transiently. During the first 21 d of lactation, milk yield in the 4X was  $2.6 \pm 0.2$  kg/d higher than the control group ( $P < 0.05$ ) and after this day maintained milk yield similar to the control group until the end of the lactation ( $P > 0.05$ ). There was no difference in milk yield up to 210 DIM ( $P < 0.05$ ). In the three periods, there was no difference in the percentage of fat, protein and lactose ( $P > 0.05$ ). During the IMF, milk SCC, yield, fat corrected milk (3.5%) were higher in 4X than 2X ( $P < 0.05$ ) and there was no difference after this period and up to 210 DIM ( $P > 0.05$ ). The proliferation and apoptosis of epithelium, stroma and total of mammary cells, as well as the proportion of mammary tissue occupied by alveoli, stroma and lumen were not affected by IMF ( $P > 0.05$ ). Changes in milking frequency during early lactation did not alter mammary cell population dynamics

**Keywords:** apoptosis, histology, histomorphometry, number of milkings, proliferation, SCC

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite tem importância como componente da nutrição humana e para a economia mundial. Desta forma, otimizar o processo de produção trará benefícios para os consumidores, produtores e inclusive para os animais, por intermédio de melhorias na eficiência da produção e saúde do animal. Para alcançar tais objetivos é fundamental maior compreensão dos mecanismos envolvidos no processo da lactação e sua regulação. A produção de leite, e conseqüentemente, o tipo de curva da lactação é resultante do número e da capacidade secretora das células epiteliais mamárias, sendo o número de células reflexo do balanço coordenado entre proliferação e apoptose celular (renovação celular) (BOUTINAUD et al., 2004). Em diferentes espécies, o aumento da produção de leite até o pico de produção é acompanhado pelo aumento do número e/ou atividade celular, enquanto que o inverso caracteriza a queda da produção após o pico (CAPUCO et al., 2001).

Sistemas de produção de leite tem sido tradicionalmente projetados para maximizar a produção de leite diária, na crença de que isto aumentaria a eficiência econômica. A primeira vista, a maneira mais fácil de aumentar a produção de leite diária seria aumentar a proliferação celular. No entanto, uma vez que a vaca leiteira, já está sujeita a considerável pressão metabólica no período que consiste do parto ao pico de lactação, aumentar a produção destes animais até o pico não seria a opção mais desejável. Então, devemos nos concentrar nos eventos que ocorrem após o pico, visando obter maior persistência da lactação. Desta forma, o conhecimento sobre os processos relacionados à renovação (proliferação e apoptose) e atividade celular em células mamárias, e como estes são regulados, pode proporcionar ferramentas para manipulação da curva de lactação, e conseqüentemente, a sua persistência.

Já são conhecidos diversos fatores fisiológicos ou não, relacionados a doenças e ao manejo, como a utilização de hormônios, frequência de ordenha e a nutrição, além do *status* reprodutivo, que podem ter potencial impacto sobre a proliferação e perdas de células durante a lactação. As práticas de manejo podem estar relacionadas com aumento da proliferação celular e/ou diminuição da apoptose, enquanto que doenças, como a mastite desencadeiam o aumento da apoptose. Portanto, a compreensão de como a glândula mamária se comporta, no plano celular, é essencial para maximizar os efeitos positivos proporcionados pela adoção destas práticas de manejo e minimizar os efeitos negativos na ocorrência de doenças.

Apesar de estabelecida a importância do conhecimento da dinâmica da população celular mamária durante a lactação, durante muito tempo, estudos nesta área se restringiram a amostras obtidas por meio de procedimento de necrópsia. Pesquisas tem focado no desenvolvimento de novas técnicas para obtenção de amostras *in vivo*, como a técnica cirúrgica (FARR et al., 1996), com utilização de agulhas de biopsia acopladas a sistema automático (NØRGAARD et al., 2005), agulha de biopsia utilizando sistema a vácuo (VANKLOMPENBERG et al., 2012) e o uso de micropartículas obtidas no leite para avaliar apoptose (POLLOTT et al., 2014). Porém, com exceção da última técnica, todas as outras, embora muito utilizadas, ainda apresentam certas limitações devido ao seu caráter invasivo e pela restrição de dados relacionados aos potenciais efeitos adversos da sua utilização sobre a produção de leite e saúde do úbere.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária é a estrutura responsável pela síntese e secreção do leite. Em bovinos, a glândula mamária está contida no úbere, o qual consiste de tetos, ductos, alvéolos e o tecido de suporte. O úbere possui quatro glândulas mamárias que são divididas e separadas em duas metades pelo ligamento suspensor medial, que é responsável pela fixação do úbere à parede do corpo (AKERS, 2002). Os quartos dianteiros e traseiros são separados por uma fina membrana de tecido conjuntivo. Não há ligação interna entre o sistema de ductos dos quartos mamários (FRANZ et al., 2009).

O leite é drenado do tecido secretor para a cisterna da glândula a partir dos ductos primários ou interlobulares. O teto permite a saída do leite da cisterna da glândula para o meio externo, passando pela cisterna e canal do teto. Existem três tipos de tecido na glândula mamária: tecido adiposo, tecido conjuntivo (estroma) e tecido secretor (parênquima). O tecido adiposo é o tecido sobre o qual os ductos crescem (NEVILLE et al., 1998). O estroma é o tecido conjuntivo que envolve os alvéolos e fornece suporte estrutural para a glândula mamária (AKERS, 2002). O parênquima é o tecido secretor, o qual contém sistema de ductos e lobos. Os lobos são compostos por vários lóbulos, que incluem os grupos de alvéolos e seus ductos vizinhos, também chamados de ductos secundários ou intralobular (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003). Os alvéolos são compostos por dois principais tipos de células epiteliais: basal e luminal. As células epiteliais basais são formadas por células mioepiteliais, que constituem a camada externa dos alvéolos que tem como função contrair os alvéolos a partir da ação do hormônio ocitocina, promovendo a expulsão do leite, e uma pequena população de células-tronco, a partir das quais são formados os diferentes tipos celulares observados na glândula mamária. As células epiteliais luminiais são constituídas por uma única camada de células enquanto que o tecido não secretor, duas ou mais camadas (AKERS, 2002; MCMANAMAN e NEVILLE, 2003). O epitélio luminal e basal forma uma bicamada de estrutura tubular que permite desenvolver a função de produção de leite durante a lactação.

## 2.2 DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

O desenvolvimento da glândula mamária é um processo contínuo que tem início ainda na vida fetal, se estendendo durante toda a vida adulta (SVENNERSTEN-SJAUNJA e OLSSON, 2005). Com exceção do desenvolvimento que ocorre durante a vida fetal, as quatro fases de desenvolvimento da glândula mamária estão relacionadas com a reprodução, e ocorrem durante a pré e pós-puberdade, gestação, lactação e período seco. O desenvolvimento da glândula mamária é controlado por uma interação entre hormônios endócrinos e fatores produzidos dentro do tecido mamário que promovem mudanças na morfologia e dinâmica celular ao longo de todas as fases do desenvolvimento (NEVILLE et al., 2002). As estruturas básicas da glândula mamária e ramificação dos ductos são formadas durante a fase fetal, pré e pós-puberal, respectivamente, mas a glândula mamária ainda sofre extensa transformação nas etapas seguintes de desenvolvimento (MACIAS e HINCK, 2012). Nesta revisão será abordado apenas o desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação, lactação e período seco.

### 2.2.1 Gestação

A glândula mamária sofre diversas transformações para se preparar para lactação. Estas mudanças que ocorrem durante a gestação requerem desenvolvimento e lactogênese da glândula mamária. O crescimento mamário acelera com o avançar da gestação, tendo durante o estágio final, máximo crescimento, que coincide com o maior crescimento fetal. Por isso, a gestação é considerada o período de maior crescimento e de extrema importância na determinação do número de células da glândula em lactação, o que influencia diretamente sua produção de leite.

Após a concepção, a manutenção do corpo lúteo e a placenta são responsáveis por produzir e manter elevada a concentração sanguínea de progesterona ao longo de toda a gestação, apresentando queda próximo ao parto. Enquanto que as concentrações de estradiol aumentam gradualmente durante a gestação, com maior concentração durante as últimas semanas antes do parto (BELL, 1995). Consequentemente, estes hormônios estão simultaneamente em altas concentrações, principalmente durante sua porção final da gestação. O crescimento acelerado durante a gestação é provavelmente devido ao aumento das

concentrações e da secreção sincrônica entre estrogênio e progesterona. O estrogênio estimula o desenvolvimento dos ductos mamários, principalmente durante os três a quatro primeiros meses de gestação, e a progesterona e estrogênio juntos estimulam o desenvolvimento do tecido alveolar que inicia após o quinto mês (AKERS, 2002). Além das concentrações dos hormônios esteróides, fatores como a habilidade do tecido mamário em responder a estes hormônios também devem ser levados em consideração. Embora muitos pesquisadores considerem que receptores específicos para estes hormônios sejam pouco expressos, SCHAMS et al. (2003) reportaram expressão significativa dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) ao longo da gestação, lactação e involução em bovinos. Dados obtidos em camundongos, em que os receptores de estrogênio e progesterona foram excluídos, confirmam que a ligação do estrogênio ao seu receptor promove sinalização essencial para a morfogênese dos ductos, enquanto que a sinalização promovida pela ligação da progesterona ao seu receptor é crítica para o desenvolvimento lóbulo-alveolar (SVENNERSTEN-SJAUNJA e OLSSON, 2005). Contudo, em condições fisiológicas normais, o estradiol pode estimular indiretamente a formação lóbulo-alveolar por induzir a expressão de RP mamários via RE. O contrário também foi observado *in vitro*, sendo necessárias mais pesquisas para confirmar esta interação (ATWOOD et al., 2000). A resposta mitogênica induzida pelo estrogênio e progesterona pode ser mediada via secreção parácrina de fatores de crescimento pelas células do epitélio mamário negativas para RE/RP, que então estimula o epitélio celular a proliferar (TUCKER, 2000).

No entanto, os hormônios esteróides na ausência dos hormônios hipofisários apresentam pouca ou nenhuma atividade mamogênica. Estudo em ratos e camundongos após a remoção da hipófise e dos ovários, ou da hipófise, dos ovários e da adrenal demonstraram que além do estrogênio, a somatotropina ou hormônio do crescimento (GH) e corticóide também são necessários para o desenvolvimento dos ductos (TUCKER, 2000). Se progesterona e prolactina forem adicionadas a esta combinação, o crescimento lóbulo-alveolar é estimulado (NEVILLE et al., 2002). Apesar da presença dos hormônios hipofisários serem importantes, mas não limitantes para o desenvolvimento mamário, ainda não foi completamente estabelecido se a prolactina ou o GH predomina sobre a mamogênese em bovinos (AKERS, 2006). Experimentos com avaliação gênica tem demonstrado que a formação das estruturas lóbulo-alveolares em resposta a ativação dos receptores de progesterona e prolactina estimulam as vias Start5, ciclina D1 e Wnt (MCMANAMAN e NEVILLE, 2003), que são

responsáveis pela ativação de fatores de transcrição específicos que controlam a transição pelas diferentes fases do ciclo celular, ou seja, a proliferação celular.

### 2.2.2 Lactação

Lactogênese (indução da síntese do leite) é o processo de diferenciação celular em que o epitélio mamário adquire a habilidade de sintetizar os componentes do leite e que ocorre em dois estádios distintos (NEVILLE et al., 2002). O primeiro estágio tem início ainda durante a gestação e consiste na parcial diferenciação enzimática e citológica das células alveolares que resulta em limitada secreção de leite. Enquanto o segundo estágio da lactogênese consiste na síntese e secreção de todos os componentes do leite que se inicia pouco tempo antes do parto com a síntese do colostro (AKERS, 2006). Nesta fase observam-se maior absorção de precursores sanguíneos, fechamento das *tight junctions*, aumento da expressão de genes que sintetizam proteína e início da síntese de lactose. As vesículas secretoras se localizam na região apical das células e também passam a ser secretadas para o lúmen (NGUYEN et al., 2001; NEVILLE et al., 2002). Os principais promotores da diferenciação celular durante a lactogênese são a prolactina e os glicocorticoides, que aumentam suas concentrações durante o final da gestação. Em ruminantes voltados para a produção de leite, há aumento na concentração de prolactina, enquanto que aguda secreção de glicocorticoides ocorre no dia do parto (BELL, 1995; AKERS, 2002). A prolactina age aumentando a expressão gênica das proteínas do leite, principalmente da caseína e  $\alpha$ -lactoalbumina, por meio da ativação da molécula Start5 (transdutora e ativadora do sinal da transcrição 5) que intermedeia os efeitos da prolactina (TUCKER, 2000). Já os glicocorticoides, principalmente o cortisol, tem por função potencializar a ação da prolactina ao participar da regulação do fechamento das *tight junction* (STELWAGEN et al., 1998), captação de glicose pela glândula mamária (PATERSON e LINZELL, 1974), além de interagir com a Start5 melhorando a ação da prolactina sobre a indução da expressão gênica da  $\beta$ -caseína (AKERS, 2002). Contudo, outros hormônios podem modular positivamente ou negativamente a ação destes hormônios. O estrogênio estimula a produção de prolactina e seus receptores (TROTT et al., 2009). A progesterona tem efeito inibidor sobre os hormônios lactogênicos ao competir pelos receptores de glicocorticóides, impede o sinergismo entre estrogênio e prolactina, além de inibir a síntese e a ação da prolactina (AKERS, 1985). Por isso, alta concentração de

progesterona inibe o início da lactogênese e esta só é permitida próximo ao parto com a queda de sua concentração. Após estabelecida a lactação a progesterona não exerce efeito algum sobre a produção de leite ou função mamária devido a ausência ou baixa expressão de seus receptores no epitélio mamário (HASLAM e SHYAMALA, 1980).

Galactopoiese consiste nas alterações hormonais, morfológicas e na dinâmica da população celular para a manutenção da lactação que requer número de células, capacidade secretora por células e eficiência no processo de ejeção do leite (TROTT et al., 2012). Embora ocorram variações entre diferentes espécies, a manutenção da lactação é regulada por hormônios chave como a prolactina, GH, ocitocina e hormônios tireoidianos (TRAVERS et al., 1996). Com a lactação estabelecida, prolactina é liberada durante a ordenha ou amamentação, indicando a sua função na manutenção da lactação. A administração de um inibidor da liberação de prolactina esta associada com a redução da atividade, da sobrevivência e da proliferação celular, sugerindo que a prolactina liberada durante a ordenha é importante para a manutenção do epitélio celular mamário em diferenciação (BOUTINAUD et al., 2012; BEN CHEDLEY et al., 2011). O efeito galactopoiético do GH em vacas em lactação é demonstrado pelo uso exógeno deste hormônio que resulta na manutenção da lactação e aumento da produção de leite entre 10 e 15% (BAUMAN, 1992). Em ruminantes especula-se que o efeito do GH sobre a glândula mamária é mediado via Fator de Crescimento Semelhante à Insulina - I (IGF-I) que promove a manutenção do número de células pelo aumento da proliferação (KNIGHT et al., 1990; CAPUCO et al., 2001) e sobrevivência das células mamárias (BALDI et al., 2002; BOUTINAUD et al., 2004), além de aumentar a disponibilidade de nutrientes para a glândula mamária sintetizar os componentes do leite (BAUMAN, 1992). Se o GH age diretamente na glândula mamária ou apenas via produção local de IGF-I ou via IGF-I produzido no fígado ainda não foi totalmente estabelecido. No entanto, a presença de receptores de GH no estroma e epitélio mamário de ratos sugere que este hormônio possa ter efeito direto sobre a função e/ou diferenciação das células do epitélio mamário (ILKBAHAR et al., 1999). A ocitocina esta envolvida na ejeção do leite principalmente pela ativação das células mioepiteliais, embora para BALLOU et al. (1993) a ocitocina também pode afetar diretamente a produção ou manutenção de células epiteliais mamárias. Especula-se que a função da tiroxina é aumentar a atividade secretora das células melhorando o efeito de outros hormônios como a prolactina e GH (CAPUCO et al., 1989).

O número de células dentro de um órgão ou tecido depende da taxa de proliferação (surgimento de novas células por divisão celular – mitose) e morte celular (apoptose - morte celular programada). De acordo com CAPUCO et al. (2001) a glândula mamária cresce quando a taxa de proliferação excede a de apoptose, regride quando a taxa de apoptose é maior que a taxa de proliferação celular e o número de células se mantém constante ao se igualarem as taxas de proliferação e apoptose. Logo, a taxa de renovação celular pode ser definida como o balanço entre a proliferação celular e apoptose. KNIGHT e PEAKER (1984) estimaram o número de células mamárias e a sua atividade secretora durante a lactação de cabras. Este estudo demonstrou que o aumento da produção de leite durante o início da lactação foi resultado do aumento do número de células, seguido do aumento da atividade secretora por célula. CAPUCO et al. (2001), SORENSEN et al. (2006) e NØRGAARD et al. (2008) avaliaram a dinâmica celular mamária durante a lactação de bovinos e observaram que a taxa de proliferação celular se mantém baixa e constante ao longo da lactação enquanto que a taxa de apoptose apresenta pico no dia 14 da lactação e depois declina, permanecendo constante até o final da lactação. Embora baixas taxas de apoptose e proliferação celular ocorram durante a lactação, extensa renovação celular, com aproximadamente 50% de substituição das células ocorre ao longo da lactação. Isto sugere que o aumento da proliferação celular mamária, evidente durante a gestação e período seco, não continua no início da lactação. Segundo CAPUCO et al. (2001) o aumento da produção de leite durante o início da lactação se deve a elevação da atividade secretora por célula, na ausência de crescimento mamário, uma vez que a taxa estimada de proliferação celular (0,3% por dia) foi menor que a de apoptose (0,56% por dia), o que caracteriza gradual redução do número total de células mamárias com o avançar da lactação. No entanto SORENSEN et al. (2006) e NØRGAARD et al. (2008) não encontraram resultados consistente em relação ao aumento da atividade celular durante o início da lactação.

Após o pico da lactação, tanto para caprinos (KNIGHT e PEAKER, 1984) quanto para bovinos (CAPUCO et al., 2001; SORENSEN et al., 2006) a diminuição da produção de leite com o avançar da lactação, ou seja, o formato da curva da lactação está relacionado primeiramente com o processo de renovação celular que leva ao declínio do número de células. Contudo, durante o final da lactação, quando as vacas estão concomitantemente lactantes e gestantes é provável que a atividade secretora das células também decline, acompanhando o avançar da gestação, consistente com a coordenada adaptação metabólica

requerida pela gestação e lactação. Este efeito é facilmente perceptível durante o final da gestação, quando se observa aumento no número de células epiteliais mamárias simultaneamente com o rápido declínio na produção de leite (CAPUCO et al., 1997).

### 2.2.3 Período seco

A interrupção das ordenhas ou desmama do bezerro resulta em mudanças rápidas no tecido mamário (HURLEY, 1989). Em vacas, a adoção de um intervalo não lactante é fundamental para maximizar a produção de leite da lactação subsequente. A ausência ou reduzida duração do período seco resulta em diminuição em até 20% da produção de leite da lactação seguinte, tendo como intervalo recomendado de duração do período seco entre 40 a 60 dias (REMOND et al., 1997; SORENSEN e ENVOLDSSEN, 1991). Várias hipóteses foram propostas para explicar a necessidade do período seco, entre elas pode-se destacar o restabelecimento de reservas corporais, regeneração do tecido mamário e otimização dos benefícios dos eventos endócrinos próximo ao parto (SMITH et al., 1967). Contudo, atualmente este manejo se justifica por razões que se concentram mais na glândula mamária do que sobre o status nutricional e/ou endócrino do animal (ANNEN et al., 2004).

Alterações na composição da secreção mamária durante a fase inicial do período seco, como a redução da concentração de lactose, gordura e potássio, e aumento das concentrações de proteína, imunoglobulinas, células somáticas e sódio, indicam rápida mudança nos mecanismos envolvidos na síntese e secreção do leite (HURLEY, 1989). Para compreender o que ocorre durante este período é necessário avaliar as mudanças morfológicas e citológicas do tecido em associação com a dinâmica da população celular mamária. Análises morfométricas demonstram que a área ocupada pelo epitélio mamário não reduz e as estruturas alveolares permanecem intactas durante o período seco (CAPUCO et al., 1997; WILDE et al., 1997; HOLST et al., 1987). Diferente do observado no período de involução mamária de roedores não gestantes, onde com dois dias de estase do leite ocorre o desprendimento das células epiteliais da membrana basal para o lúmen (RICHARDS e BERSON, 1971) e perda de mais de 70% da população celular durante este período (KNIGHT e PEARL, 1982). Por estas diferenças o roedor passou a não ser o melhor modelo animal para se estudar o período seco em bovino.

De acordo com HURLEY (1989), o período seco em vacas leiteiras pode ser dividido em duas fases: a involução ativa após a interrupção da retirada do leite, seguido de um período de remodelação antes da próxima lactação. Durante a fase de involução, a área do lúmen alveolar diminui em associação ao aumento da área de estroma interalveolar (CAPUCO e AKERS, 1999). Também foi observada a presença de alterações citológicas como acúmulo de produtos secretados e formação de grandes vesículas, devido à diminuição de vesículas secretoras que se fundem com a membrana apical das células epiteliais mamárias, redução do tamanho e quantidade de organelas citoplasmáticas e enzimas envolvidas na síntese do leite e aumento da permeabilidade das *tight junctions* (HOLST et al., 1987). Após três a quatro semanas de involução tem início a próxima fase do período seco. Esta fase mamogênica é caracterizada por remodelação da glândula, em que ocorre o inverso do observado na fase de involução, apresentando células preparadas para a síntese e produção de leite e maior proporção de área luminal em comparação a área de estroma (CAPUCO et al., 1997; HURLEY, 1989; SORDILLO e NICKERSON, 1988).

Além das mudanças morfológicas, o período seco também é caracterizado pela perda de células mamária por morte celular programada (apoptose). Segundo WILDE et al. (1997), sete dias depois de cessadas as ordenhas, pode-se observar elevada taxa de apoptose de 4,8% em tecido mamário bovino, duas vezes maior do que o observado no final da lactação. Durante o período seco de vacas gestantes o comportamento da população de células mamárias consiste em elevadas taxas de apoptose no início do período seco com redução destas com o avançar do período seco e proximidade do parto, enquanto ocorre aumento significativo na proliferação de células do início para o final do período seco (CAPUCO et al., 1997; SORENSEN et al., 2006; NØRGAARD et al., 2008). Durante o final da gestação, particularmente oito dias antes do parto, o crescimento mamário é maximizado devido à reduzida apoptose e máxima proliferação celular (FITZGERALD, 2004). Estes resultados em conjunto demonstram que durante o período seco de vacas gestantes não ocorre perda do epitélio celular, mas sim renovação do mesmo pela substituição de células senescente, devido à sobreposição dos efeitos mamogênicos da gestação sobre os efeitos apoptóticos induzidos pela estase do leite, por isso, o período seco foi mais recentemente caracterizado com período regenerativo e não de involução propriamente dito (CAPUCO e ELLIS, 2013).

Assim como as outras fases da lactação o período seco também está sobre o controle endócrino. Experimentos *in vitro* demonstraram que a morte celular do epitélio mamário por

apoptose está relacionada com redução das concentrações de PRL, GH e IGF-I. ACCORSI et al. (2002) conduziram experimento para avaliar os efeitos da PRL, GH e IGF-I sobre a involução na glândula mamária de vacas. Estes autores demonstraram que a falta de PRL, GH ou IGF-I aumentou a apoptose celular. O GH estimula a síntese de IGF-I enquanto que a prolactina otimiza a sua ação através da supressão de IGFBP-5 (proteínas de ligação ao IGF-I) que tem função pró-apoptótica e de inibição sobre o IGF-I. Desta forma, assim como para os roedores, a redução das concentrações de prolactina pode ser considerada um dos principais sinais controladores da morte celular durante o período seco (ACCORSI et al., 2002). Além do controle hormonal, outro fator como uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais mamárias denominada FIL (Feedback inibidor da lactação) tem sido envolvido na redução da síntese do leite durante o período seco, após a cessação da ordenha (KNIGHT et al., 1998).

### 2.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Proliferação celular consiste na produção de duas células geneticamente iguais a partir de uma única célula, sendo que, para realização deste processo, geralmente, é necessário que ocorra crescimento seguido de divisão celular. Este processo ocorre em etapas bem definidas, intérfase e mitose (Fase M), que juntas formam o ciclo celular. A intérfase consiste no período em que a célula sintetiza novas proteínas e replica o seu DNA, enquanto que a mitose é a fase que ocorre a divisão celular propriamente dita. A proliferação celular pode ser estimulada em condições fisiológicas ou patológicas, tendo como exemplo, respectivamente, a proliferação das células endometriais sobre estímulo do estrogênio no ciclo menstrual e a morte celular após injúria dos tecidos. No entanto, a desregulação em qualquer fase do ciclo celular, como erros durante a transcrição e síntese do DNA, pode gerar produção demasiada e descontrolada de células, dando origem a tumores (OGINO et al., 2005).

Apesar de células em proliferação serem observadas na maioria dos tecidos, não se sabe se todas as células dos diferentes tecidos possuem a capacidade de se multiplicarem. A proliferação celular é, basicamente, controlada pelo ambiente e o estágio de diferenciação das células. Desta forma, em tecidos normais, a proliferação celular, geralmente, é restrita a células que tem capacidade de reconstituir o tecido, ou seja, a maioria dos tecidos possui células específicas com esta capacidade, que são denominadas células-tronco.

### 2.3.1 Célula-tronco

As células-tronco são células indiferenciadas e não especializadas, caracterizadas pelo seu potencial de auto-renovação e que podem se dividir de forma simétrica ou assimétrica. Quando a célula-tronco se divide simetricamente, ela dá origem a duas células-tronco filhas e expande a população de células-tronco, enquanto que a divisão assimétrica resulta em uma célula-tronco (auto-renovação) e outra célula progenitora, sendo esta última apresentando capacidade restrita de diferenciação (CAPUCO e ELLIS, 2013). As células progenitoras podem ou não serem submetidas a mais divisões. Caso isso ocorra, levaria as células à completa diferenciação, o que significa que estas agora apresentam função específica e já não podem mais sofrer divisão (SLACK, 2000). A maioria dos tecidos é composta por este tipo celular, assim a proliferação é normalmente, controlada de tal forma que apenas algumas células em particular no corpo estejam se dividindo.

### 2.3.2 Ciclo celular

A sequência de eventos que ocorre na presença de estímulos adequados resulta na multiplicação das células por meio de repetidos ciclos de divisão celular denominado ciclo celular (BERRIDGE, 2012). As células que são capazes de receber este estímulo e dar início ao ciclo celular são as células-tronco que na maioria das vezes, apresentam-se em repouso, ou seja, taxa zero de crescimento (G<sub>0</sub>). Após estímulo, dar-se início a intérfase, fase que interpõe a duas mitoses, a qual é responsável pela maior parte do tempo em cada ciclo celular, podendo levar horas ou até mesmo dias para se processar (EKHOLM et al., 2001). No entanto, a sua velocidade depende do tipo celular. A derme e mucosa intestinal, por exemplo, necessitam renovar-se constantemente e, por isso, sua intérfase tem duração menor se comparada à de outras células. Esta fase é subdividida em três outras, G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub> (OSHIMA e CAMPISI, 1991).

G<sub>1</sub> é a fase preparatória para o período de síntese de DNA (S), que tem como função promover o início do crescimento celular, resultante da maior síntese protéica e RNA. Ao final desta fase, ocorre o primeiro ponto de restrição (R) ou checagem do ciclo celular, que verifica se a célula tem capacidade de passar para fase S (replicação do DNA) da intérfase, ou seja, checa se o DNA não precisa de reparos, se o volume celular é suficiente e se o ambiente

é adequado para a divisão celular. Além disso, é a partir da passagem deste ponto que a divisão celular se torna irreversível (BERRIDGE, 2012).

Finalizado o ponto de restrição da fase G1 com sucesso, tem início o período de síntese do DNA (S), que resumidamente consiste na maior produção da enzima DNA polimerase e RNA, que resulta na duplicação do DNA. Nesta fase ocorre a separação das duas cadeias que constituem a dupla hélice, em que cada nucleotídeo serve de molde para a síntese de uma nova molécula de DNA devido à polimerização de desoxinucleotídeos sobre o molde da cadeia inicial, graças á atividade da DNA polimerase. Esta duplicação obedece ao pareamento de bases, em que a adenina (A) pareia com a timina (T) e a citosina (C) com a guanina (G), e como resultado observa-se a formação de uma molécula filha que é a replica da molécula original. A célula agora possui o dobro da quantidade de DNA (OSHIMA e CAMPISI, 1991).

O último período da intérfase é o G2, que apresenta função semelhante a da fase G1, porém em menor intensidade, além de ser nesta fase que ocorre o segundo ponto de restrição. Neste momento, a célula volta a certificar se o DNA foi corretamente duplicado e se há necessidade de maior tempo para o crescimento celular. Ao fim do período G2, a célula está em condições de iniciar a mitose (KUMAR et al., 1992).

O período mitótico caracteriza-se pela baixa atividade bioquímica, no qual a maior parte da atividade metabólica, e em especial a síntese de macromoléculas, esta deprimida. A fase M (mitose) é relativamente curta (aproximadamente 1 hora em um ciclo celular de 24 horas) e se encontra dividida em vários passos, que tem início com a prófase, seguido pela prometáfase, metáfase, anáfase e finalmente a telófase, culminando no processo de citocinese que consiste na divisão da célula em duas metades iguais (BERRIDGE, 2012). As fases da mitose apresentam-se resumidas na tabela abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Principais eventos que ocorrem durante as fases que representam a mitose celular

Fases da Mitose	Principais eventos
Prófase	Condensação cromossômica para formar cromátides-irmãs e formação do fuso mitótico e do cinetócoro
Prometáfase	Desestruturação do envoltório nuclear e ligação dos cromossomos ao fuso mitótico
Metáfase	Formação da placa equatorial ou metafásica (cromossomos dispostos pelo fuso no centro da célula)
Anáfase	Separação das cromátides-irmãs em pólos opostos
Telófase	Descondesação cromossômica, formação: nucléolo e envoltório nuclear e início e fim da divisão do citoplasma (citocinese)

### 2.3.2.1 Mecanismos de controle

Proliferação celular é um processo extremamente coordenado, em que a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada, de forma precisa, por uma rede bioquímica complexa, que sinaliza o andamento e as passagens por G1, S, G2 e M. O ciclo celular é regulado por mecanismos de controle que são divididos em duas partes. A primeira parte engloba a sinalização extracelular que pode ativar ou inibir o início do ciclo celular, enquanto que a segunda parte é caracterizada pela sinalização intracelular que regula a transição entre as diferentes fases do ciclo de forma coordenada.

### 2.3.2.2 Sinalização intracelular ou intrínseca

A via de sinalização intracelular tem início após a ocorrência do estímulo mitótico extracelular, que sinaliza a saída da célula da fase G1 e sua preparação para entrar na fase S. Ao final da fase G1, terminado o ponto definido como ponto de restrição, o sistema que regula a progressão do ciclo se torna independente da sinalização extracelular, passando a ser controlado positivamente por mecanismos intracelulares que envolvem a ativação sequencial de uma família de proteínas chamadas de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (PARDEE, 1974). A ativação desta enzima é dependente da sua associação a uma subunidade reguladora positiva pertencente à família das ciclinas, formando complexo catalítico ativo ciclina-CDK (SHERR e ROBERTS, 1999). As subunidades das CDKs estão presentes ao longo de todo o ciclo celular, enquanto que as das ciclinas são produzidas e degradadas em períodos específicos do ciclo, proporcionando regulação temporal do complexo ciclina-CDK. Os principais complexos ciclina-CDK, envolvidos no ciclo celular, estão listados na tabela 2.

**Tabela 2.** Principais complexos ciclina-CDK, envolvidos no ciclo celular

Nome do complexo ciclina-CDK	Nome do componente ciclina	Nome do componente CDK
G1-CDK	Ciclina D	CDK4, CDK6
G1/S-CDK	Ciclina E	CDK2
S-CDK	Ciclina A	CDK2
M-CDK	Ciclina B	CDK1

A passagem da célula do estágio inicial de G1 para o final exige a síntese de ciclina E. No entanto, a transcrição do gene da ciclina E, só é realizada na presença do fator de transcrição E2F, fator este codificado por um grupo de genes chamado de E2F e que também é responsável pela transcrição de outros genes importantes para a fase S, como por exemplo, o gene que codifica a ciclina A e a enzima DNA polimerase (DAHIYA et al., 2000). Em células que não estão se proliferando ou estão na fase G1 inicial, o fator de transcrição E2F está reprimido por uma proteína que se liga a ele, chamada de retinoblastoma (Rb). A Rb é uma proteína fosfo-nuclear, que desempenha papel chave na regulação do ciclo celular, encontrando-se ativa em seu estado hipofosforilado e inativa no hiperfosforilado. Próximo a metade da fase G1, ocorre a ativação do complexo G1-CDK, a partir de estímulos extracelulares, que fosforila a proteína Rb inativando-a, reduzindo sua afinidade pelo fator de transcrição E2F. Isto resulta em uma onda de liberação do fator de transcrição E2F, permitindo a transcrição do gene da ciclina E. A proteína ciclina E se liga à quinase CDK2 para formar o complexo G1/S-CDK que contribui para a fosforilação da Rb, mantendo sua inatividade durante a passagem de G1 para S. A autosuficiência do complexo G1/S-CDK em manter a Rb inativa, caracteriza a passagem pelo ponto de restrição, uma vez que a expressão de ciclina E é regulada positivamente pelo E2F, não dependendo da sinalização extracelular como a ciclina D (CONRADIE et al., 2010). Posteriormente, a ciclina E é degradada e substituídas pelas ciclinas A e B, que farão complexos com a CDK2 e 1, respectivamente, sendo estes responsáveis por manterem a fosforilação da Rb durante as fase S, G2, G2/M (FANG e NEWPORT, 1991).

Além da proteína Rb, inibindo as reações intracelulares do ciclo celular, existe um grupo de proteínas, as inibidoras das CDK (CDKI), que agem diretamente sobre os complexos ciclinas-CDK, bloqueando a sua atividade quinática, o que resulta na inibição da fosforilação da proteína Rb. Estas proteínas são responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular após a passagem pelo ponto de restrição (BERRIDGE, 2012). As CDKI são divididas em duas classes: específicas e não específicas. As CDKI específicas são formadas por um grupo de proteínas denominadas inibidoras de CDK4 (*Ink4-inhibitors of Cdk4*), representada pela proteína p15, p16, p18 e p19, que inibem especificamente os complexos de ciclina formados pelas CDK4 e 6 (VERNELL et al., 2003). Já a classe de CDKI não específica é chamada de Cip/kip, constituída pela p21, p27 e p57. Estas proteínas, dando destaque para a p21, tem

como efeito supressor sobre a inibição da atividade do complexo formado com a CDK 2 (LIU et al., 2003).

### 2.3.2.3 Sinalização extracelular ou extrínseca

A sinalização extracelular da proliferação é regulada por uma cascata de processos que envolvem grande número de moléculas e vias interligadas. O primeiro evento que inicia a proliferação celular ocorre com a ligação de moléculas específicas, como os fatores solúveis ou as proteínas da matriz extracelular que são designados como fatores de crescimento, a receptores específicos na membrana extracelular (NELSON e CHEN, 2002). Esta sinalização tem como principais funções, estimular a transcrição de genes que estão silenciosos nas células em repouso, os quais iram regular a entrada das células no ciclo celular.

São conhecidas aproximadamente 50 proteínas que atuam como fatores de crescimento, liberados por vários tipos celulares, de acordo com as necessidades do organismo. Desta forma, as células que possuem o receptor específico para um determinado fator de crescimento serão iniciadas no ciclo, enquanto as que não expressam este receptor em sua superfície permanecerão inativas. Os fatores de crescimento podem ser divididos em duas grandes classes: de ampla especificidade, que atuam sobre muitos receptores, e consequentemente, sobre muitas classes de células (ex: EGF – Fator de Crescimento Epidermal); e de estreita especificidade, que atuam sobre células específicas (OSHIMA e CAMPISI, 1991). Com base nas fontes de origem dos fatores de crescimento e a localização de seus receptores, estes podem ser classificados em três modelos de sinalização: autócrino (receptor e ligante são produzidos pela mesma célula), parácrino (ligante são produzido por células vizinhas das que expressão os receptores ou os ligantes ficam ancorados nas células que os produzem e sua ligação com receptor deve ser feito por meio da interação célula a célula) e endócrino (os receptores são expressos em células distantes do local de síntese dos ligantes) (LODISH et al., 1995).

Os receptores dos fatores de crescimento são muito complexos, formados por grandes proteínas que atravessam a membrana plasmática. Estes receptores apresentam domínio extracelular que reconhece os fatores de crescimento e porção citoplasmática que pode variar de acordo com sua atividade enzimática, como por exemplo, receptor de tirosina quinase e receptor serina/treonina quinase. O complexo ligante-receptor tem a capacidade de induzir a

transmissão de sinais citoplasmáticos por meio de ativação de quinase. O próximo passo consiste na transdução do sinal citoplasmático para o núcleo da célula, realizado por grupo heterogêneo de moléculas conhecidos como segundo mensageiros, que incluem várias proteínas forforiladas por quinase (Fosfato de inositol, AMP cíclico, e íons, incluindo  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{H}^+$  e  $\text{Zn}^{+2}$ ). Os segundos mensageiros transferem estas informações ao núcleo e modulam a transcrição de gene por meio da ativação de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição responsáveis pela regulação da proliferação celular são produtos de vários genes que podem estimular, tais como os genes c-Myc e c-JUN (OSHIMA e CAMPISI, 1991), ou inibir o ciclo celular, como o gene p53 (TAYLOR e STARK, 2001).

Desta forma, a ativação de genes que promovem estímulos positivos sobre a proliferação celular pode provocar aumento da expressão de genes promotores da ciclina D, resultando na sua produção, e posterior ativação do complexo G1-CDK, que induz o início da fase G1 da divisão celular. O complexo G1-CDK age sobre a proteína retinoblastoma removendo o efeito inibidor sobre E2F, ativando a formação da ciclina E e A, que são responsáveis por direcionar o ciclo celular dentro das células (FANG e NEWPORT, 1991).

No entanto, existem fatores de crescimento, como Fator Transformador do Crescimento –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que inibem o ciclo celular a partir da ativação do fator transcrição Smad, interferindo sobre a ativação das ciclinas. TGF- $\beta$  regula positivamente a proteína p15, por exemplo, representante das proteínas inibidoras de CDK, que por sua vez possui efeito supressor sobre o complexo ciclina-CDK.

Já a proteína p53 é um fator de transcrição essencial na inibição do ciclo celular, que é ativado por lesões no DNA, além de participar como ativador da apoptose (GUO e HAY, 1999). No ciclo celular, especificamente nos pontos de restrição das fases G1 e G2, esta proteína tem como função, manter a integridade do código genético ao verificar se as células possuem danos não reparados no seu DNA e repará-lo ou parar o ciclo celular nestas fases caso o dano não seja passível de reparos. Este sistema de reparo é formado por dois componentes: um sensor de danos no DNA, a proteína Hdm2, que tem como papel induzir a degradação da p53 e a própria proteína p53 (SHERR, 2000). Danos no DNA provocam a fosforilação da p53 e o bloqueio da proteína Hdm2. Isto induz o acúmulo e estabilização da p53, que poderá então se ligar aos promotores dos inibidores de CDK, p21, a proteína GADD45 e a proteína 14-3-3 e causar a transcrição destas proteínas, determinando com isto o seu acúmulo. Conseqüentemente, a p21 inativa o complexo G1/Cdk enquanto que as proteínas

GADD45 e 14-3-3 bloqueiam o complexo ciclinas B-CdK, resultando na parada do ciclo nas fases G1 e G2/M, respectivamente (TAYLOR e STARK, 2001).

### 2.3.3 Métodos de detecção da proliferação celular

Estudar a dinâmica celular é vital para a compreensão de uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos. Entre os métodos utilizados para a mensuração da atividade proliferativa merecem destaque a contagem de mitoses (ROMANSIK et al., 2007), a determinação da frequência de Regiões Organizadoras Nucleolares com afinidade pela prata (AgNOR) (KRAVIS et al., 1996), a contagem de células positivas para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (SIMÕES et al., 1994, ABADIE et al., 1999) e a contagem de células positivas para Ki-67 (ABADIE et al., 1999; SAKAI et al., 2002).

A proliferação celular por muitos anos foi mensurada por meio da contagem de figuras mitóticas, pela coloração de rotina hematoxilina e eosina, em cortes de tecidos. No entanto, em relação aos outros métodos, a contagem de figuras de mitose é menos eficiente por subestimar a proliferação celular, uma vez que este método avalia apenas as células na fase M da mitose, que corresponde à menor proporção do período do ciclo celular (PREZIOSI et al., 1995).

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são definidas como seções de cromossomos nos quais estão localizadas cópias organizadas de genes rRNA (DNA ribossômico ou rDNA), necessárias à produção final dos ribossomos (CROCKER, 1992). Os segmentos de rRNA estão associados a proteínas de grande importância para a transcrição do DNA e biogênese do RNA e com alta afinidade pela prata. Por esta razão estas proteínas e a coloração que permite sua visualização são denominada AgNORs ( PLOTON, 1994). Do ponto de vista técnico, quando comparado com as outras técnicas comumente usadas para avaliar a cinética celular, o método de corar as NORs pela prata apresenta como vantagens ser de fácil e rápida execução e baixo custo (DERENZINI e TRERÈ, 1994). O número e o tamanho dos AgNORs são correlacionados com o padrão de transcrição do rDNA, grau de células em proliferação, representadas pelas células na fase S e a fração de crescimento determinada pelo anticorpo monoclonal Ki67. Por isso, as AgNORs tem sido utilizadas largamente como marcador de proliferação celular, apresentando valor de diagnóstico e prognóstico principalmente na patologia tumoral (PLOTON, 1994).

A PCNA é uma proteína não-histona necessária à síntese e reparo de DNA, atuando na replicação celular ao auxiliar a enzima DNA polimerase. Esta proteína não pode ser detectada durante a fase G<sub>0</sub>, porém sua concentração aumenta rapidamente no meio da fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, permanece elevada por toda fase S, então rapidamente diminui de G<sub>2</sub>/M para G<sub>1</sub> (MADEWELL, 2001). Alguns aspectos biológicos podem complicar a interpretação da reação de PCNA, por exemplo, esta proteína pode ser induzida por dano ao DNA e, ainda, possui meia-vida longa, cerca de 20 horas, o que permite que células que já finalizaram o ciclo celular ainda apresentem o antígeno, fazendo com que as frações proliferativas sejam, muitas vezes, superestimadas (ABADIE et al., 1999; MADEWELL, 2001). Além disso, diferentemente do Ki-67, sua expressão varia muito ao longo das fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M, dificultando a interpretação dos resultados.

Atualmente, a marcação imunohistoquímica de Ki-67, antígeno possivelmente relacionado ao RNA nucleolar, é a ferramenta mais utilizada para avaliação da atividade proliferativa de uma população celular por associar características desejáveis para este tipo de marcador, como a expressão durante praticamente todo o ciclo celular, de início de G<sub>1</sub> a M, e por possuir meia-vida curta, sendo degradado em aproximadamente uma hora após a mitose. Sendo assim, mesmo marcações tênues podem ser consideradas positivas, dispensando os pontos de corte, geralmente utilizados para a avaliação do PCNA (MADEWELL, 2001; SCASE et al., 2006).

## 2.4 APOPTOSE CELULAR

Os primeiros estudos relacionados com morte celular por apoptose foram realizados através das pesquisas realizadas por KERR (1971), que induziu a atrofia no fígado de ratos pela ligação de vasos portais, o que levou a morte dos hepatócitos, caracterizada por alterações morfológicas peculiares. Posteriormente, KERR, WYLLIE e CURRIE em 1972 sugeriram a utilização do termo apoptose para indicar este tipo de morte celular, como um fenômeno morfológicamente distinto do já conhecido tipo de morte celular denominado necrose. Atualmente, apoptose que também é conhecida como morte celular programada, pode ser definida como tipo ativo de auto-destruição celular, geneticamente direcionada e que ocorre de forma ordenada, requerendo energia, síntese e degradação de proteína para sua execução (VASCONCELOS e VASCONCELOS, 1995)

O estudo da morte celular por apoptose foi ganhando expressivo interesse ao longo dos anos, devido a sua importância na manutenção da vida, uma vez que participa de diversos processos fisiológicos vitais e patológicos, como o desenvolvimento embrionário, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, hematopoiese normal e patológica e o controle da proliferação de tumores. No entanto, por ser indispensável à vida, a morte celular exige criterioso processo de regulação, pois qualquer alteração que provoque tanto o excesso quanto a sua deficiência, podem resultar em uma variedade de doenças, como doenças auto-imunes, doenças degenerativas, imunodeficiências e o câncer (MINNA et al., 2000).

#### 2.4.1 Morfologia da apoptose

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido, envolvendo células individuais ou pequenos grupos celulares, em que suas alterações morfológicas se processam entre duas a três horas. Durante o processo inicial de apoptose ocorre retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular de células vizinhas, como consequência, a célula fica menor em tamanho, o citoplasma denso e as organelas apresentam-se mais empacotadas (SEGRETO et al., 2002). Já no núcleo estas alterações se caracterizam pela formação do núcleo retraído e hipercondensado, com cromatina condensada nas porções adjacentes à membrana nuclear (picnose), sendo este o aspecto mais marcante da apoptose. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se desintegra em fragmentos envoltos por membrana nuclear (cariorrexe). Outro processo peculiar na morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, que apresenta padrão característico, em que endonucleases são ativadas, dando origem a fragmentos de DNA de tamanhos variáveis e sem uma sequência específica, mas sempre múltiplos de 180 a 200 pares de base (BORTNER et al., 1995). Simultaneamente, ocorre à formação de prolongamentos ou projeções digitiformes da membrana plasmática, que vão se tornando maiores e mais numerosos até se romperem, dando origem a fragmentos celulares denominados “corpos apoptóticos”, os quais possuem como constituintes o citoplasma, organelas hermeticamente empacotadas, com sua integridade preservada, podendo ou não conter partes do núcleo (ELMORE, 2007).

Os corpos apoptóticos são posteriormente fagocitados, sem a determinação de reação inflamatória, por macrófagos ou células do parênquima, em processo sinalizado pela

translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana, “marcando” as células que deverão ser fagocitadas (GRIMSLEY e RAVICHANDRAN, 2003).

A ausência da associação do processo de apoptose e remoção de corpos apoptóticos com a formação de reações inflamatórias se justifica pelo fato dos corpos apoptóticos não liberarem seus constituintes celulares em torno do tecido intersticial; serem rapidamente fagocitados, prevenindo a ocorrência de necrose secundária; além das células fagocitadas não produzirem citocinas antinflamatórias (KUROSAKA et al., 2003). Estas características, em particular, são importantes para diferenciar a morte celular por apoptose de outro tipo de morte celular denominada necrose. A necrose é um processo de morte celular passivo e que requer baixa quantidade de energia, que de modo geral ocorre quando há colapso da homeostasia celular, ou seja, sempre que a célula sofre variações extremas das suas condições fisiológicas, como hipotermia ou hipóxia (ZEISS, 2003).

#### 2.4.2 Mecanismos da apoptose

Os mecanismos da apoptose apresentam considerável complexidade, que estão relacionados a cascata de eventos dependente de energia. Diversos estímulos podem induzir a sinalização para apoptose, como ligação de moléculas à receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio. A apoptose pode ocorrer por duas diferentes vias principais, a extrínseca (iniciada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular - receptores da morte) ou a intrínseca ou mitocondrial (estimulada por lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas), que culminam na ativação de proteases denominadas caspases (OLIVER e VALLETTE, 2005). Contudo, segundo IGNEY e KRAMMER (2002), há indícios de que as duas vias podem se interligarem, uma vez que determinada molécula de uma via pode influenciar a outra. E finalmente, as vias extrínseca e intrínseca convergem para uma via comum denominada de via de execução.

#### 2.4.2.1 Caspases

As caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) pertencem à família das proteases de cisteínas, isto é, possuem uma cisteína no sítio ativo. Todas as caspases são sintetizadas como precursores inativos, na forma de zimogênio, que necessitam serem clivados após resíduos de ácido aspártico para adquirirem atividade proteolítica (LAUNAY et al., 2005).

Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomas ou ativadas no citosol pelo cálcio que possuem amplo espectro de substratos inespecíficos, as caspases tem substratos bem restritos, o que lhes asseguram seletividade e especificidade no processo de proteólise, característica importante na apoptose, uma vez que, envolve a clivagem de um grupo particular de proteínas de uma maneira ordenada, em vez de atividade proteolítica indiscriminada (GRÜTTER, 2000). Uma vez ativadas, as caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de múltiplos outros membros desta família, resultando em amplificação da cascata proteolítica, promovendo o aparecimento das alterações morfológicas, já descritas anteriormente, que caracterizam a apoptose. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo, ou seja, a ação destas caspases representa uma via comum que opera na maioria das células programadas para morrer (GRÜTTER, 2000, ZHAOYU e WAFIK, 2005).

Já foram identificadas em mamíferos 14 diferentes tipos de caspases, as quais podem ser subdivididas em três grupos funcionais (WOLF e GREEN, 1999). Caspases iniciadoras de apoptose (Caspase-2, -8, -9, -10) possuem pró-domínios longos, envolvidos na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras (-3, -6, -7) apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos e por fim um grupo de caspases constituídas por pró-domínios longos, envolvidas no processo inflamatório mediado por citocinas (Caspase-1, -4, -5, 11, e -12L/12S) e que até o momento ainda não foram identificadas nenhuma função dentro do processo de apoptose (ZHAOYU e WAFIK, 2005).

#### 2.4.2.2 Via intrínseca

A sinalização da via intrínseca para dar início a apoptose envolve grande variedade de estímulos não mediados por receptores e que produzem sinais que atuam diretamente em

alvos intracelulares, tendo a mitocôndria como principal organela iniciadora do processo (ELMORE, 2007). Diversas proteínas apoptóticas estão compartimentalizadas dentro da mitocôndria funcional. Desta forma, após a ocorrência de um estímulo positivo para apoptose, a membrana mitocondrial sofrerá alterações na sua permeabilidade que resultará na liberação destas proteínas para o meio citoplasmático (DE VOS et al., 1998; FERREIRA et al., 2010). Dentre estas proteínas pró-apoptóticas podemos destacar dois principais grupos, o primeiro grupo consiste de citocromo c, Smac/DIABLO, e HtrA2/Omi (DU et al., 2000), enquanto que o segundo é composto pelas proteínas inibidoras de apoptose (IAP – Inhibidor of Apoptosis Proteins) (SCHIMMER, 2004).

A proteína citocromo c esta localizada no espaço intermembranas da mitocôndria e após sua liberação para o citosol, interagem com o fator de ativação da protease apoptótica - I (Apaf-I - apoptotic protease-activating factor-I), ATP/dATP, procaspase-9 para formar o apoptossomo. Apaf-1 é constituída de um domínio denominado CARD que tem como função mediar sua interação com a procaspase-9. Na presença da citocromo c e ATP/dATP, a Apaf-1 sofre mudança conformacional que proporciona sua agregação e exposição do domínio CARD, induzindo, desta forma, o recrutamento da procaspase-9 e sua subsequente ativação (MINNA et al., 2000). Quando ativadas no apoptossomo, a caspase-9, irá ativar as caspases efetoras -3 e -7, que então desencadeiam a degradação celular. Smac/DIABLO e Omi (segundo ativador mitocondrial) também são liberadas a partir da mitocôndria para o citoplasma em resposta a estímulos apoptóticos (DU et al., 2000). Estas proteínas pró-apoptóticas interagem com um domínio específico (BIR) das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), removendo o seu efeito inibidor sobre a atividade das caspases (SRINIVASULA et al., 2001).

O segundo grupo de proteína mitocondrial que esta envolvido na apoptose é formado pelo fator de indução da apoptose (AIF) (SUSIN et al., 1996). AIF é uma flavoproteína mitocondrial que se desloca para o núcleo a partir de estímulos apoptóticos (LORENZO et al., 1999). No núcleo, AIF induz a fragmentação parcial do DNA e a condensação da cromatina. Esta proteína promover apoptose independente de caspases, embora, provavelmente, aja de forma cooperativa com outros fatores, como CAD (DNase ativada por caspases) e endonuclease G, para promover completa fragmentação nuclear.

Os mecanismos que controlam a liberação das proteínas mitocondriais para o citosol ainda não foram completamente elucidados. Um mecanismo proposto é a formação de poros

na membrana mitocondrial, resultando no aumento de sua permeabilidade, perda transitória do potencial de membrana mitocondrial e influxo de líquido para dentro da mitocôndria. A associação destes eventos culminaria na ruptura da membrana externa da mitocôndria e liberação das proteínas pró-apoptóticas (ASHER e BERRY, 2003). Uma segunda hipótese destaca que o controle da sequência de eventos apoptóticos nas mitocôndrias ocorreria por intermédio de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2 (SUN et al., 2002). Estas proteínas podem ser divididas em três grupos, Bcl2 (Bcl2, Bcl-XL, Mcl-1); “BH3-only” (Bim, Bik, Bad, Puma, Bid, Noxa) e Bax (Bax, Bak, Bok), sendo que o primeiro grupo possui ação anti-apoptótica e os demais pró-apoptóticas. O balanço entre proteínas membros da família pró e anti-apoptóticas é que determinará qual célula sofrerá ou não apoptose. Em células saudáveis, as proteínas dos grupos pró-apoptótico estão reprimidas pela interação com as proteínas Bcl2 e Bcl-XL que possuem ação anti-apoptóticas. Porém, em presença de um sinal indutor de apoptose, ocorre aumento da concentração das proteínas do grupo “BH3-only”, principalmente a Bad, fazendo com que as proteínas Bcl2 e Bcl-XL liberem as proteínas pró-apoptóticas (Bax) e se liguem as proteínas deste grupo. Desta forma, as proteínas do grupo Bax são liberadas para interagirem com a membrana externa da mitocôndria, comprometendo sua integridade, ao provocar a formação de poros para a passagem das proteínas indutoras de apoptose (BRÖKER et al., 2005).

#### 2.4.1.3 Via extrínseca

A via extrínseca sinaliza o início da apoptose envolvendo interações mediadas por receptores localizados na membrana citoplasmática, denominados receptores da morte, nos quais a maioria é membro da superfamília de receptores para fator de necrose tumoral (Ligante/Receptor: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5) (ZHAOYU e WAFIK, 2005). Estes receptores são caracterizados por apresentarem porção extracelular rica em cisteína que permite o reconhecimento de seus ligantes específicos e uma região citoplasmática com 80 resíduos de aminoácidos, chamada “domínio da morte”, essencial para a tradução intracelular do sinal de morte celular (ASHKENAZI e DIXIT, 1998). A sequência de eventos que definem a fase extrínseca da apoptose foi melhor estudada e definida nos receptores FasL/FasR e TNF- $\alpha$ /TNFR1.

A ativação do receptor Fas, por exemplo, ocorre com a interação do ligante específico (FasL) ao domínio extracelular rico em cisteína (CRD), resultando na trimerização dos mesmos (SIEGEL et al., 2000). Esta ativação possibilita a ligação de proteínas adaptadoras do sinal de transdução (FADD – Fas-associated death domain protein), presentes no citoplasma, ao domínio da morte. A FADD por sua vez recruta a procaspase-8 ou -10, por meio da dimerização de domínios efetores da morte homólogos entre essas proteínas (KISCHKEL et al., 1995). Neste ponto, há a formação do complexo de sinalização da indução da morte (DISC), que resulta na ativação auto-catalítica da procaspase-8 ou -10 (MUZIO et al., 1998).

Apesar da formação do DISC ser um ponto comum, dois tipos de células que usam diferentes vias de sinalização da Fas foram identificados (SCAFFID et al., 1998). As células do tipo I requerem o recrutamento e ativação da caspase-8, que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose, cuja principal função é a clivagem de diversas proteínas essenciais a sobrevivência das células. Nas células do tipo II, limitada ativação da caspase-8, resulta em um circuito de amplificação mediada pela ativação mitocondrial, ou seja, a via extrínseca contribui para ativação da via intrínseca da morte celular (SCAFFID et al., 1999). Isto ocorre via clivagem da Bid, proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, que induz a liberação do citocromo c, devido ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial.

#### 2.4.1.4 Via de execução

A via de execução é considerada o ponto final da apoptose. Esta via é iniciada com a ativação das caspases efetoras (-3, -6, -7), e resulta na ativação de endonucleases e proteases citoplasmáticas, que fragmentam o DNA e degradam as proteínas nucleares e o citoesqueleto, respectivamente, sendo responsáveis pelas mudanças bioquímicas e morfológicas encontradas nas células em apoptose (SLEE et al., 2001).

#### 2.4.3 Métodos de detecção da apoptose celular

Uma variedade de métodos está disponível para detectar células em apoptose, mas cada método apresenta algumas limitações que pode torná-lo aceitável ou não de acordo com o objetivo que se deseja. Um método, por exemplo, pode detectar eventos que ocorrem no início da apoptose enquanto outros tem como alvo eventos mais tardios. Muitas características

da apoptose e necrose podem se sobrepor, além disso, a eliminação rápida de células apoptóticas em estádios tardios nos tecidos torna difícil estimar com segurança o número de células que estão morrendo (ELMORE, 2007). Com base na metodologia, a detecção da apoptose pode ser classificada em cinco grupos principais, que são eles: os métodos que avaliam alterações citomorfológicas; fragmentação do DNA; detecção de caspases, substratos clivados, reguladores e inibidores; alterações na membrana e por fim função mitocondrial.

As alterações citomorfológicas podem ser identificadas por microscopia eletrônica (ME), considerado o melhor método para confirmação da morte celular por apoptose. Isto por que na ME as características morfológicas ultraestruturais são irrefutáveis e podem ser identificadas nas fases mais tardias da apoptose, inclusive durante a fagocitose dos corpos apoptóticos. As principais desvantagens são o elevado custo, demora em sua realização e dificuldade na detecção de células na fase inicial da apoptose, o que dificulta a sua utilização para quantificar estas células.

A fragmentação do DNA por endonucleases, por exemplo, é classicamente demonstrada por eletroforese como uma graduação típica de DNA, em forma de degrau de escada pela degradação do DNA em fragmentos de 180 a 200 pb (KOOPMAN et al., 1994). Este método é de fácil execução, baixo custo, alta sensibilidade e mais indicado para tecidos e cultura de células com elevado número de células em apoptose. A principal falha deste método é que não permitem distinguir entre a célula necrótica e a apoptótica e células em fase inicial da apoptose (MCCARTHY e EVAN, 1998). A técnica de TUNEL conta com o uso de uma enzima exógena, a transferase terminal de deoxinucleotídeo (TdT) que incorpora um nucleotídeo marcado (UTP) na extremidade 3'OH do genoma em fragmentação. O dUTP pode então ser marcado com uma variedade de métodos que permite a detecção por citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e de luz. A reação de TUNEL identifica células apoptóticas, incluindo aquelas com início de marginação de cromatina nuclear. Contudo, existem limitações a esta técnica, como o seu alto custo, ocorrência de falso positivo para células necróticas e em processo de reparação do DNA e transcrição de genes.

Existem pelo menos 14 caspases conhecidas que podem ser detectadas usando diversos tipos de ensaio para avaliar sua atividade (GURTU et al., 1997). As principais formas de detecção da atividade das caspases incluem Western blot, imunoprecipitação e imunohistoquímica. Este método tem como limitação o fato da ativação das caspases não necessariamente indica que a apoptose ocorrerá. Além da atividade das caspases, a apoptose

celular também pode ser avaliada por meio de outras moléculas como substrato clivados, reguladores e inibidores por uma metodologia que utiliza PCR em tempo real para identificar o perfil da expressão gênica de pelo menos 112 genes envolvidos na apoptose (VALLAT et al., 2003).

Alterações na membrana citoplasmática durante o processo de apoptose, como a exteriorização de resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática externa, possibilitam a marcação de células em apoptose através da anexina V. A anexina V é uma proteína que possui alta afinidade pela fosfatidilserina que quando conjugada com o isotiocianato de fluoresceína, possibilita a identificação e quantificação de células apoptóticas por citometria de fluxo. A desvantagem desta técnica é que as células em necrose também podem ser marcadas.

Avaliação da função mitocondrial permite a detecção de alterações na fase precoce da via intrínseca da apoptose. Uma das técnicas utilizada para esta avaliação é o escaneamento a laser em microscopia confocal que cria uma fina fatia submicrônica óptica através da célula viva que pode ser utilizada para monitorar vários acontecimentos mitocondriais ao longo do tempo, como fluxo de  $Ca^{+2}$ , despolarização da membrana mitocondrial interna, espécie reativa de oxigênio, entre outras (BEDNER et al., 1999).

## 2.5 ADAPTAÇÕES DA GLÂNDULA MAMÁRIA AO NÚMERO DE ORDENHAS

Em animais lactantes a remoção contínua do leite é fundamental para a manutenção da produção. Em bovinos, a demanda nutricional do bezerro apresenta grande participação na modulação da capacidade produtiva da glândula mamária, uma vez que a secreção de leite diminui com a redução do estímulo da amamentação e aumenta com a maior frequência ou intensidade da amamentação (WALL E MCFADDEN, 2012). Portanto, o aumento da frequência de ordenha ou amamentação é uma grande oportunidade para a manipulação da produção de leite.

As mudanças na frequência de ordenha ao longo de toda lactação e seus efeitos sobre produção de leite foram intensamente estudados durante os anos 80 e 90, com o intuito de aumentar a eficiência da produção de leite. As respostas ao maior número de ordenhas apresentam considerável variação, sendo relatados aumentos de 20-30%, 15-20% e somente 7% na produção de leite com a mudança de uma para duas, de duas para três e de três para

quatro ordenhas diárias, respectivamente (STELWAGEN et al., 2001). Esta prática de manejo pode ser utilizada desde que os custos associados com as ordenhas extras sejam compensados pela produção de leite adicional.

O período da lactação em que o manejo de ordenhas frequentes é aplicado tem influencia direta na resposta sobre a produção de leite. Durante o meio e final da lactação, ordenhas frequentes resultaram em aumento da produção de leite, no entanto, a cessação desta prática reduz imediatamente a produção de leite a valores pré-tratamento (MORAG, 1973; SVENNERSTEN et al., 1990). Estudos nos últimos 20 anos tem avaliado as consequências do aumento da frequência de ordenha apenas no início da lactação, com o objetivo de identificar um período durante esta fase em que a glândula mamária seja responsiva a este estímulo. Os resultados destes estudos demonstram que ordenhar vacas com mais frequência durante o início da lactação esta associada com resposta aguda e persistente no aumento da produção de leite (SOBERÓN et al., 2011; WALL e MCFADDEN, 2007; HALE et al., 2003; BAR-PELED et al., 1995; Tabela 3). Embora, efeito agudo e persistente sobre a produção de leite tem sido frequentemente observado em resposta ao aumento da frequência de ordenha (AFO), os mecanismos relacionados com estes efeitos ainda não foram completamente estabelecidos.

Por muito tempo acreditou-se que os hormônios liberados durante a ordenha, como glicocorticóides, ocitocina e prolactina poderiam estar envolvidos na regulação dos efeitos galactopoéticos de ordenha frequente sobre a produção de leite (AKERS e LEFCOURT, 1982). Dentre estes hormônios a prolactina apresenta posição de destaque por ser o hormônio que desempenha importante papel na manutenção da lactação. BAR-PELED et al. (1995) observaram aumento na produção de leite e nas concentrações de ocitocina e prolactina na circulação de vacas ordenhadas e/ou amamentadas mais frequentemente durante o início da lactação. Já HALE et al. (2003) e WALL et al. (2006) não observaram efeito da frequência de ordenha sobre a concentração basal de prolactina. O aumento da frequência de ordenha não estaria associado apenas ao aumento na concentração de prolactina, mas também com a maior expressão de seus receptores, o que sugere que vacas ordenhadas mais frequentemente seriam mais sensíveis a prolactina (BERNIER-DODIER et al., 2010). De acordo com WALL et al. (2006) e CRAWFORD et al. (2004) o AFO e a suplementação exógena de prolactina promovem maior produção de leite. No entanto, estes dois procedimentos apresentaram efeitos diferentes sobre a proliferação celular mamária e, portanto, provavelmente a maior produção de leite seria explicada por mecanismos distintos. Enquanto que para outros autores

mudanças na frequência de ordenha estariam relacionadas a alterações na atividade das células epiteliais mamárias (BOUTINAUD et al., 2012; BEN CHEDLY et al., 2011).

**Tabela 3.** Resultados de trabalhos publicados sobre os efeitos do aumento da frequência de ordenhas (AFO) no início da lactação sobre produção e composição do leite em vacas da raça Holandesa e mestiças

Referência	Esquema de ordenha <sup>1</sup>	Duração do AFO <sup>2</sup>	DEL <sup>3</sup>	Produção de leite (kg/d) <sup>4</sup>
BAR-PELED et al., 1995	6X-3X	42 d	1-42 d	7,3
			43-126 d	5,1
SANDER et al., 2000	6X-3X	42 d	1-42 d	6,0
			43-266 d	3,7
HALE et al., 2003	4X-2X	21 d	1-21 d	6,8
			22- 70d	4,6
			22-308 d	2,8
FERNANDEZ, 2004	4X-2X	21 d	~15 d	3,0
			~45d	3,5
			1-270 d	1,6 <sup>6</sup>
DAHL et al., 2004	6X-3X	21 d	1-21 d	8,0
			22-305 d	5,0
VANBAALE et al., 2005	6X-3X	14 d	1-63 d	-1,7 <sup>6</sup>
			64-308 d	-0,8 <sup>6</sup>
			1-63 d	0,2 <sup>6</sup>
			64-308 d	-0,2 <sup>6</sup>
			21 d	-2,3 <sup>6</sup>
WALL e MCFADDEN, 2007	4X-2X FO unilateral	21 d	1-21 d	3,5 <sup>5</sup>
			22- 305 d	1,8 <sup>5</sup>
SOBERÓN et al., 2010	4X-2X	21 d	1-21 d	4,3
			1-119 d	1,4 <sup>6</sup>
LIMA et al., 2011	4X-2X	21d	1-21 d	4,0
			1-119 d	1,5
WALL e MCFADDEN, 2013	4X-2X FO unilateral	21 d	1-21 d	5,1
			22- 180 d	2,7
MURNEY et al., 2014	4X-1X FO unilateral	14 d	5-19 d	6,1
			55-200 d	1,1

<sup>1</sup>Número de ordenha aplicada ao grupo tratado durante o período de aumento da frequência de ordenha, número de ordenha aplicada ao grupo controle durante todo experimento e ao grupo tratado após a conclusão do AFO.

<sup>2</sup>Tempo em que se aplicou o AFO.

<sup>3</sup>DEL = Dias em lactação.

<sup>4</sup>Diferença média de produção de leite em kg/d entre vacas tratadas e controle.

<sup>5</sup>Representa resposta em metade do úbere.

<sup>6</sup>Diferença não significativa ( $P > 0,05$ ).

FO = Frequência de ordenha.

Apesar da frequência de ordenha apresentar efeito sobre a resposta endócrina, estudos com a utilização da metodologia de ordenhas unilaterais que consiste na aplicação do AFO em apenas metade do úbere, enquanto a metade contralateral passa a corresponder ao controle experimental tem demonstrado que os mecanismos que controlam o aumento da produção de leite e seus efeitos residuais são regulados localmente por fatores restritos à glândula mamária (WRIGHT et al., 2013; WALL e MCFADDEN, 2010; WALL e MCFADDEN, 2007). Isto porque a utilização de ordenhas unilaterais elimina a variação entre os animais devido ao meio ambiente, nutrição e genética, além das duas metades do úbere estarem expostas aos mesmos fatores sistêmicos, portanto, qualquer diferença de tratamento deve ser exclusivamente devido a fatores locais (WALL e MCFADDEN, 2008).

## 2.5.1 REGULAÇÃO LOCAL DA PRODUÇÃO DE LEITE

### 2.5.1.1 Fatores inibidores da lactação (FIL)

No início dos anos 80, LINZELL e PEAKER (1971) citados por STELWAGEN (2001) hipotetizaram que a produção de leite poderia ser regulada por um inibidor químico presente no leite que posteriormente, passou a ser denominado por WILDE et al. (1995) de fator inibidor da lactação (FIL). Desde então, muitos experimentos foram conduzidos com o objetivo de comprovar esta hipótese e desvendar o mecanismo de ação desta proteína (WILDE et al., 1987; WILDE et al., 1996). O efeito do FIL sobre a secreção do leite foi testado primeiramente *in vitro* por WILDE et al. (1987), utilizando cultura de células mamárias de coelhas. A secreção de leite foi inibida de forma rápida e reversível por uma fração de proteínas do soro entre 10 e 30 Kilodalton (KDa). Posteriormente, frações destas proteínas foram injetadas em uma única glândula mamária de coelhas e constatou-se que esta mesma fração de proteínas inibiu a síntese de leite também quanto *in vivo*.

Em estudo subsequente com cabras (WILDE et al., 1995), onde a fração de proteínas de 10 a 30 KDa após purificação foi infundida via intramamária em apenas uma glândula mamária, observou-se que o FIL inibiu a secreção de leite em relação a glândula controle contralateral. Após imunoneutralização do FIL endógeno, os resultados demonstraram efeitos estimulatórios sobre a produção de leite (WILDE et al., 1996). Uma das formas de ação proposta para o FIL é de que ao se acumular no leite presente no lúmen alveolar atinja uma

concentração crítica, onde passará a agir como feedback negativo, inibindo assim a produção de leite. Outro potencial modo de ação seria a sua produção na forma inativa e subsequente ativação dentro do lúmen alveolar. Após a ligação do FIL aos seus receptores presentes na superfície das células alveolares ocorreria a redução da taxa de secreção de proteínas pela inibição do tráfego de vesículas por meio do aparelho de Golgi (RENNISON et al., 1993).

KNIGHT et al. (1998) propuseram que o FIL participaria da adaptação da glândula mamária ao aumento ou diminuição da frequência de ordenha como um mecanismo agudo de regulação, tendo como ação primária a regulação intracelular do tráfego de proteínas. O efeito imediato sobre a secreção do leite é considerado como efeito direto, e os efeitos subsequentes sobre a atividade celular e número de células são consequência indireta mediada por meio das alterações na sensibilidade de hormônios como a prolactina e provavelmente IGF-1. No entanto, pesquisas com esta proteína não tiveram avanço desde os anos 90 e sua identificação e função na glândula mamária ainda não foram comprovados.

Embora a concepção de que o FIL seja responsável pela redução da secreção de leite possa explicar a maior produção durante o aumento da frequência de ordenha, BAR PELED et al. (1995) e HALE et al. (2003) contestaram esta concepção, baseados no fato desta fração de proteínas não explicar a manutenção de produções elevadas de leite, mesmo após cessado o tratamento do aumento na frequência de ordenha durante o início da lactação.

#### 2.5.1.2 Captação de nutrientes, pressão e fluxo sanguíneo intramamário

Extenso sistema vascular fornece a glândula mamária os nutrientes necessários para a síntese do leite. O fluxo sanguíneo dos capilares que envolvem os alvéolos e a troca de nutrientes entre estes são responsáveis pela captação de nutrientes, e subsequente, síntese de leite pela glândula mamária (POSSER et al., 1996). Em vacas multíparas ordenhadas com intervalos de oito, 12, 16 e 24 h em um período de sete dias foi observada redução de 6,1 kg/d na produção de leite entre oito e 24h de intervalo de ordenhas. A diminuição do fluxo sanguíneo de 1,23 para 0,89 L/min resultou na redução na captação em 26% para glicose, 32% para aminoácidos, 20% para acetato, 30% para  $\beta$ -hidroxibutirato (BHBO) e 25% para glicerol total (DELAMAIRE e GUINARD-FLAMENT, 2006). Menor captação de nutrientes e fluxo sanguíneo mamário também foram observados por GUINARD-FLAMENT et al. (2011) em resposta ao aumento do intervalo entre ordenhas. Logo, a redução da produção de

leite observada seguida de aumento do intervalo de ordenhas parece estar mais estreitamente associada com a redução na captação de nutrientes pela glândula mamária em resposta ao menor fluxo sanguíneo do que com uma menor eficiência da mesma em converter estes nutrientes em componentes do leite.

GUINARD-FLAMENT e RULQUIN (2001) observaram declínio de 28% na produção de leite e 10% no fluxo sanguíneo mamário de vacas ordenhadas uma vez ao dia durante sete dias. Já em cabras, um alongamento do intervalo entre ordenhas de 26 para 36 h causou redução de 50% do fluxo sanguíneo mamário (STELWAGEN et al., 1994; FARR et al., 2000). Por outro lado, os efeitos das mudanças do número de ordenha para mais de duas vezes ao dia sobre o fluxo sanguíneo mamário são menos claros. Em cabras ordenhadas cinco vezes em 12 h, a secreção de leite e o fluxo sanguíneo mamário aumentaram 24% e 44%, respectivamente (PROSSER e DAVIS, 1992). No entanto, em cabras ordenhadas a cada hora, durante oito horas, a secreção de leite aumentou 15%, mas não houve mudanças no fluxo sanguíneo mamário (MALTZ et al., 1984).

GUINARD-FLAMENT et al. (2011) sugeriram que a redução do fluxo sanguíneo mamário em resposta ao maior intervalo de ordenha ocorreria por redução da atividade metabólica das células epiteliais mamárias ou por compressão dos vasos sanguíneos devido ao acúmulo do leite nos alvéolos ou ambos. No entanto, a hipótese relacionada à atividade metabólica é mais aceita uma vez que o fluxo sanguíneo não retorna a valores iniciais imediatamente após o esvaziamento do úbere.

Segundo PEARL et al. (1973) a infusão de ar ou leite na glândula mamária está associada com aumento da pressão intramamária e diminuição do fluxo sanguíneo mamário. O aumento da pressão intramamária, contudo, nem sempre resulta em redução da produção de leite (HENDERSON e PEAKER, 1984). Por tanto, a relação entre a remoção do leite, pressão intramamária e fluxo sanguíneo permanece incompreendida, mas é possível que a pressão intramamária possa ser um dos mediadores locais da função mamária.

### 2.5.1.3 Resposta celular

Diversos autores sugeriram que a frequência de ordenha aumenta a produção de leite via maior número de células e/ou atividade celular, ambos processos indispensáveis para a função da glândula mamária (BAR-PELED et al., 1995; STELWAGEN e KNIGHT, 1997;

SANDERS et al., 2000 e HALE et al., 2003). Em cabras o aumento na produção de leite durante as primeiras duas semanas após implantada três ordenhas diárias, pode ser acompanhado por elevação na atividade enzimática por unidade celular da acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase e da galactosiltransferase que estão relacionadas com a síntese da gordura e lactose do leite (WILDE et al., 1987). Resultados semelhantes também foram obtidos por WILDE e KNIGHT (1990) e HILLERTON et al. (1990) ao aumentarem a frequência de ordenha de duas para três ordenhas em cabras e de duas para quatro ordenhas em vacas, respectivamente.

Na maioria destes experimentos, a atividade das células mamárias foi mensurada após semanas, período de tratamento considerado relativamente curto. No entanto, evidências em cabras sugerem que, em longo prazo (ou seja, meses), o aumento da atividade celular não é mantido com a utilização de três ordenhas diárias, apesar de persistente maior produção de leite (WILDE e HENDERSON, 1985). Consistente com estes achados, o mesmo grupo relata que em longo prazo (isto é, nove meses), três ordenhas diárias resultaram em maior parênquima mamário (HENDERSON et al., 1985), sugerindo aumento no número de células mamárias. Embora não se possa excluir que o aumento do parênquima possa ser devido à hipertrofia e não um resultado de hiperplasia, o mesmo grupo relatou em estudo posterior que, após semanas, as glândulas ordenhadas três vezes ao dia continham mais células secretoras que as glândulas ordenhadas duas vezes ao dia (WILDE et al., 1987). Resultados comparáveis foram obtidos em vacas ordenhadas quatro vezes ao dia em que estas exibiram alta taxa de síntese de DNA associada com aumento do número de células mamárias (HILLERTON et al., 1990). Coletivamente, estes dados sugerem que os efeitos em curto prazo (ou seja, semanas) na secreção de leite em resposta a mudança na frequência de ordenha, são mediados pela regulação da atividade celular, enquanto os efeitos em longo prazo (ou seja, meses) são provavelmente mais relacionados às mudanças no número celular (STELWAGEN, 2001).

HALE et al. (2003) analisaram a dinâmica da renovação celular, em vacas ordenhadas quatro vezes ao dia (4X) no início da lactação, seguidas do retorno a duas ordenhas diárias (2X) no restante da lactação comparada com vacas ordenhadas duas vezes ao dia durante toda lactação. Estes autores relataram efeito positivo com aumento da frequência de ordenha sobre a persistência da lactação e proliferação celular no tecido mamário coletado apenas no sétimo dia da lactação. Contudo, esta resposta celular não foi observada para todos os grupos de vacas ordenhadas quatro vezes ao dia. Em experimento similar, foi observado aumento da

proliferação das células do estroma celular no quinto dia da lactação em vacas ordenhadas 4X comparadas com vacas ordenhas 2X, mas o total de células em proliferação (epitélio e estroma) não foi afetado (WALL et al., 2006).

NØRGAARD et al. (2005) e SOBERÓN et al. (2010) ao compararem, respectivamente, vacas ordenhadas três vezes ao dia durante as oito primeiras semanas da lactação e 4X ao dia durante as três primeiras semanas da lactação com vacas ordenhas 2X, não observaram efeito do número de ordenha sobre a produção de leite ao longo de toda lactação, além da ausência de mudanças sobre a renovação celular e atividade enzimática mamária. Enquanto que WALL e MCFADDEN, (2010) e WALL et al. (2013) mesmo demonstrando efeito positivo do AFO no início da lactação sobre a persistência da lactação, a taxa de proliferação e apoptose não foram afetadas por este manejo de ordenhas.

Em estudo realizado com vacas a pasto e com baixa produção de leite, MURNEY et al. (2014) relataram aumento de 32% na proliferação celular mamária para vacas ordenhadas quatro vezes ao dia do quinto ao 19° dia da lactação em relação ao grupo controle (vacas ordenhadas uma vez ao dia), enquanto que nenhuma diferença na expressão de genes relacionados com a apoptose celular foi detectada. Também foi observado por este grupo de pesquisadores maior atividade celular mamária avaliada por meio da abundância de RNAm de genes relacionados a proteína do leite ( $\alpha_{S1}$ - caseína,  $\beta$ -caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoalbumina) em vacas ordenhadas quatro vezes ao dia em relação ao grupo controle.

Estes resultados demonstraram que mudanças na frequência de ordenhas durante o início da lactação podem afetar a proliferação e a atividade celular mamária, o que contribuiria para explicar as mudanças na produção de leite durante e após o AFO. No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas uma vez que esta resposta não se apresenta de forma consistente entre os diferentes estudos realizados.

#### 2.5.1.4 Efeito da frequência de ordenha sobre a expressão gênica

Na tentativa de obter informações sobre os mecanismos potencialmente envolvidos na resposta da produção de leite para o aumento da frequência de ordenha, estudos foram realizados para comparar a expressão gênica entre 4X e 2X. Um dos primeiros estudos que avaliaram as mudanças fisiológicas que ocorrem na glândula mamária durante ordenhas mais frequentes (4X vs. 2X) pela identificação de mudanças na expressão gênica, observou que os

efeitos do AFO sobre a produção de leite tem caráter multifatorial. Isto por que o AFO alterou a expressão de diversos genes relacionados principalmente com o aumento da remodelagem da matriz extracelular, metabolismo, proliferação e apoptose celular, transportes de nutrientes, função imune e neovascularização (CONNOR et al., 2008).

Posteriormente, outros estudos surgiram com o objetivo de avaliar diferenças na expressão gênica em relação à resposta aguda (imediate) e persistente (em longo prazo) da frequência de ordenha sobre a produção de leite. WALL e MCFADDEN (2010) e WALL et al. (2012) utilizaram 4X e 2X em metades diferentes do úbere até 21 dias da lactação. As biopsias foram obtidas no quinto dia da lactação imediatamente após a ordenha da metade do úbere 4X (resposta aguda) ou 2,5 h após a ordenha das duas metades do úbere (resposta persistente). A expressão de alguns genes envolvidos no eixo IGF-I, foram regulados tanto pela remoção do leite imediata quanto pela resposta ao AFO em longo prazo (WALL e MCFADDEN, 2010). Enquanto que WALL et al. (2012) observaram que a expressão de 855 genes foram regulados de forma aguda pela remoção do leite, mas nenhum gene foi associado com a manutenção do efeito da frequência de ordenha, ou seja, efeito a longo prazo, uma vez que não houve diferença na expressão gênica das biopsias realizadas 2,5 h após a ordenha entre os grupos 2X e 4X. Estes resultados em conjunto sugerem que o efeito agudo e em longo prazo possam ser regulados pelo mesmo grupo de genes.

Este mesmo grupo de pesquisa avaliou a expressão gênica de biopsias obtidas nos dias 21, 23 e 40 da lactação, 2,5 h depois da ordenha em vacas submetidas ao mesmo manejo de ordenha descrito anteriormente. Os resultados deste estudo demonstraram diferença na expressão de 75 genes entre 4X e 2X ao longo dos tempos avaliados (WALL et al., 2013). Muitos destes genes foram os mesmos previamente identificados por CONNOR et al. (2008). Baseados nestas observações WALL e MCFADDEN (2012) desenvolveram uma possível hipótese para explicar a maior produção de leite mesmo após redução do aumento da frequência de ordenha. Segundo estes autores a maior utilização da glândula mamária durante o início da lactação, período em que esta é capaz de responder a demanda da produção de leite, resultaria em "*imprinting lactacional*", ou seja, padrão de ativação gênica que persiste mesmo após o término AFO. Efeito semelhante ao observado no músculo esquelético em resposta a alta demanda fisiológica (exercício), onde este passa por processo de mudanças coordenadas a nível de transcrição gênica que coincide com melhor função muscular (WALL e MCFADDEN, 2012).

## 2.6 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A REALIZAÇÃO DE BIOPSIA

Durante muito tempo, o estudo da morfologia e função da glândula mamária em animais de produção de leite se restringiu a análise de amostras obtidas a partir de procedimentos de necropsia. No entanto, pesquisas tem focado na obtenção de amostras de tecido mamário *in vivo* para avaliação histológica e bioquímica, mesmo que a elasticidade, vascularização do tecido mamário em lactação e a possibilidade de ocorrência de hemorragia e mastite dificultem este procedimento e causem efeitos adversos na produção de leite (FARR et al., 1996).

A biopsia da glândula mamária é uma técnica usada tanto em pesquisas quanto no diagnóstico clínico. Em grandes animais, comumente, são relatados a utilização de dois métodos de biopsia. O primeiro consiste na amostragem de grandes fragmentos de tecidos por meio do uso da técnica cirúrgica. Diversos pesquisadores utilizaram técnica cirúrgica através da incisão da pele e hemostasia dos vasos seccionados para a obtenção amostras de tecido mamário em cabras e vacas (KNIGHT et al., 1992a; KNIGHT et al., 1992b; OXENDER et al., 1971), porém esta abordagem extrai apenas tecido glandular superficial, requerendo profunda sedação e anestesia, além de causar infecções no local da biopsia (KNIGHT et al., 1992a). HIBBERT (1964) descreveu um procedimento de biopsia em vacas lactantes em estação utilizando cânula afunilada que pode extrair de 5 a 12 g de tecido secretor em diferentes regiões da glândula mamária. Este método resultou em 17% de incidência de mastite e levou até 18 dias para que a produção de leite retornasse a valores pré-biopsia. Posteriormente, FARR et al. (1996) adaptaram este método com a uso de um instrumento de perfuração com diâmetro interno de 4,5 mm e 85 mm de comprimento acoplado a um motor elétrico de baixa velocidade. O uso deste instrumento resulta na amostragem de fragmentos de tecido com peso de 0.75 a 1 g, no entanto, complicações severas, como hemorragia externa e formação de fístulas foram frequentemente observadas.

Uma abordagem alternativa a técnica cirúrgica e amplamente utilizada na atualidade é a utilização de agulhas e pistolas de biopsia (sistema automático de disparo da agulha) que é capaz de extrair fragmentos reduzidos (20 a 25 mg), a partir de uma pequena incisão, o que minimiza a ocorrência de hemorragia (OLLIER et al., 2009; SOBERÓN et al., 2010). VANKLOMPENBERG et al. (2012) descreveram uma técnica de biopsia que extrai fragmentos de tecidos, com aproximadamente 100 mg, via agulha acoplada em um sistema à

vácuo que em seguida realiza lavagem do local da biopsia com salina com ou sem vaso constritor. Segundo estes autores a utilização desta técnica de biopsia tem como vantagem poder ser empregada em espécies que apresentam glândula mamária de tamanho reduzido, além de diminuir o tempo de cicatrização e ocorrência de sangramentos em relação à técnica cirúrgica descrita por FARR et al. (1996) e HIBBERT (1964). No entanto, o elevado custo da aquisição do equipamento de biopsia via sistema á vácuo representa uma desvantagem da técnica.

A técnica cirúrgica quanto á utilização de agulhas de biopsia, embora muito empregadas, ainda apresentam certas limitações devido ao seu caráter invasivo que resulta em efeitos adversos sobre a produção de leite e saúde do úbere. Por isso, novas pesquisas tem sido desenvolvidas na busca de métodos alternativos menos danosos para a saúde do animal. POLLOTT et al. (2014) descreveram um método não invasivo para estimar apoptose pela mensuração de micropartículas encontradas em amostras de leite coletadas após o pico da lactação, no entanto, para estes autores mais estudos devem ser realizados com o objetivo de melhor caracterizar o comportamento destas micropartículas ao longo de todas as fases da lactação.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE J. J.; AMARDEILH M. A.; DELVERDIER M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 215, p. 1629-1634, 1999.

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 dairy cow. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p.507–513, 2002.

AKERS, R. M.; LEFCOURT, A. M. Milking and suckling-induced secretion of oxytocin and prolactin in parturient dairy cows. *Horm. Behav.*, v. 16, p. 87–93, 1982.

AKERS, R. M. Lactogenic Hormones: Binding Sites, Mammary Growth, Secretory Cell Differentiation, and Milk Biosynthesis in Ruminants. *J. Dairy Sci.*, v. 68, p. 501–519, 1985.

AKERS, R. M. Lactation and mammary gland.; USA: *Blackwell Publishing*, p. 278, 2002.

AKERS, R. M.; CAPUCO, A. V.; KEYS, J. E. Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livest. Sci.*, v. 105, p. 44–49, 2006.

ASHE, P. C.; BERRY, M. D. Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 27, p. 199–214, 2003.

ANNEN, E. L.; COLLIER, R. J.; MCGUIRE, M. A. et al. Effect of Modified Dry Period Lengths and Bovine Somatotropin on Yield and Composition of Milk from Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 3746–3761, 2004.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, v. 281, p.1305–1308, 1998.

BALDI, A.; MODINA, S.; CHELI, F. et al. Bovine somatotropin administration to dairy goats in late lactation: effects on mammary gland function, composition and morphology. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 1093–1102, 2002.

BALLOU, L. U.; BLECK, J. L.; BLECK, G. T. et al. The effects of daily oxytocin injections before and after milking on milk production, milk plasmin, and milk composition. *J. Dairy Sci.* v. 76, p. 1544–1549, 1993.

BAR-PELED, U.; MALTZ, E.; BRUCKENTAL, I. et al. Relations between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 78, p. 2726–2736, 1995.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.*, v. 75, p. 3433–3451, 1992.

BEDNER, E., LI, X., GORCZYCA, W., MELAMED, M. R. et al. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, v. 35, p. 181–195, 1999.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p. 2804–2819, 1995.

BEN CHEDLY, H.; LACASSE, P.; MARNET, P. G. et al. Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *Animal*, v. 4, p. 572–579, 2011.

BERNIER-DODIER, P.; DELBECCHI, L.; WAGNER, G. F. et al. Effect of milking frequency on lactation persistency and mammary gland remodeling in mid-lactation cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 555–564, 2010.

BORTNER, C. D.; OLDENBURG, N.B.; CIDLOWSKI, J.A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, v. 5, p. 21–26, 1995.

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENT, J.; JAMMES, H. GH and milking frequency act differently on mammary cells. *J Anim Feed Sci.*, v. 13(Suppl 1), p. 467–470, 2004.

BOUTINAUD, M.; LOLLIVIER, V.; FINOT, L. et al. Mammary cell activity and turnover in dairy cows treated with the prolactin-release inhibitor quinagolide and milked once daily. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 177–187, 2012.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of caspase: A Review. *Clin. Cancer Res.*, v.11, p. 3155–3162, 2005.

CAPUCO, A. V.; KEYS, J. E.; SMITH, J. J. Somatotrophin increases thyroxine-5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J. Endocrinol.*, v. 121, p. 205–211, 1989.

CAPUCO A. V.; AKERS, R. M.; SMITH, J. J. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acid and histology. *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 477–487, 1997.

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. Mammary Involution in Dairy Animals. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, v. 4, p. 137–144.1999.

CAPUCO, A. V.; WOOD, D. L.; BALDWIN, R. et al. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.*, v. 84, p. 2177–2187, 2001.

CAPUCO, A. V.; ELLIS, S. E. Comparative Aspects of Mammary Gland Development and Homeostasis. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v. 1, p. 179–202, 2013.

CONNOR, E. E.; SIFERD, S.; ELSASSER, T. H. et al. Effects of increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. *BMC Genomics*, v. 9, p. 362–376, 2008.

CORNADIE, R.; BRUGGEMAN, F. J.; CILIBERTO, A. et al. Restriction point control of the mammalian cell cycle via the cyclin E/Cdk2:p27 complex. *FEBS J.*, v. 277, p. 357–367, 2010.

CRAWFORD, H. M.; AUHTUNG, T. L.; WALL, E. H. et al. Evidence that prolactin (PRL) mediates effects of milking frequency in early lactation. *J. Dairy Sci.*, v. 82 (Suppl.1). p. 424 (Abstr.), 2004.

CROCKER, J. Molecular Organizer Regions and Fibrillar Centres. In: HERRINGTON, C.S.; McGEE, J.O'D. (ed). *Diagnostic Molecular Pathology: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University, 1992, v. 1, p. 221–38.

DAHIYA, A.; GAVIN, M. R.; LUO, R. X. ET AL. Role of the LXCXE binding site in RB function. *Mol. Cell Biol.*, v. 20, p. 6799–6805, 2000.

DAHL, G. E.; WALLACE, R. L.; SHANKS, R. D. et al. Effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 882–885, 2004.

DELAMAIRE, E.; GUINARD-FLAMENT, J. Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 3439–3446, 2006.

DERENZINI, M.; TRERÈ, D. AgNOR Proteins as a Parameter of the Rapidity of Cell Proliferation. *Zentralblatt Pathol.*, v. 140, p. 7–10, 1994.

DE VOS, K.; GOOSSENS, V.; BOONE, E. et al. The 55 kda tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 9673–9680, 1998.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, v.102, p. 33–42, 2000.

EKHOLM, S. V.; ZICKERT, P.; REED, S. I. et al. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol. Cell Biol.*, v. 21, p. 3256–3265, 2001.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.*, v. 35, p. 495–516, 2007.

FANG, F.; NEWPORT, J. W. Evidence that the G1-S and G2-M transition are controlled by different Cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell*, v. 66, p. 231–242, 1991.

FARR, V. C.; STELWAGEN, K.; CATE, L. R. et al.. An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.* v. 79, p. 543-549, 1996.

FARR, V. C.; PROSSER, C. G.; DAVIS, S. R. Effects of mammary engorgement and feed withdrawal on microvascular function in lactating goat mammary glands. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 279, p. 1813–1818, 2000.

FERNANDEZ, J.; RYAN, C. M.; GALTON, D. M. et al. Effects of milking frequency during early lactation on performance and health of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 82(Suppl. 1), p. 424. (Abstr.), 2004.

FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S. et al. Melatonina: modulador de morte celular. *Ver Assoc. Med Bras.*, v. 66, p. 489–491, 2010.

FRANZ, S.; FLOEK, M.; HOFMANN-PARISOT, M. Ultrasonography of the Bovine Udder and Teat. *Vet. Clin. Food Anim.*, v. 25, p. 669–685, 2009.

GRIMSLEY, C.; RAVICHANDRAN, K. S. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol.*, v. 13, p. 648–656, 2003

GRÜTTER, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 10, p. 649–655, 2000.

GUINARD-FLAMENT, J.; RULQUIN, H. Effect of once vs. twice daily milking on mammary blood flow (MBF) in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, v. 51, p. 180–, 2001.

GUINARD-FLAMENT, J.; LEMOSQUET, S.; DELAMAIRE, E. et al. Alteration of the nutrient uptake by the udder over an extended milking interval in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 94, p. 5458–5468, 2011.

GUO, M.; HAY, B. A. Cell proliferation and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 11, p. 745–752, 1999.

GURTU, V.; KAIN, S. R.; ZHANG, G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem.*, v. 251, p. 98–102, 1997.

HALE, S. A.; CAPUCO, A.V.; ERDMAN, R. A. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation, *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 2061–2071, 2003.

HASLAM, S. Z.; SHYAMALA, G. Progesterone receptors in normal mammary gland: Receptor modulations in relation to differentiation. *J. Cell Biol.*, v. 86, p.730–737, 1980.

HENDERSON, A. J.; PEAKER, M. Feed-back control of milk secretion in the goat by a chemical in milk. *J. Physiol.*, v. 351, p. 39–45, 1984.

HENDERSON, A. J.; BLATCHFORD, D. R., PEAKER, M. The effects of long-term thrice-daily milking no milk secretion in the goat: Evidence for mammary growth. *Q. J. Exp. Physiol.*, v. 70, p. 557–565, 1985.

HIBBERT, K. G. Biopsy of bovine mammary gland. *Vet. Rec.*, v. 76, p. 418, 1964.

HILLERTON, J. E.; KNIGHT, C. H.; TURVEY, A. et al. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *J. Dairy Res.*, v. 57, p. 285–294, 1990.

HOLST, B. D.; HURLEY, W. L.; NELSON, D. R. Involution of the Bovine Mammary Gland: Histological and Ultrastructural Changes. *J. Dairy Sci.*, v. 70, p. 935–944, 1987.

HURLEY, W. L. Mammary gland function during involution. *J. Dairy Sci.*, v. 72, p. 1637–1646. 1989.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, v. 2, p. 277–88, 2002

ILKBAHAR, N. Y.; THORDARSON, G.; CAMARILLO, I. G. et al. Differential expression of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in epithelia and stroma of the mouse mammary gland at various physiological stages. *J. Endocrinol.*, v. 161, p. 77–87, 1999.

KERR, J. F. R. Shrinkage Necrosis: a Distinct Mode of Cellular Death. *J. Pathol.*, v.105, p. 13, 1971.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, p. 239–257, 1972.

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo. J.*, v. 14, p. 5579–5588, 1995.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *J. Exp. Physiol.*, v. 69, p. 331–338, 1984.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M. Development of mammary land. *Quart. J. Exp. Physiol.*, v. 65, p. 165–177, 1982.

KNIGHT, C. H.; FOWLER, P. A.; WILDE, C. J. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J. Endocrinol.*, v. 127, p. 129–138, 1990.

KNIGHT, C. H.; HILLERTON, J. E.; KERR, M. A. et al. Separate and additive stimulation of bovine milk yield by the local and systemic galactopoietics stimuli of frequent milking and growth hormone. *J. Dairy Res.*, v. 59, p. 243, 1992a.

KNIGHT, C. H.; HILLERTON, J. E.; TEVERSON, R. M. et al. Biopsy of the bovine mammary gland. *Br. Vet. J.*, v. 148, p. 129, 1992b.

KNIGHT, C. H.; PEAKER, M.; WILDE, C. J. Local control of mammary development and function. *Rev. Reprod.*, v. 3, p. 104–112, 1998.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, v. 84, p. 1415–1420, 1994.

KRAVIS, L. D.; VAIL, D. M., KISSEBERTH, W. C. et al. Frequency of argyrophilic organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 209, p. 1418–1420, 1996.

KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N. et al. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.*, v. 171, p. 4672–4679, 2003.

LAUNAY, S.; HERMINE, O.; FONTENAY, M. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, v. 24, p. 5137–5148, 2005.

LIMA, J. A. M.; COELHO, S. G.; RUAS, J. R. M. et al. Efeito do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre produção e composição do leite de vacas mestiças Holandês / Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, p. 1160–1160, 2011.

LIU, S.; BISHOP, W. R.; LIU, M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21 (WAR1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist. Updat.*, v. 6; p.183–195, 2003.

LODISH, H. et al. *Molecular Cell Biology*, 3<sup>rd</sup> ed. New York, WH Freeman, 1995, p. 855.

LORENZO, H. K.; SUSIN, S. A.; PENNINGER, J. et al. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.*, v. 6, p. 516–524, 1999.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, v. 1, p. 533–557, 2012.

MADEWELL, B. R. Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. *J. Vet. Int. Med.*, v. 15, p. 334–340, 2001.

MALTZ, E.; BLATCHFORD, D. R.; PEAKER, M. Effects of frequent milking on milk secretion and mammary blood flow in the goat. *Q. J. Exp. Physiol.*, v. 69, p. 127–132, 1984.

McCARTHY N. J.; EVAN, G. I. Methods for Detecting and quantifying apoptosis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 36, p. 259–279, 1998.

McMANAMAN, M. C.; NEVILLE, M. C. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 5, p. 629–641, 2003.

MINNA, W.; HAKEM, R.; MAK, T. W. Executionary pathway for apoptosis: lessons from mutant Mice. *Cell Research*, v.10, p. 267–278, 2000.

MORAG, M. Two and three times-a-day milking of cows. *Acta Agric. Scand.*, v. 23, p. 256–260, 1973.

MURNEY, R.; STELWAGEN, K.; WHEELER, T. T. et al. The effects of milking frequency in early lactation on milk yield, mammary cell turnover, and secretory activity in grazing dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v. 98, p. 1–7. 2014.

MUZIO, M.; STOCKWELL, B. R.; STENNICKE, H. R. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 2926–2930, 1998.

NELSON, C. M.; CHEN, C. S. Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS letters.*, v. 514, p. 238–242, 2002.

NEVILLE, M. C.; MEDINA, D.; MONKS, J. et al. The mammary fat pad. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*, v. 3, p. 109–116, 1998.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, v. 7, p. 49–66, 2002.

NØRGAARD, J.; SORENSEN, A.; SORENSEN, M. T. et al. Mammary cell turnover and enzyme activity in dairy cows: Effects of milking frequency and diet energy density. *J. Dairy. Sci.*, v. 88, p. 975–982, 2005.

NØRGAARD, J. V; THEIL, P. K.; SØRENSEN, MT. et al. Cellular Mechanisms in Regulating Mammary Cell Turnover During Lactation and Dry Period in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, v. 91, p. 2319–2327, 2008.

NGUYEN, D. A.; PARLOW, A. F.; NEVILLE, M. C. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *J. Endocrinol.*, v. 170, p. 347–356, 2001.

OGINO, A.; YOSHINO, A.; KATAYAMA, Y. et al. The p15 INK4b/p16 INK4a/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v. 64, p. 398–403, 2005.

OLIVER, L.; VALLETTE, F. M. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resist. Updat.*, v. 8, p. 163–170, 2005.

OLLIER S, LEROUX C, DE LA FOYE A. et al. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 5544-5560, 2009.

OSHIMA, J.; CAMPISI, J. SYMPOSIUM: MAMMARY CELL PROLIFERATION AND MORPHOGENESIS. Fundamentals of cell Proliferation: Control of Cell Cycle. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 2778–2787, 1991.

OXENDER, W. D.; ASKEW, E. W.; BENSON, J. D. et al. Biopsy of liver, adipose tissue and mammary gland of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v. 54, p. 286–288, 1971.

PARDEE, A.B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Nat Acad. Sci.*, v. 71, p. 1286–1290, 1974.

PEARL, S. L.; DOWNEY, H. F.; LEPPER, T. L. Intramammary pressure and mammary blood flow in lactating goats. *J. Dairy Sci.*, v. 56, p. 1319–1323, 1973.

PETERSON, J. Y.; LINZELL, J. L. Cortisol secretion rate, glucose entry rate and the mammary uptake of cortisol and glucose during pregnancy and lactation in dairy cows. *J. Endocrinol.*, v. 62, p. 371–383, 1974.

POLLOTT, G. E.; WILSON, K.; JERRAM, L. et al. *Technical note*: A noninvasive method for measuring mammary apoptosis and epithelial cell activation in dairy animals using microparticles extracted from milk. *J. Dairy Sci.*, v. 97, p. 5017–5022, 2014.

PLOTON, D. Structure and Molecular Organization of Nucleolus. *Zentralblatt Pathol.*, v. 140, p. 3-6, 1994.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; MARCATO, P. S. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *J. Comparative Pathol.*, v. 113, p. 301–313, 1995.

PROSSER, C. G. E.; DAVIS, S. R. Milking frequency alters the milk yield and mammary blood flow response to intra-mammary infusion of insulin-like growth factor-I in the goat. *J. Endocrinol.*, v. 135, p. 311–316, 1992.

PROSSER, C. G., DAVIS, S. R., FARR, V. C.; LACASSE, P. Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. *J. Dairy Sci.*, v. 79, p. 1184–1197, 1996.

REMOND, B.; KEROUANTON, J.; BROCARD, V. Effects de la réduction de la durée de la période sèche ou de son omission sur les performances des vaches laitières. *INRA Prod. Anim.*, v. 10, p. 301–333, 1997.

RENNISON, M. E.; KERR, M.; ADDEY, C. V. P. et al. Inhibition of constitutive protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells by FIL (feedback inhibitor of lactation), a secreted milk protein. *J. Cell Sci.*, v. 106, p. 641–648, 1993.

RICHARDS, R. C.; BENSON, G. K. Ultrastructural changes accompanying involution of the mammary gland in the albino rat. *J. Endocrinol.*, v. 51, p. 127, 1971.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H. et al. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.*, v. 44, p. 335–341, 2007.

SANDERS, A. H.; VARNER, M. A.; ERDMAN, R. A. The effects of six times a day milking in early lactation on milk yield, milk composition, body condition and reproduction. *J. Dairy Sci.*, v. 83(Suppl. 1), p. 242(Abstr.), 2000.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N. et al. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J. Comp. Pathol.*, v. 127, p. 233–238, 2002.

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A. et al. Two CD95 (APO-1/ Fas) signaling pathways. *Embo. J.*, v. 17, p. 1675–1687, 1998.

SCAFFIDI, C.; SCHMITZ, I.; ZHA, J. et al. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 22532–22538, 1999.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J. et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J. Vet. Int. Med.*, v. 20, p. 151–158, 2006.

SCHAMS, D.; KOHLENBERG, S.; AMSELGRUBER, W. et al. Expression and localization of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol.*, v. 177, p. 305–317, 2003.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.*, v. 64, p.7183–7190, 2004.

SEGRETO, H. R. C.; WAITZBERG, A. F. L.; OSHIMA, C. T. F. et al. Apoptose: aspectos atuais e relevância para a radioterapia. *Fol. Méd.*, v. 121, p. 149–155, 2002.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1phase progression. *Genes Dev.*, v. 13, p. 1501–1512, 1999.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*, v. 60, p.3689–3695, 2000.

SIEGEL, R. M.; FREDERIKSEN, J. K.; ZACHARIAS, D. A. et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, v. 288, p. 2354–2357, 2000.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 7320–7326, 2001.

SMITH, A.; WHEELOCK, J. V.; DODD, F. H. Effect of milking throughout pregnancy on milk secretion in the succeeding lactation. *J. Dairy Res.*, v. 34, p. 145–150, 1967.

SOBERÓN, F.; LUKAS, J. L.; VAN AMBURGH, M. E. et al. Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, n. 93, p. 565–573, 2010.

SOBERÓN, F.; RYAN, C. M.; NYDAM, D. V. et al. The effects of increased milking frequency during early lactation on milk yield and milk composition on commercial dairy farms. *J. Dairy Sci.*, n. 94, p. 4398–4405, 2011.

SLACK, J. M. W. Stem cells in epithelial tissues. *Science*, v. 287, p. 1431-1433, 2000.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 1112–1120, 1988.

SORENSEN, J. T.; ENEVOLDSEN, C. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 1277–1283, 1991.

SORENSEN, M. T.; NORGAARD, J. V.; THEIL, P. K. et al. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 4632–4639, 2006.

SRINIVASULA, S. M.; HEGDE, R.; SALEH, A. et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, v. 410, p. 112–116, 2001.

STELWAGEN, K.; DAVIS, S. R.; FARR, V. C. et al. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *J. Dairy Sci.*, v. 77, p. 426–432, 1994.

STELWAGEN, K.; KNIGHT, C. H. Effect of unilateral once or twice daily milking of cow on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *J. Dairy Res.*, v. 64, p. 487–494, 1997.

STELWAGEN, K.; VAN ESPEN, D. C.; VERKERK, G. A. et al. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *J. Endocrinol.*, v. 159, p. 173–178, 1998.

STELWAGEN, K. Effect of milking frequency on mammary function and shape of the lactation curve. *J. Dairy Sci.*, v. 84, p. 204–211, 2001.

SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M. et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, v. 184, p. 1331–1341, 1996.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K., CLAEISSON, C. O.; NELSON, L. Effect of local stimulation of one quarter on milk production and milk components. *J. Dairy Sci.*, v. 73, p. 970–974, 1990.

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

TAYLOR, W. R.; STARK, J. R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, v. 20, p. 1803–1015, 2001.

TRAVERS, M. T.; BARBER, M. C.; TONNER, E. et al. The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to., 1996.

TROTT, J. F.; HORIGAN, K. C.; GLOVICZKI, J. M. et al. Tissue-specific regulation of porcine prolactin receptor expression by estrogen, progesterone, and prolactin. *J. Endocrinol.*, v. 202, p. 153–166, 2009.

TROTT, J. F.; SCHENNINK, A.; PETRIE, W. K. et al. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: Prolactin: The multifaceted potentiator of mammary growth and function. *J. Anim. Sci.*, v. 90, p. 1674–1686, 2012.

TUCKER H. A. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 874–84, 2000.

VALLAT, L.; MAGDELENAT, H.; MERLE-BERAL, H. et al. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood*. v. 101, p. 4598–4606, 2003.

VANBAALE, M. J.; LEDWITH, D. R.; THOMPSON, J. M. et al. Effect of increased milking frequency in early lactation with or without recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 3905–3912, 2005.

VANKLOMPENBERG, M. K.; MCMICKING, H. F.; HOVEY, R. C. Technical note: A vacuum-assisted approach for biopsying the mammary glands of various species. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 243–246, 2014.

VASCONCELOS, A. C.; VASCONCELOS, M. M. A. Apoptose ou morte celular programada - um novo conceito em patologia? *R. Méd. Minas Gerais*, v. 5, p. 103–108, 1995.

VERNELL, R.; HELIN, K.; MILLER, H. Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 46124–46137, 2003.

WALL, E.H.; CRAWFORD, H. M.; ELLIS, S. E. et al. Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 4640–4648, 2006.

WALL, E. H.; MCFADDEN, T. B. The milk yield response to frequent milking in early lactation of dairy cows is locally regulated. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 716–720, 2007.

WALL, E. H.; MCFADDEN, T. B. Use it or lose it: Enhancing milk production efficiency by frequent milking of dairy cow. *J. Anim. Sci.*, v. 86, p. 27–36, 2008.

WALL, E. H.; MCFADDEN, T. B. The effects of milk removal or four-times-daily milking on mammary expression of genes involved in the insulin-like growth factor-I axis. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 4062–4060, 2010.

WALL, E. H.; BOND, J. P.; MCFADDEN, T. B. Acute milk yield response to frequent milking during early lactation is mediated by genes transiently regulated by milk removal. *Physiol. Genomics*, v. 44, p. 25–34, 2012

WALL, E. H.; MCFADDEN, T. B. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: A local affair: How the mammary gland adapts to changes in milking frequency. *J. Anim. Sci.*, v. 90, p. 1695–1707, 2012.

WALL, E. H.; BOND, J. P.; MCFADDEN, T. B. Milk yield responses to changes in milking frequency during early lactation are associated with coordinated and persistent changes in mammary gene expression. *BMC Genomics*, v. 14, p. 296–312, 2013.

WILDE, C. J.; HENDERSON, A. J. Lipogenic enzyme activities in goat mammary gland: changes with stage of pregnancy and lactation and frequency of milking. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 13, p. 877–878, 1985.

WILDE, C. J.; HENDERSON, A. J.; KNIGHT, C. H. et al. Effects of long-term thrice daily milking on mammary enzyme activity, cell population and milk yield in the goat. *J. Anim. Sci.*, v. 64, p. 533–539, 1987.

WILDE, C. J.; KNIGHT, C. H. Milk yield and mammary function in goats during and after once-daily milking. *J. Dairy Res.*, v. 57, p. 441–447, 1990.

WILDE, C. J.; ADDEY, C. V. P.; BODDY, L. M. et al. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. Journal*, v. 305, p. 51–58, 1995.

WILDE, C. J., ADDEY, C. V. P.; PEAKER, M. Effects of immunization against an autocrine inhibitor of milk secretion in lactating goats. *J. Physiology*, v. 49, p. 465–469, 1996.

WILDE, C. J.; QUARRIE, L. H; TONNER, E. et al. Mammary apoptosis. *Livest. Prod. Sci.*, v. 50, p. 29–37, 1997.

WOLF, B. B.; GREEN, D. R.: Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 20049–20052, 1999.

WRIGHT, J. B.; WALL, E. H.; MCFADDEN, T. B. Effects of increased milking frequency during early lactation on milk yield and udder health of primiparous Holstein heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 91, p. 195–202, 2013.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol.*, v. 40, p. 481–95, 2003.

ZHAOYU, J. W.; EL-DEIRY, S. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, v. 4, p. 139–163, 2005.

#### **4. OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar os efeitos de biopsias mamárias sobre as características dos tecidos obtidos e saúde do úbere pós-biopsia e os potenciais mecanismos celulares responsáveis pelo efeito residual do aumento da frequência de ordenha sobre a produção de leite.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Avaliar se o procedimento de biopsia mamária resulta em efeitos deletérios sobre a produção e composição do leite, peso corporal, escore de condição corporal (ECC) e saúde do úbere;
- 2- Determinar os efeitos do aumento da frequência de ordenhas, nos 21 dias pós-parto, sobre a produção e composição do leite ao longo da lactação;
- 3- Avaliar se o aumento da frequência de ordenhas no início da lactação resulta em efeitos positivos ou negativos sobre a saúde da glândula mamária;
- 4- Detectar, quantificar e verificar a relação da apoptose e proliferação celular no epitélio e estroma mamário de vacas ordenhadas quatro vezes versus duas ordenhas diárias;
- 5- Determinar diferenças no crescimento do epitélio celular mamário ao longo dos primeiros 28 dias da lactação, via quantificação e avaliação morfológica de seu epitélio;
- 6- Caracterizar o comportamento da população de células secretoras da glândula mamária durante o início da lactação de vacas mestiças submetidas à diferentes frequências de ordenhas (ordenha duas ou quatro vezes ao dia até 21º dias da lactação).

## CAPÍTULO I

### **Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield**

J. A. M. Lima<sup>1</sup>, J. R. M. Ruas<sup>2</sup>, A. C. Vasconcelos<sup>1</sup>, B. F. Silper<sup>3</sup>, A. M. Q. Lana<sup>1</sup>, V. A. Gheller<sup>1</sup>, H. M. Saturnino<sup>1</sup>, R. B. Reis<sup>1</sup>, and S. G. Coelho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*School of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 6627 Avenida Antônio Carlos POBox 567, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil; CEP: 30123-970*

<sup>2</sup>*Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG*

<sup>3</sup> *Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver, BC, V6T 1Z4 Canada*

Corresponding author: Juliana Lima. E-mail: julianamello85@gmail.com

Short title: Mammary biopsy, milk production and composition, udder health

#### **Abstract**

Sixteen cows in early lactation were randomly distributed into two groups in order to evaluate the effects of mammary biopsies and increased milking frequency on tissue characteristics, post-biopsy udder health and histology. One group was milked twice a day (2X) starting on the second day after calving, until 28 days in milk (DIM). The other group was milked four times a day (4X) from two to 21 DIM, and twice a day (2X) from 22 to 28 DIM. On days 2, 7, 14, 21, and 28 *postpartum*, one fragment of secretory tissue was collected from one mammary quarter at a time. Collections were alternated between the four mammary quarters per collection day. A total of 80 mammary tissue samples were collected. Qualitative and quantitative analyses of the tissues were conducted by histologic examination. Animal health was assessed by observation of food intake behavior immediately after biopsy, and weight and body condition score (BCS) before and one week after biopsy. Udder health was assessed daily from calving to 60 DIM with California Mastitis Test (CMT) and by noting alterations

in the milk such as blood, milk clots, blood clots, clinical signs of mastitis. Milk composition and somatic cell count (SCC) were analyzed before and after the biopsies. Milk production was evaluated before biopsy, on the day of biopsy, and after the biopsy. An average of 10 fields at 40× magnification was obtained from each sample. There were no evident changes in mammary morphology as a result of milking two or four times/d at any of the evaluated time points. Biopsy wounds healed rapidly without infection. Intramammary bleeding and CMT alterations were observed in 96% and 75% of the biopsied mammary quarters, respectively. Clinical mastitis was diagnosed in 12% of the biopsied quarters. Different milking frequencies had no effect on the frequency and duration of post-biopsy alterations. Milk production decreased after biopsies done on days 2, 14, and 21, but it returned to pre-biopsy values within two days. Milk composition and SCC were affected transiently. Increased milking frequency did not influence udder health. Post-biopsy recovery was rapid and the procedure proved effective without damaging the cows' health.

**Keywords:** SCC, cow, histology

### **Implications**

The study of the morphology and function of the mammary gland in production animals has been restricted to samples obtained from necropsy procedures. Current research has focused on obtaining *in vivo* samples; however, the potential adverse effects on milk production and udder health must be reported and further studied.

### **Introduction**

The study of the morphology and function of the mammary gland in dairy animals has been restricted to samples obtained from necropsy procedures. However, in recent years, research has focused on obtaining *in vivo* mammary tissue samples for histological and biochemical evaluation. This has been done despite difficulties in the procedure and possible adverse effects on milk production deriving from elasticity and vascularization of lactating mammary tissue and the possibility of hemorrhage and mastitis (Farr *et al.*, 1996).

Mammary gland biopsy is a technique used in both research and clinical diagnosis. On large animals, two biopsy methods are commonly reported. The first involves surgically obtaining large tissue fragments (0.75–1 g), resulting in severe complications such as external

hemorrhage and formation of fistulas (Farr *et al.*, 1996). The second technique uses needles and biopsy pistols (automatic needle jab system), being capable of extracting small fragments (20–25 mg) from a small incision, minimizing hemorrhage (Ollier *et al.*, 2009; Soberón *et al.*, 2010). VanKlompbergen *et al.* (2012) described a biopsy technique that extracts tissue fragments of approximately 100 mg via a vacuum system followed by a saline lavage of the biopsied site, with or without vasoconstrictors. This method could potentially reduce complications after biopsy.

Greater milking frequency/d increases milk production in several species. It has also been associated to a decrease in somatic cell count (SCC) (Smith *et al.*, 2002, Dahl *et al.*, 2004, Wright *et al.*, 2013), an indicator of mammary gland health. However, other authors did not observe such effect (Wall and McFadden, 2007, Shields *et al.*, 2011). No previous study has evaluated the effect of milking frequency on the udder health after biopsy. The objectives of the present study were a) to describe and evaluate the adaptation of the use of biopsy needle to assess bovine mammary tissue, b) to determine the main occurrences related to milk yield and udder health after the procedure, and c) to evaluate the effect of increased milking frequency on such occurrences.

## **Materials and methods**

### *Animals, management and sampling*

The Federal University of Minas Gerais ethical committee (CETEA/UFMG n. 58/2011) approved all the experimental procedures. The study was conducted at the Experimental Farm of the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG), located in Felixlândia, Minas Gerais, Brazil, between June and December of 2013. Biopsies were performed at early lactation in 16 F1 Holstein × Zebu multiparous cows (third and greater lactations), homogeneously distributed into two groups according to parity, mean milk production and SCC of the previous lactation, genetic composition and calving date. The groups were: 1) 2X: cows milked twice/d (n = 8) and 2) 4X: cows milked four times/d (n = 8), from two to 21 days *postpartum* (PP). After d 21 of lactation, both groups were milked twice/d until 28 DIM. Milkings started on d 2 of lactation. Milking times were 0600 and 1400 h for the 2X group. Cows in the 4X group were also milked at 0930 and 1530 h. All animals were fed the same diet *ad libitum* and kept in the same location during the experimental period. Milk yield was measured with Milk Meter-Mark V collectors ( $\alpha$ -Laval Agri; Jaguariúna-SP, Brazil) on days

where the milk from the biopsied quarter was normal at visual inspection. Milk samples (polled from successive a.m. and p.m. milkings) were collected one day before biopsy and daily after biopsy, starting at the day when no visible contamination by blood was seen on the milk. Percentage of fat, protein and lactose, and SCC were measured in each milk sample using spectroscopy and flow cytometry (Bentley Combi System 2300 and Bentley Instruments Incorporated, Chaska, USA, respectively) at the Laboratory of Milk Analysis and Quality at the Federal University of Minas Gerais Veterinary School.

Food intake behavior was assessed by visual observation immediately after the biopsy. Cows were weighed and body condition score (BCS) assessed before and 7 d after the biopsy by a single evaluator. The BCS was scored on a 1 to 5 point scale based on inspection of the pelvis and tail head, ribs, and back according to Edmonson *et al.* (1989).

Udder health was assessed daily until 60 DIM by visually examining the milk for blood, milk clots, and blood clots, by California Mastitis Test (CMT), and by monitoring clinical signs of mastitis (redness, increased udder temperature, pain on palpation, and edema). The CMT was scored according to McDougall *et al.* (2010) as follows: Score 0 or negative: no reaction between the reagent and milk; trace: suspicious reaction; score 1 or +: weak positive reaction; score 2 or ++: positive reaction; and score 3 or +++: strong positive reaction.

#### *Tissue Sampling and Analysis*

Mammary biopsies were performed in the medial region of the mammary quarter in eight cows from each group on days 2, 7, 14, 21, and 28 postpartum. Biopsies were performed immediately after the 0600 h milking for 2X cows, and after the 0930 h milking for 4X cows. For each animal, one fragment of secretory tissue was collected from one mammary quarter at a time, alternating between the four mammary quarters per collection day. A total of 80 biopsy samples were collected.

Biocore II needles comprising a 12-gauge cannula and a 12-cm perforating monoface mandrel were used (MMdiagnostika; São Paulo-SP, Brazil). After milking, the cows were restrained in a squeeze chute and sedated with 1.5 mL of 1% acepromazine administered intramuscularly (0.03 mg/kg, Acepran; VETNIL Ind. and Com. of Veterinary Products Ltd., Louveira-SP, Brazil). Cows were not fasted before the biopsy and remained standing throughout the procedure. To allow adequate visibility of the biopsy site and increase safety, the rear limb ipsilateral to the biopsied quarter was suspended and restrained on the chute.

The area to be biopsied (20 cm<sup>2</sup> without visible subcutaneous blood vessels) was marked, trichotomized, and cleansed aseptically using 10% povidone-iodine and 70% alcohol. Skin and mammary tissue were locally anesthetized with 2% lidocaine hydrochloride without vasoconstrictors (20 mg/ml, Xylestesin; Cristália–Pharmaceutical Products Ltd., Itapira-SP, Brazil) administered subcutaneously (1 mL) and into the superficial intramammary tissue (2.5 mL). A small skin incision was made with a 40 × 16 needle to introduce the biopsy needle. The biopsy needle and mandrel were introduced through the skin incision approximately 1.5 cm into the mammary parenchyma. Subsequently, the mandrel was manually positioned toward the parenchyma, rotated 360°, and then fixed; next, the cannula was pushed, completely covering the mandrel, and the needle was removed from the mammary gland.

If mammary tissue was not retrieved, the needle was reintroduced, and the procedure repeated until an appropriate amount of tissue was obtained. After the procedure, a silver sulfadiazine healing spray (Bactrovet Prata AM; König, Avellaneda-BS, Argentina) was applied onto the incision site. Neither intramammary drugs nor intravenous antibiotics were administered in order to evaluate mastitis incidence without the use of preventive measures. If mastitis was diagnosed, intramammary gentamicin sulfate 150 mg (Mastifin; Ourofino Group, Cravinhos-SP, Brazil) was administered for three consecutive days.

#### *Histological procedures*

Tissue samples were fixed in formalin (10% neutral and buffered) for 8 h and transferred to 70% alcohol. Samples were then serially dehydrated in alcohol (80% and 90% for 1 h, and 100% for 2 h), clarified in xylene (5 min), infiltrated with liquid paraffin (56–58°C for 5 min), and embedded in paraffin blocks. The blocks were cut into 4 µm-thick slices (RM 2255 Leica Microtome), mounted on slides, stained with hematoxylin-eosin (HE) and covered with cover slips using mounting medium (Etellan).

The slides were observed under a microscope. A 4× objective lens was used to randomly select the fields to be photographed. Once a field was selected, a 40× objective lens was used to capture the highest number of images with a Q Color S Olympus digital camera coupled to an Olympus BX-43 Microscope Image Pro Plus software version 7.0 was used for image capturing. Images were analyzed for histological evaluation of mammary tissue.

### *Statistical analyses*

A chi-square test was used to analyze the association between biopsy-related occurrences and milking frequency. Comparison between duration of occurrences and milking frequency was analyzed with a random design. Body weight and SCC were standardized with a logarithmic function and the duration in days of presence of blood clots in the milk with a root function. Body weight, milk composition and SCC were evaluated by comparing means before and after biopsy for dependent samples using paired t test ( $P < 0.05$ ). The BCS was analyzed using the Wilcoxon test, with a 95% confidence interval. Descriptive analyses were used for the morphological results, CMT, and animal health evaluation. Regression analyses were conducted to estimate individual milk production for the days when measuring was not done due to the presence of blood in the milk. Comparison of estimated milk production throughout the days was analyzed through random units, a unit being the animal. The Student-Newman-Keuls (SNK) test was used to compare mean differences in milk production. Analyses were conducted with SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## **Results and discussion**

### *Evaluation of biopsy samples*

Biopsies were easily obtained in various mammary sites using a rapid procedure lasting no more than 20 min from animal restraint to the end of the procedure. Using the biopsy needle, a core of mammary tissue of approximately  $6 \times 3$  mm was obtained at each biopsy. The biopsy technique does not allow the removal of tissue fragments from precise locations, therefore it is unknown which mammary gland region is being sampled. In total, 12 samples showed no secretory mammary tissue. Two were identified as mammary gland cistern tissue, and 10 were fibrous tissue only, likely from the gland cistern.

Samples were obtained with minimal tissue damage, and its fragmentation was observed. The fragments produced an average of 10 fields at  $40\times$  magnification. Microscopic structures were clearly visible on histology, and the samples contained predominantly healthy alveolar secretory tissue. Compared to the method described by Farr *et al.* (1996) and used in other studies (Hale *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2006; Annen *et al.*, 2007), one disadvantage of the present biopsy method is that only small tissue fragments can be collected. However, multiple samples can be collected from a single incision by directing the biopsy needle towards a different location.

There were no evident changes in mammary morphology as a result of milking 2X or 4X/d at any of the evaluated time points. On the second d of lactation, it was observed for both groups that alveoli were comprised of heterogeneous cell populations, most of these having the nuclei located near the basal region, occupying much of the intracellular area, also with presence of small quantities of small cytoplasmic vacuoles (Figure 1A). According to Akers *et al.* (2006) and Annen *et al.* (2007), these cells can be classified as poorly differentiated or resting cells, respectively. Some alveoli presenting cells with large vacuoles in the cytoplasm occupying most of the intracellular space, characteristic of fat globules, which result in nucleus of irregular shape and polarity yet to be established (Figure 1B) were also observed. These alveoli were observed at 20 DIM in cows milked continuously during the dry period and defined by Annen *et al.* (2007) as engorged alveoli. Holst *et al.* (1987) observed similar characteristics in mammary alveoli during the dry period. Thus, the engorged alveoli observed at 2 DIM are likely to be entering the differentiation stage.

From 7 DIM, the nucleus of alveolar cells began to show basal position and the proportion of the cell area occupied by the nucleus diminished over DIM (Figure 1C and 2), resulting in a more evident cytoplasm. Annen *et al.* (2007) reported the presence of resting alveoli in d 1 and d 7 *postpartum*, suggesting that not all the mammary epithelium cells are fully differentiated *postpartum*. Different from that observed by Annen *et al.* (2007), in the present study these cells with morphology suggestive of repose were not visualized at 7 DIM, suggesting a more rapid cell differentiation in animals used in this experiment compared to the Holstein cows.

The proportion of interalveolar connective tissue appeared to decrease throughout the period studied while the alveolar luminal area increased, although these changes were not quantitated (Figure 2). The increased interalveolar space was observed mainly at 2 DIM. Interalveolar space was filled with loose connective tissue, but a large amount of cells was also found in these areas. These cells consisted mainly of fibroblasts, mononuclear cells (lymphocytes, monocytes and macrophages) and plasmocytes. Mononuclear cells and plasmocytes were also observed migrating into the alveolar lumen. The greater cellularity in mammary stroma and lumen in early lactation can result from the physiological process of colostrogenesis which begins at the end of the dry period.

### *Udder health*

After biopsy, cows were released from the chute and moved to their pens. All animals began feeding immediately, indicating a fast post-biopsy recovery. There was no difference between number of milkings (2X or 4X) in the frequency of hematomas, intramammary bleeding, blood clot, edema, fibrosis, mastitis, intramammary hemorrhage duration, and presence of blood clots in the milk and edema ( $P > 0.05$ ; Table 1). In addition, post-biopsy SCC was not different between 2X and 4X groups once blood contamination was no longer visible in the milk (2X =  $305.76 \times 1000$  cells/mL and 4X =  $445.21 \times 1000$  cells/mL;  $P > 0.05$ ). Although SCC was not different between 2X and 4X groups, observed counts are indicative of inflammation following biopsy, once the SCC threshold for mammary gland inflammation is of  $250 \times 1000$  cells/mL (Smith, 1996). Furthermore, it was expected that the 4X would have faster recovery of biopsied gland health (shorter duration of high SCC and of observed alterations), due to more frequent removal of milk from the gland, with consequent removal of blood and clot. However, this was not observed, demonstrating that recovery of the mammary gland after biopsy may be related to intrinsic factors of the animal. It is possible that an increase in metabolic load associated with increased milk production until the peak of lactation, weakens defenses and negatively affects the health of the mammary gland (Ingvastsen *et al.*, 2003).

Biopsy sites healed without any infections. Subcutaneous hematomas were observed in 11 of the 80 biopsies (14%) and were reabsorbed within one day. According to Farr *et al.* (1996), surgical biopsy causes intense external hemorrhage and subcutaneous hematomas persisting up to six days. This outcome was not observed in any of the present subjects, demonstrating an advantage of the biopsy needle procedure compared to the surgical methodology.

Most of the biopsied mammary quarters (96%) showed intramammary bleeding, and only three quarters showed no visible blood contamination in the milk. Out of 80 biopsies, 25 quarters showed visible blood in the milk for 2 days, 27 for 4 days, 19 for 6 days. Only six quarters had blood contamination persisting over 6 days (Figure 3). VanKlompberg *et al.* (2012) performed the biopsy technique using a vacuum system and observed blood residue or blood clot in the milk for no more than 7 days, one day longer than most of the biopsies in the present study.

In addition to blood, blood clots were also observed in the milk for 69 biopsies (87%) persisting for no more than 6 days; only five quarters had blood clots persisting for more than 6 days (Figure 2). Blood clots were manually removed during and after milking. According to Farr *et al.* (1996), knowledge of mammary gland vascularization is important to choose the best biopsy site in order to avoid arteries and veins of large caliber, thus reducing the incidence of internal hemorrhage. After the biopsy, 43 mammary quarters (54%) had edema that resolved in three days; however, the edema persisted for more than three days in quarters positive for mastitis. No difference was observed between front and hind quarters as to duration of edema and milk contamination with blood or blood clots. Small visible or palpable fibrotic lesions were observed at the biopsy site in five biopsied quarters (6%), which resolved spontaneously between 15 to 20 days. Marx and Caruolo (1963), who performed surgical biopsies, reported similar findings.

Although BCS was not affected by biopsy ( $P>0.05$ ), body weight before the biopsy (PAB = 544.8 kg) and one-week after the biopsy (PPB = 540.5 kg) were different ( $P<0.05$ ; Table 2). This loss of body mass should be interpreted cautiously as it likely reflects the body reserve mobilization that occurs during early lactation due to negative energy balance, rather than the biopsy procedure.

Before biopsy, all mammary quarters tested negative on CMT (score 0). One day after the biopsy, 75% of the glands ( $n = 60$ ) had a positive CMT reaction (trace: 0% [0]; score 1: 40% [24]; score 2: 43% [26]; and score 3: 17% [10]) that persisted an average of 5.2 days and a maximum of 12 days in cases diagnosed with clinical mastitis. At 60 days of lactation, only three biopsied quarters showed CMT alterations, suggesting that the biopsy procedure may cause a transitory SCC increase. The SCC of post-biopsy milk ( $\text{SCC} = 358.23 \times 1000$  cells/mL) was higher than that in milk collected prior to the procedure ( $\text{SCC} = 197.39 \times 1000$  cells/mL;  $P<0.05$ ; Table 2). The SCC decreased to values smaller than pre-biopsy values after no more than 11 days, which is 5 days after the end of visible abnormalities in the milk, except in the mammary quarters positive for clinical mastitis.

Among the 80 biopsies, 10 mammary quarters (12%) were diagnosed and treated for clinical mastitis, nine recovered quickly, and one quarter was lost due to mastitis-related complications. These results indicate that the biopsy procedure may cause an inflammatory reaction due to physical trauma caused by the needle. Most studies using biopsy needle or gun, or surgical methods report an absent (Annen *et al.*, 2007) or low mastitis incidence (Farr

*et al.*, 1996; Sorensen *et al.*, 2006). However, this may be due to the use of prophylactic antibiotics, either systemic or intramammary, pre and post-biopsy, or other factors such as installations and milking management since mastitis incidence is associated with multiple factors. Marx and Caruolo (1963) reported mastitis incidence of 14% after needle biopsy without concurrent prophylactic antibiotics, which is similar to the present finding. Thus, the use of prophylactic antibiotics could minimize the risk of mammary infection post-biopsy.

#### *Production and milk composition*

In the biopsies performed on days 2 and 21 of lactation, estimated milk yield was reduced only on the day following the biopsy and rapidly went back to pre-biopsy values on the day after biopsy. On biopsies performed on day 14 of lactation, the decreased milk production persisted for one extra day ( $P<0.05$ ). Regarding biopsies done on days 7 and 28 of lactation, no difference was found on the estimation of milk production on the days following the biopsy ( $P>0.05$ ; Table 3). These results demonstrate that alterations in milk production after biopsy are reversible and of limited duration, averaging 1.3 days.

According to Farr *et al.* (1996), milk production in the biopsied gland during the intermediary lactation phase is significantly reduced when compared to the pre-biopsy period, recovering within 6.5 days post-biopsy. Annen *et al.* (2007) showed that daily milk production in biopsied animals was not influenced by the biopsy procedure. However, it is important to state that the progressive increase in milk production until the peak of lactation may mask potentially negative effects on production, which may explain the minimal or absent effects observed in the present study and on the study by Annen *et al.* (2007).

Milk samples analyzed pre and post-biopsy did not show any difference in fat percentage ( $P>0.05$ ), even though a higher percentage of protein and lower percentage of lactose was observed in pre-biopsy samples when compared to the post-biopsy samples ( $P<0.05$ ; Table 2). According to Tsioulpas *et al.* (2007), the physiological composition of milk is characterized by a high percentage of protein on the first day of lactation that gradually declines over 30 days, whereas the percentage of lactose, which is initially low, increases over the next 60 days of lactation. Thus, because the biopsies were performed in the first 28 days of lactation, the observed changes in milk composition may be related to physiological changes in milk composition occurring during this period instead of being a consequence of the biopsy.

Elevated SCC may result in alterations in milk composition, with a low percentage of solids because of reduced synthetic activity of the mammary tissue (Harmon, 1994). However, despite observing an increase in SCC in the samples taken after biopsy (Table 2), this could only explain the reduction on the protein percentage found after biopsy, being incompatible with the increase in lactose percentage observed after biopsy.

### **Conclusions**

The method for mammary gland biopsy using only a biopsy needle can be conducted and repeated on the same animal using a quick and efficient procedure when it comes to morphology and gland function assessment, without large negative effects to production, milk composition and animal health. In addition, increased milking frequency did not minimize the negative impact of the biopsy procedure on udder health.

### **Acknowledgments**

This research was funded by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Minas Gerais, Brazil; CVZ APQ 0845/11). The authors are also thankful the Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais and EPAMIG farm in Felixlândia for providing the facilities and labour necessary to execute this study.

### **References**

- Annen EL, Fitzgerald AC, Gentry PC, McGuire MA, Capuco AV, Baumgard LH and Collier RJ 2007. Effect of continuous milking and bovine somatotropin supplementation on mammary epithelial cell turnover. *Journal of Dairy Science* 90, 165-183.
- Akers RM, Capuco AV and Keys JE 2006. Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livestock Science* 105, 44-49.
- Dahl GE, Wallace RL, Shanks RD and Lueking D 2004. Hot topic: Effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *Journal of Dairy Science*. 87, 882-885.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T and Webster G 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72, 68-78.

- Farr VC, Stelwagen K, Cate LR, Molenaar AJ, McFadden TB and Davis SR 1996. An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. *Journal of Dairy Science* 79, 543-549.
- Hale SA, Capuco AV and Erdman RA 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *Journal of Dairy Science* 86, 2061-2071.
- Ingvartsen KL, Dewhurst RJ and Friggens NC 2003. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that cause production disease in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*. 83, 277-308.
- Harmon RJ 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* 77, 2103-2112.
- Holst BD, Hurley WL and Nelson DR 1987. Involution of the Bovine Mammary Gland: Histological and Ultrastructural Changes. *Journal of Dairy Science* 70, 935-944.
- Marx GD and Caruolo EV 1963. Method of biopsy of the mammary gland of cows and goats. *Journal of Dairy Science* 46, 576-579.
- McDougall S, Supré K, De Vliegher S, Haesebrouck F, Hussein H, Clausen L and Prosser C 2010. Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in early lactation in dairy goats. *Journal of Dairy Science* 93, 4710-4721.
- Miller N, Delbecchi L, Petitclerc D, Wagner GF, Talbot BG and Lacasse P 2006. Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *Journal of Dairy Science* 89, 4669-4677.
- Ollier S, Leroux C, De la Foye A, Bernard L, Rouel J and Chilliard Y 2009. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *Journal of Dairy Science* 92, 5544-5560.
- Smith KL 1996. Standards for somatic cell in milk physiological and regulatory. *Mastitis Newsletter, Newsletters of the International Dairy Federation* 21, 7-9.
- Smith JW, Ely LO, Graves WM and Gilson WD 2002. Effect of milking frequency on DHI performance measures. *Journal of Dairy Science* 85, 3526-3533.
- Shields SL, Rezamand P, Sevier DL, Seo KS, Price W and McGuire MA 2011. Effects of increased milking frequency for the first 21 days *post partum* on selected measures of

- mammary gland health, milk yield and milk composition. *Journal of Dairy Research* 78, 301-307.
- Soberón F, Lukas JL, Van Amburgh ME, Capuco AV, Galton DV and Overton TR 2010. Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 565-573.
- Sorensen MT, Nørgaard JV, Theil PK, Vestergaard M and Sejrsen K 2006. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 4632-463.
- Tsioulpas A, Grandison AS and Lewis MJ 2007. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of Dairy Science* 90, 5012-5017.
- VanKlombenberg MK, McMicking HF and Hovey RC 2012. Technical note: A vacuum-assisted approach for biopsying the mammary glands of various species. *Journal of Dairy Science* 95, 243-246.
- Wall EH and McFadden TB 2007. The milk yield response to frequent milking in early lactation of dairy cows is locally regulated. *Journal of Dairy Science* 90, 716-720.
- Wright JB, Wall EH and McFadden TB 2013. Effects of increased milking frequency during early lactation on milk yield and udder health of primiparous Holstein heifers. *Journal of Animal Science* 91, 195-202.

**Table 1** Effect of two (2X) ou four (4X) milkings daily during the first 21 days of lactation, followed by twice a day milking until 28 days of lactation on frequency of occurrence of hematoma, intramammary bleeding, blood clots, edema, areas of fibrosis, mastitis and duration in days (d) of intramammary bleeding, blood clots and edema of F1 Holstein × Zebu cow after the biopsy procedure

Udder changes	2X	4X	SEM	P-value
<i>Frequency of occurrence</i>				
Hematoma	6.0	5.0	-	0.5
Intramammary bleeding	46.0	31.0	-	0.8
Blood clots	40.0	29.0	-	0.9
Edema	22.0	19.0	-	0.3
Areas of fibrosis	2.0	3.0	-	1.0
Mastitis	5.0	5.0	-	0.7
<i>Duration (d)</i>				
Intramammary bleeding	3.4	3.7	0.3	0.6
Blood clots	2.3	3.0	0.2	0.9
Edema	1.3	1.8	0.2	0.9

**Table 2** Effect of biopsy procedure on body weight, milk composition, milk somatic cell count (SCC), and body condition score (BCS) of F1 Holstein × Zebu milking cows before and after the biopsy procedure

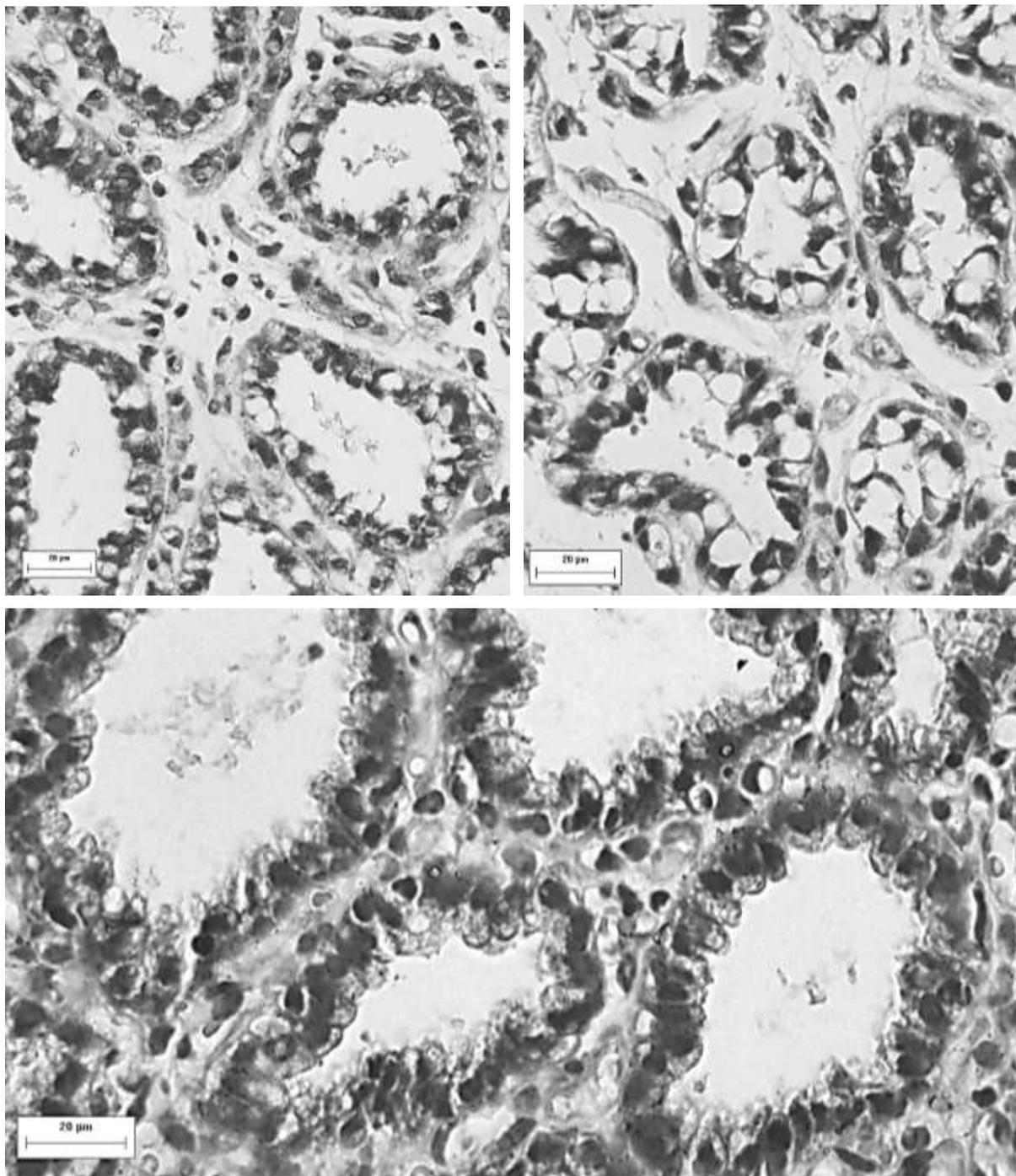
Variable	Before biopsy	After biopsy	SEM	P-value
Body weight, kg	544.84	540.52	8.31	0.04
BCS	3.00	3.00	-	0.90
SCC, × 1000 cells/mL	197.41	358.23	54.00	0.04
Milk composition, %				
Fat	4.17	4.20	0.08	0.72
Protein	3.40	3.24	0.03	0.01
Lactose	4.52	4.60	0.03	0.01

**Table 3** Effect of biopsy procedure on day two, seven, 14, 21, 28 of lactation on estimated average milk production (kg/d) of F1 Holstein × Zebu milking cows one day before biopsy (-1), on the day of biopsy (0) and five consecutive days after biopsy procedure (1, 2, 3, 4, 5)

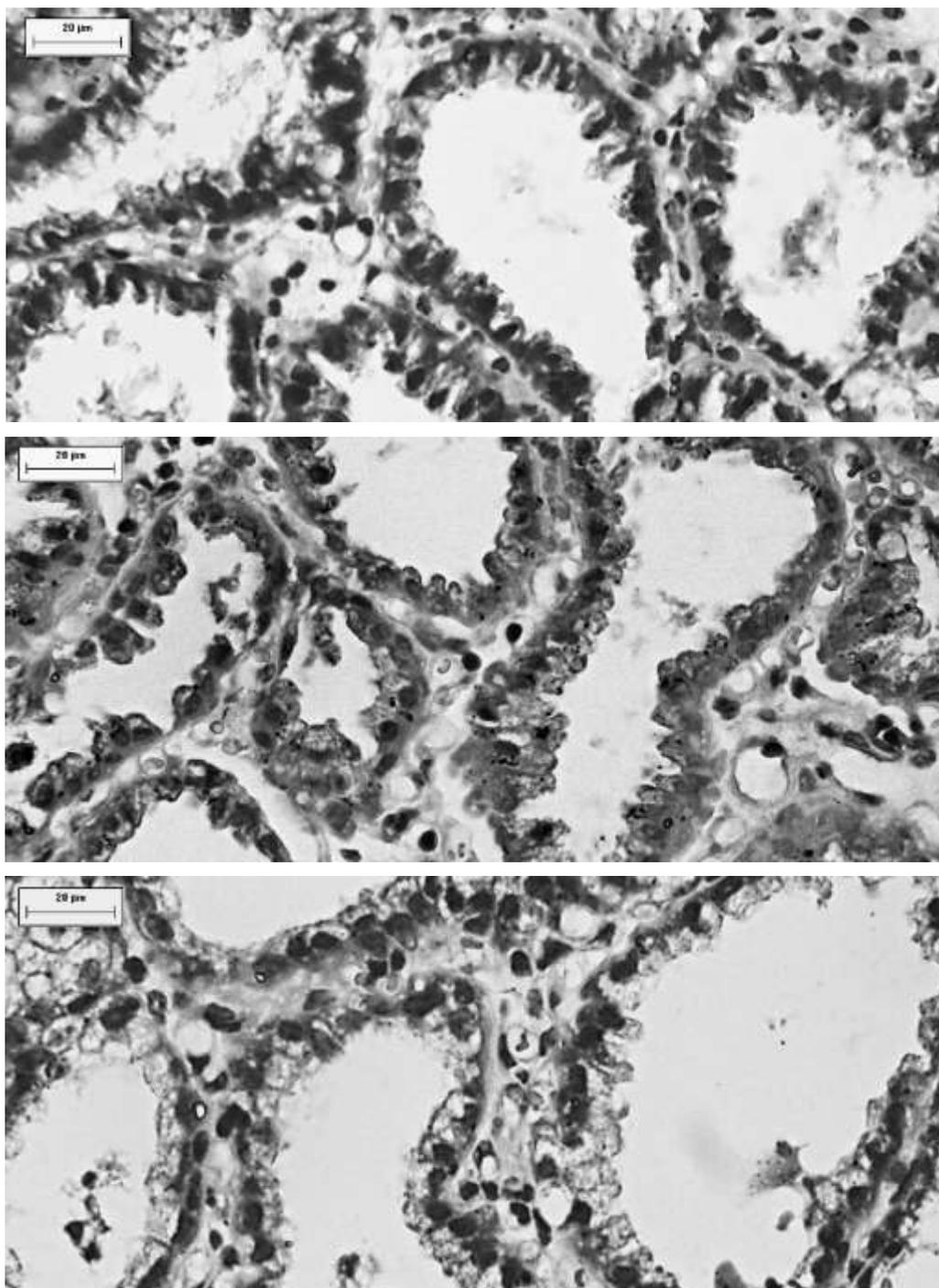
Days PP	Milk yield relative to the day of the biopsy (kg/d)							SE M	P- value
	-1	0	1	2	3	4	5		
2	-	16.05 <sup>b</sup>	12.76 <sup>c</sup>	17.84 <sup>ab</sup>	19.27 <sup>a</sup>	19.95 <sup>a</sup>	-	0.51	0.01
7	19.95	18.62	19.91	19.28	19.44	21.35	20.79	0.34	0.92
14	20.79 <sup>a</sup>	20.39 <sup>a</sup>	18.63 <sup>b</sup>	18.72 <sup>b</sup>	20.35 <sup>a</sup>	20.06 <sup>a</sup>	22.08 <sup>a</sup>	0.39	0.01
21	20.13 <sup>ab</sup>	21.68 <sup>a</sup>	16.96 <sup>b</sup>	18.85 <sup>ab</sup>	19.66 <sup>ab</sup>	19.66 <sup>ab</sup>	18.28 <sup>ab</sup>	0.36	0.02
28	20.32	18.63	16.37	17.65	-	-	-	0.52	0.07

<sup>a,c</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$ .

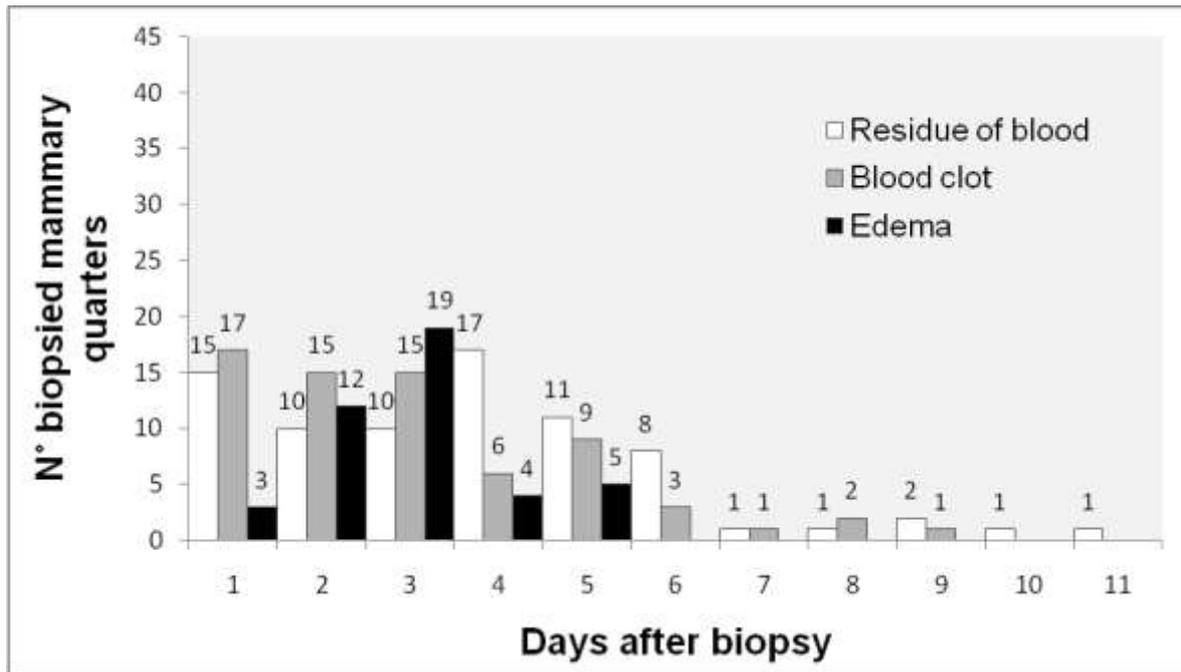
PP = *postpartum*.



**Figure 1** Micrograph of (A) alveoli with poorly differentiated cells at d 2 after calving, (B) engorged alveoli at d 2 after calving, and (C) alveoli with poorly differentiated cells at d 7 after calving, from mammary tissue samples obtained from a single cow milked twice/d until 28 DIM.



**Figure 2** Micrograph of alveoli and cells of mammary tissue sample obtained at (A) 14, (B) 21, and (C) 28 d after calving from cows milked two or four times/d until 21 DIM and twice/d from 22 to 28 DIM.



**Figure 3** Distribution of number of biopsied quarters by days after biopsy for quarters that presented milk with blood, milk with blood clots, or edema.

## CAPÍTULO II

### **Efeito do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre a produção de leite, a proliferação e a apoptose celular mamária em vacas leiteiras**

**J. A. M. Lima\*, J. R. M. Ruas†, A. C. Vasconcelos§, A. M. Q. Lana\*, H. M. Saturnino\*, R. B. Reis\*, S. G. Coelho\*<sup>1</sup>**

\*Department of Animal Science,

§Department of General Pathology, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 6627 Avenida Antônio Carlos POBox 567, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil; CEP: 30123-970

†Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG

<sup>1</sup>Corresponding author: sandragesteiracoelho@gmail.com

**RESUMO:** O aumento da frequência de ordenhas (AFO) no início da lactação resulta em estímulo positivo na produção de leite, que se mantém parcialmente ao longo de toda a lactação. Contudo, os efeitos do AFO sobre a renovação celular ainda não foram completamente entendidos. O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do AFO durante o início da lactação sobre a produção, composição e contagem de células somáticas (CCS) do leite, e avaliação da histomorfometria, proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias. Quatorze vacas mestiças F1 Holandês x Zebu (HxZ) foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. O grupo controle foi ordenhado duas vezes ao dia (2X) durante toda lactação, e o grupo submetido ao AFO foi ordenhado quatro vezes (4X), a partir do segundo dia (d) da lactação até 21 d e duas ordenhas do dia 22 até 210 da lactação. A produção, composição e CCS foram avaliadas diariamente do 4 d até 30 d e quinzenalmente até 210 d após o parto. Biopsias mamárias foram realizadas nos dias dois, sete, 14, 21, 28 após o parto. Durante os 21 dias da lactação o grupo 4X produziu 2,6 kg/d  $\pm$  0,20 a mais de leite do que o grupo controle ( $P < 0,05$ ) após este período e ao longo da dos 210 dias da lactação manteve produção de leite semelhante a do grupo controle até ( $P > 0,05$ ). Nos três períodos avaliados não houve diferença na percentagem de gordura, proteína e lactose ( $P > 0,05$ ). No período do AFO a CCS, o rendimento de gordura e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foram maiores em 4X do que 2X ( $P < 0,05$ ), não havendo diferença após este período e ao longo da dos 210 dias da lactação ( $P > 0,05$ ). A proliferação e apoptose em células epiteliais e do estroma mamário, bem como a proporção de tecido mamário ocupado por alvéolos, estroma, epitélio e lúmen não foram afetadas pelo AFO ( $P > 0,05$ ). Mudanças na frequência de ordenha durante o início da lactação não altera a dinâmica população de células.

**Palavras-chaves:** apoptose, histomorfometria, número de ordenha, proliferação

## INTRODUÇÃO

A curva de lactação pode ser manipulada por diferentes meios, sendo as mudanças de manejo, como o maior número de ordenhas (AFO), um dos principais métodos utilizados para aumentar a produção de leite. Tradicionalmente, o aumento do número de ordenhas é empregado ao longo de toda a lactação e seus efeitos sobre a produção de leite foram intensamente estudados, principalmente durante os anos 80 e 90, sendo estabelecido a partir de então correlação positiva entre maior frequência de ordenhas e produção de leite. No entanto, estudos desenvolvidos nas últimas duas décadas têm relatado aumento na produção de leite em vacas ordenhadas mais frequentemente nos primeiros dias da lactação, não apenas durante o período de aumento da frequência de ordenha (AFO), mas também com a persistência deste efeito após as vacas retornarem ao menor número de ordenhas (Bar-Peled et al., 1995; Hale et al., 2003; Wall e McFadden, 2007; Soberón et al., 2011).

A produção de leite e a persistência da lactação são influenciadas pelo número de alvéolos, número de células dentro dos alvéolos e pelo grau de diferenciação destas células ao longo da lactação, os quais são determinados pelo balanço entre proliferação e apoptose celular e pela atividade celular, respectivamente (Boutinaud et al., 2004). De acordo com Hale et al. (2003) e Murney et al. (2015), a maior produção de leite observada com o aumento da frequência de ordenhas no início da lactação, bem como sua manutenção, está relacionada ao aumento da proliferação celular, sendo esta, provavelmente, regulada por mecanismos locais sensíveis ao AFO. A regulação local deste efeito, mesmo não identificados os mecanismos responsáveis, tem sido demonstrada em estudos em que foram adotados número de ordenhas diferentes em cada metade do úbere de um mesmo animal (Wall e McFadden, 2007; Sorensen et al., 2001; Stelwagen e Knight, 1997). Algumas pesquisas investigaram o efeito do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre a proliferação e apoptose (Wall et al., 2013; Wall et al., 2010; Soberón et al., 2010; Hale et al., 2003). Embora o aumento do número de células mamárias secretoras possa explicar o efeito a longo prazo na produção de leite, estudos demonstraram efeitos divergentes sobre as taxas de proliferação e apoptose.

Além de seus efeitos sobre a produção de leite, estudos com AFO no início da lactação, tem demonstrado resultados controversos quanto aos seus benefícios sobre a saúde do úbere. Segundo Smith et al. (2002), Dahl et al. (2004) e Wright et al. (2013), este manejo de ordenha reduziu a CCS, enquanto outros autores relataram a ausência de efeito do aumento da

frequência de ordenha no início da lactação tanto sobre a CCS quanto sobre a saúde da glândula mamária (Hale et al., 2003; Wall e McFadden, 2007a; Sheilds et al., 2011).

Apesar de diversas hipóteses terem sido propostas para explicar o efeito do AFO no início da lactação sobre a persistência da lactação, a exata relação entre este manejo de ordenha e a dinâmica celular ainda não foi completamente estabelecida. Os objetivos do presente estudo foram determinar os efeitos do AFO no início da lactação sobre a produção, composição e saúde do úbere, durante e após o período do AFO, bem como investigar o potencial mecanismo celular responsável pela persistência parcial do efeito do AFO sobre a produção de leite ao longo de toda a lactação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais, Tratamentos e Amostragem*

Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (58/2011 CETEA/UFMG). O estudo foi conduzido na Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada em Felixlândia, Minas Gerais, Brasil, durante o período de junho de 2013 a julho de 2014. Vacas multíparas ( $n = 14$ ) mestiças F1 HxZ de terceira ou mais lactações ( $6,25 \pm 2,34$ ) foram distribuídas a dois grupos de forma homogênea em relação à ordem de parto, produção e CCS da lactação anterior, composição genética e dia do parto. Os grupos consistiam em: 2X: vacas ordenhadas duas vezes ao dia a partir do segundo dia após o parto ( $n = 7$ ) e 4X: vacas ordenhadas quatro vezes ao dia do d 2 a 21 pós-parto (PP) ( $n = 7$ ). Após o 21 d da lactação, todas as vacas foram ordenhadas 2X até 210 d da lactação.

O manejo de ordenha no período de AFO ocorreu da seguinte forma: todas as vacas foram ordenhadas as 0600 e 1400 h, com as vacas do grupo 4X sendo sempre as primeiras, seguida das do grupo 2X e o restante dos animais da fazenda. No grupo 4X, as duas ordenhas adicionais ocorreram as 0930 e 1530 h (Figura 1). Os bezerros foram levados até a sala de ordenha para fazer a sucção do leite antes da colocação das teteiras, para estimular a ejeção do leite, e em seguida foram retirados da mesma. Após o término da última ordenha do dia, as vacas foram alojadas junto com os bezerros por período de uma hora para que estes mamassem o leite residual.

Durante todo o período experimental, todas as vacas receberam a mesma dieta à vontade, que consistiu no pastejo de Tifton e Brachiaria e, no período sem chuvas, foram

suplementadas com silagem de milho misturada a 0,2kg vaca/dia de concentrado nitromineral (59% uréia, 20% sal mineral, 12,5% sulfato de amônia, 6,3% calcário e 2,2% fosfato bicálcico). Concentrado comercial (22% de proteína bruta e 85% de NDT; SOMA LEITE SAE 22, SOMA Nutrição animal, Rio Pomba, MG, Brasil) foi fornecido, durante a ordenha da manhã e da tarde, em cochos individuais de acordo com a produção de leite, numa proporção de 1 kg de concentrado para cada 3 kg de leite produzidos até 30 dias após o parto e de 1 kg para cada 3 kg, a partir dos primeiros 5 kg de leite produzidos após 30 dias da lactação. Água e sal mineralizado ficaram disponíveis à vontade durante todo o período experimental.

As pesagens de leite e as coletas de amostras para composição e CCS foram realizadas, diariamente, do 4° d até 30° d da lactação e a partir desta data a cada 15 dias até 255 d da lactação. A produção de leite foi mensurada com a utilização de coletores Milk Meter-Mark V ( $\alpha$ -Laval Agri; Jaguariúna-SP, Brasil), e posteriormente, corrigida para 3,5% de gordura (LCG 3,5%) pela equação citada por Soberón et al. (2010). As amostras de leite foram coletadas nas ordenhas da manhã e tarde, identificadas, refrigeradas a 4°C e analisadas pelo Laboratório de Análise e Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para a composição do leite (percentagem de gordura, proteína, lactose) e CCS por espectroscopia e citometria de fluxo (Bentley Combi System 2300, Bentley Instruments Incorporated, Chaska, EUA), respectivamente.

### ***Biopsia mamária***

As biopsias mamárias foram realizadas na região medial do quarto mamário, de forma alternada entre os quatro quartos, nos dias dois, sete, 14, 21, 28 após o parto. No grupo 2X as biopsias foram realizadas imediatamente após a ordenha das 06:00 h, enquanto no grupo 4X após a ordenhas das 09:30 h (Figura 1). Os animais foram contidos em tronco e sedados pela administração intramuscular de 1,5 ml de Acepromazina 1% (0,03 mg/kg, Acepran; VETNIL - Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda, Louveira, SP, Brasil). Áreas de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>, sobre uma das glândulas mamárias sem vasos sanguíneos subcutâneos visíveis foram demarcadas, tricotomizadas e realizada a antisepsia com solução tópica de iodopovidona 10% e álcool 70%. A pele e o tecido mamário foram anestesiados via injeção subcutânea (1 mL) e intramamária superficial (2,5 mL) de anestésico local cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor, 2% (20mg/ml, Xylestesin; Cristália – Produtos

Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil). Uma pequena incisão foi realizada na pele, com agulha 40 x 16, para a introdução da agulha de biopsia Biocore II, (12 g x 12 cm; MMdiagnóstika; São Paulo, SP, Brasil) e posterior realização da extração do tecido, em apenas um local por quarto mamário. Caso não fosse obtido tecido mamário, a agulha era novamente introduzida para extração visual de quantidade adequada de tecido.

Após as biopsias, no local da incisão foi aplicado spray cicatrizante de sulfadiazina prata (Bactrovet Prata AM; König, Avellaneda, BS, Argentina). Não foi utilizado nenhum medicamento intramamário ou intravenoso como forma de prevenção de infecções. Em caso de diagnóstico positivo para mastite foi efetuado o tratamento que consistiu na administração de antibiótico via intramamária (150 mg de sulfato de gentamicina, Mastifin; Grupo Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) por três dias consecutivos.

### ***Procedimentos histológicos***

Os tecidos obtidos foram fixados em formaldeído (neutro e tamponado a 10%) por 8h e em seguida transferidos para álcool 70%, sendo posteriormente desidratados em uma série de concentrações de álcool (80% e 90%; 1h e 100%; 2h), clarificados em xilol (5min), infiltrados em parafina líquida (56-58°C; 5min) e incorporados em bloco de parafina. Os blocos foram seccionados em dois cortes com 4µm de espessura (Micrótomo, Leica RM 2255) por lâmina, num total de três lâminas. Uma lâmina foi corada pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e montada com o meio de montagem (Etellan - Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para a fixação da lamínula 24 x 40 mm (Corning, NY, EUA) e posteriormente observada ao microscópio óptico para avaliação histomorfométrica, enquanto as outras duas foram utilizadas para imunohistoquímica.

### ***Imunohistoquímica***

#### ***TUNEL***

A reação de TUNEL, utilizada para a detecção de apoptose, marca *in situ* nas células a introdução de nucleotídeos nos segmentos terminais dos fragmentos do genoma, utilizando anticorpos conjugados com peroxidase. As células apoptóticas exibem fragmentação internucleossômica do genoma por ação de uma endonuclease. Utilizou-se kit comercial (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem®, EUA). Lâminas pré-tratadas com gelatina microbiológica (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA), contendo as

secções de glândulas mamárias biopsiadas foram processadas de acordo com as instruções fornecida pelo fabricante.

Após desparafinização e hidratação, os cortes dos tecidos mamários foram incubados com proteinase K (20  $\mu\text{g/ml}$  de TBS) durante 6 min. As lâminas foram mergulhadas em solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 9% por 6 min, para eliminar a atividade da peroxidase endógena, e então lavadas duas vezes (5 min) em solução tampão Tris-pH 7,6 (TBS) (Trizma Base<sup>®</sup> - Sigma Chemical Co, USA). Os cortes foram incubados em solução tampão de equilíbrio por 20 min, e em seguida pela enzima (transferase de desoxinucleotídeos terminal) por 2 h em câmara úmida a 37°C. Os cortes foram lavados com tampão paralisador (5 min), TBS (5 min), tampão bloqueador (10 min) e incubados com anti-digoxigenina-peroxidase (conjugado) durante 1 h à temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em TBS (5 min) e, posteriormente, os cortes foram incubados com tetra-cloridrato de 3,5-diaminobenzidina (DAB) até o desenvolvimento de cor, aproximadamente, 5 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente e, em seguida, contrastados com 30  $\mu\text{l}$  do corante Methyl Green em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a contra-coloração as lâminas foram mergulhadas em álcool absoluto e em seguida em xilol. O excesso de xilol foi removido e as lâminas foram montadas com descrito anteriormente.

#### *Ki-67*

Células em proliferação expressam o antígeno nuclear para proliferação Ki-67 durante todas as fases da mitose ( $G_1$ , S,  $G_2$  e M) com exceção da fase de repouso ( $G_0$ ) (Duchrow et al., 2001). Os cortes de tecidos em lâminas pré-tratadas com gelatina microbiológica (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) permaneceram de um dia para o outro em estufa 37°C e em seguida foram desparafinizados em xilol e rehidratados em uma série de etanóis diluídos. Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada em solução tampão citrato (Target Retrieval Solution; 10mM; pH = 6,0; DAKO, Corporation, Carpinteria, CA, EUA) em panela de pressão tipo pascal (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA) sob temperatura de 125°C e pressão de 25 psi por 2 min. As lâminas permaneceram nesta solução por mais 30 minutos até o seu resfriamento, em seguida lavadas em PBS (2 x 5min) e mergulhadas em solução de peróxido de hidrogênio a 9% (2 x 15 min). Os cortes de tecido foram incubados com solução bloqueadora (Ultra V Block – Thermo Scientific, USA) durante 10 minutos, para bloquear ligações inespecíficas, seguido por incubação pelo anticorpo primário na diluição de 1:100

(MIB, monoclonal anti-humano Ki-67; DAKO) por 60 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS (2 x 5min), as lâminas foram então incubadas por 30 min à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-mouse IgG biotina (Vectastain, Vector Lab., CA, EUA) na diluição de 1:100, lavadas em PBS (2 x 5 min) e em seguida incubadas em câmara úmida por 30 minutos com o complexo avidina/biotina (Streptococcus ABC, Vectastain, Vector Lab CA, EUA). Após lavagem em PBS (2 x 5 min), os cortes foram incubados com DAB até o desenvolvimento de cor, lavados em água corrente, contrastados com hematoxilina por 5 segundos, desidratados em etanol a diversas diluições, clarificados com xilol e realizada a montagem das lâminas.

### ***Quantificação da imunohistoquímica e histomorfometria***

Todas as lâminas coradas com HE e as que foram submetidas à imunohistoquímica foram marcadas com um código identificador antes de serem visualizadas em microscópio, para garantir resultados imparciais e posteriormente analisadas pelo mesmo avaliador. As lâminas coradas com HE foram visualizadas em microscópio usando objetiva de 40x para a captura do número máximo de imagens em câmera digital Olympus Q Color S adaptada a Microscópio Olympus BX-43, e utilizado o software de captura Image Pro-Plus versão 7.0. Estas imagens foram utilizadas para avaliação histomorfométrica do tecido mamário pela determinação das proporções em porcentagem de área (%) ocupadas pelo epitélio celular mamário (ECM), lúmen, estroma e alvéolos (ECM e lúmen mamário), realizadas pelo mesmo software de captura das imagens.

Avaliações de apoptose e proliferação foram realizadas pela quantificação de células mononucleares positivas à reação de TUNEL e Ki-67 num total de 500 células para estroma. No ECM foram consideradas as células positivas para TUNEL encontradas no epitélio e lúmen, em dez campos para cada amostra, num total de 1000 células para o ECM por corte histológico. As lâminas foram visualizadas em microscópio usando objetiva de 4x para selecionar campos aleatoriamente. Uma vez selecionado o campo, a objetiva de 40x foi usada para a captura das imagens digitais para contagem das células como descrito para as lâminas em HE. O resultado foi expresso em índice apoptótico (IA) e proliferação (IP), obtido pela fórmula: Índice apoptótico ou de proliferação = (n° de células positivas para TUNEL ou Ki-67/ n° de células totais) x 100.

### ***Análises estatísticas***

As análises estatísticas foram avaliadas como medida repetida no tempo por meio de ANOVA utilizando o procedimento Mixed do software SAS (versão 9.4; Instituto SAS Inc., Cary, NC). O modelo incluiu os efeitos fixos do tratamento (2X ou 4X), do tempo (dias da lactação), da interação entre tempo e tratamento, e os animais como efeito aleatório. Para a produção e composição do leite este modelo foi testado separadamente entre os tratamentos para os diferentes períodos avaliados (4-21d, 22-210d e 4-210d). O padrão de distribuição normal e homogeneidade das variâncias foram avaliados para todas as variáveis. Os dados relativos à CCS foram transformados pela função logarítmica e IP e IA pela função raiz quadrada. A comparação das médias entre tratamentos e dias foi realizada utilizando o teste de Tukey-kramer, a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Produção e composição do leite**

No quarto dia da lactação, tanto o grupo controle quanto o submetido ao AFO produziram quantidades semelhantes de leite ( $P > 0,05$ ; Figura 2A e B; Tabela 1). Durante AFO, a produção de leite do grupo 4X aumentou gradualmente e nos primeiros 21 dias pós-parto os animais produziram 2,6 kg/d a mais de leite do que o grupo controle (20,55 kg/d vs. 17,95;  $P < 0,05$ ). Fernandez et al. (2004) relataram valor próximo ao encontrado neste experimento durante o período de AFO, com aumento de 3 kg/d para vacas submetidas a 4X em comparação com 2X. No entanto, estas respostas para produção de leite são consideradas inferiores as descritas por outros autores. Bar-Peled et al. (1995) observaram aumento na produção de leite de 7,3 kg/d durante os primeiros 42 dias para vacas ordenhadas seis vezes ao dia comparadas com três ordenhas diárias; Hale et al. (2003) relataram aumento agudo de 8,8 kg/d na produção de leite durante os 21 dias de AFO para vacas ordenhadas 4X comparadas com 2X, e Lima et al. (2011) relataram em vacas F1 HxZ ordenhadas 4X nos 21 dias pós-parto aumento de 4 kg/d de leite em relação ao grupo controle (2X). No presente estudo o procedimento de biopsia pode ter limitado a capacidade máxima de resposta para a produção de leite com o aumento da frequência de ordenha.

Após período de AFO a produção de leite do grupo 4X apresentou queda, alcançando valores semelhantes ao grupo 2X (14,71 vs. 14,70 kg/d;  $P > 0,05$ ; Tabela 1). A produção de leite média ao longo dos 210 dias não foi influenciada pelo maior número de ordenhas no

início da lactação (15,21 vs. 14,98 kg/d;  $P > 0,05$ ; Tabela 1). O grupo 4X encerrou a lactação com média de produção total de 3146 kg de leite, e o 2X de 3096 kg de leite, o que corresponde a aumento de 1,62% da produção total de leite. O pico da produção de leite ocorreu no dia 21 da lactação para o grupo 4X e no dia 19 para o grupo controle, ou seja, por volta do final da terceira semana da lactação para os dois grupos, com média de produção de leite de 23,5 e 20,1 kg/d, respectivamente.

Com exceção de um relato negativo (VanBaale et al., 2005) e quatro estudos que não observaram diferença (Fernandez et al., 2004; Blevins et al., 2006; Eslamizad et al., 2010; Soberón et al., 2010), para a maior parte dos pesquisadores o AFO no início da lactação aumenta a produção de leite mesmo após retornar ao menor número de ordenhas, caracterizando efeito residual sobre a persistência da lactação. Embora, neste estudo a ausência do efeito AFO sobre a persistência da lactação não fosse esperado, Soberón et al. (2010) apresentaram resultados semelhantes ao avaliar a produção de leite de vacas submetidas ao mesmo protocolo de frequência de ordenha e biopsias mamárias. Estes autores sugeriram que talvez o procedimento de biopsia realizado duas vezes, nos dias 21 e 75 da lactação, possa ter influenciado de forma negativa os efeitos sobre a resposta residual. O que reforça a ocorrência deste fato no presente estudo foi a realização do procedimento de biopsia cinco vezes ao longo do início da lactação e com curto espaço de tempo entre eles, em média 6,6 dias entre cada procedimento. Além disso, neste estudo o período após AFO coincidiu com o início do pastejo, logo a falta de efeito do AFO sobre a persistência da lactação pode ser reflexo da insuficiente ingestão de energia para suprir a demanda da produção de leite em uma dieta baseada a pasto e com fornecimento moderado de concentrado. Uma vez que a maioria das pesquisas foi realizada com vacas de alta produção e alimentadas com dieta total (Bar-Peled et al., 1995; Hale et al., 2003; Dahl et al., 2004). Contudo, a razão para ausência de efeito residual sobre a persistência da lactação não é clara.

Durante os três períodos avaliados (4-21, 22-210, 4-210 dias da lactação) não foram observado efeito do AFO sobre a percentagem de gordura, proteína e lactose ( $P > 0,05$ ; Tabela 1). A CCS do leite foi menor no grupo 4X do que no grupo 2X, durante o período de AFO, com manutenção desta resposta ao longo dos 210 dias da lactação (Tabela 1). Após as três semanas de tratamento, não houve diferença entre os grupos para a CCS ( $P > 0,05$ ). O aumento da frequência de ordenha geralmente altera a composição, especialmente em relação à gordura e proteína. Segundo Erdman e Varner (1995), é esperada redução da percentagem

dos componentes do leite em resposta a maiores frequências de ordenha devido o efeito de diluição pela maior produção de leite. No entanto, isto não foi observado no presente trabalho. Assim, como o observado por Soberón et al., (2010) e Wall e McFadden, 2007b, durante o AFO, a percentagem de gordura e proteína não foi diferente entre os grupos 2X e 4X, apesar de numericamente maior para este último grupo em todos os períodos avaliados. Os resultados para lactose são semelhantes aos reportados por Hale et al. (2003) que não detectaram diferença na percentagem de lactose quando aumentou a frequência de ordenhas de duas para quatro durante o início da lactação.

De acordo com Ingvarstsen et al. (2003) o aumento na exigência metabólica associada a maior produção de leite em resposta a frequência de ordenha possibilita depressão do sistema imune afetando negativamente a saúde da glândula mamária, principalmente durante o início da lactação. No entanto, neste estudo a CCS foi menor em 4X durante o AFO e lactação total, quando comparada ao grupo 2X. Estes resultados estão de acordo com estudos similares que relataram a ausência (Bar-Peled et al., 1995; Hale et al., 2003; Wall e McFadden, 2007a) ou diminuição (Smith et al., 2002; Dahl et al., 2004; Wright et al., 2013) da CCS, sugerindo que o aumento da frequência de ordenha não apresenta efeitos adversos e pode ter benefícios sobre a saúde do úbere, avaliada pela CCS.

A produção de LCG 3,5% e o rendimento gordura foram maiores para o grupo submetido ao AFO durante os 21 primeiros dias da lactação ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2). Após o período de AFO e durante os 210 dias da lactação, não houve diferença entre o rendimento dos componentes do leite e da produção de leite corrigido para 3,5% de gordura ( $P > 0,05$ ). Shields et al. (2011) também relataram maior rendimento de gordura em resposta a frequência de ordenha. Porém estes resultados contrastam com os de Hale et al. (2003) que não observaram mudanças no rendimento de gordura, proteína e lactose em vacas submetidas ao AFO. A maior produção de leite ajustada para 3,5% de gordura e aumento do rendimento de gordura encontradas neste trabalho durante o AFO e lactação completa podem ser consequência do aumento da produção de leite em resposta a frequência de ordenha nos primeiros 21 dias de lactação.

A inconsistência nos relatos associados com a composição e CCS podem ser resultado da variação no tempo e método de amostragem entre os estudos. Mais pesquisas devem ser realizadas para melhor compreender os mecanismos responsáveis pelas alterações da

composição do leite e a CCS em resposta ao aumento da frequência de ordenha, devido ao seu potencial impacto para o produtor.

### ***Proliferação e apoptose celular mamária***

O índice de proliferação celular no epitélio e no estroma mamário não foi alterado pela frequência de ordenhas e nem pela interação entre este fator com os dias da lactação ( $P > 0,05$ ; Figura 3, 4A e 5A). Já os dias de lactação apresentaram influência sobre a expressão de células marcadas pelo antígeno Ki-67 tanto para o epitélio quanto para o estroma mamário ( $P < 0,05$ ). No epitélio celular mamário (ECM) o índice de proliferação celular apresenta pico no segundo dia da lactação com média de 2,12% de células epiteliais mamárias expressando o antígeno Ki-67. Nos dias sete e 14 da lactação, o índice de proliferação cai para aproximadamente metade do valor observado no dia dois e na semana seguinte torna a apresentar outra redução que se mantém até o dia 28 da lactação (Figura 4B). No estroma mamário a porcentagem de células positivas para o antígeno Ki-67 foi maior durante as duas primeiras semanas da lactação seguida por redução a partir do dia 21 e manutenção destes valores até o dia 28 da lactação (Figura 5B). Segundo Annen et al. (2007), a porcentagem de células marcadas pelo antígeno Ki-67 apresenta redução numérica com o avançar do início da lactação, com diminuição entre o primeiro (1,17%), sétimo (0,67%) e 20° (0,35%) dia da lactação. Estes resultados sugerem que elevado índice de proliferação celular mamária evidente durante a gestação e período seco não continua no início da lactação. Mudanças hormonais e de seus receptores que ocorrem durante a lactogênese e parto, estimulando a diferenciação celular e início da produção de leite, talvez possam estar relacionadas com a redução da taxa de proliferação observada com o avançar da lactação. A ativação das células-tronco, células com capacidade de se proliferar, é provavelmente mediada por mecanismos parácrinos ou autócrinos relacionados a receptores de estrogênio (Capuco e Ellis, 2005; Lamote et al., 2004) e progesterona (Lamote et al., 2004). No entanto, durante a lactação as células mamárias apresentam baixa expressão de RNAm para estes receptores quando comparada com o período seco (Schams et al., 2003), o que justifica a diminuição progressiva da proliferação celular no início da lactação.

A porcentagem de células epiteliais mamárias (CEM) em apoptose foi em média de  $0,14 \pm 0,026$  e  $0,17 \pm 0,021$  para os grupos 2X e 4X, respectivamente, não sendo observados efeito da frequência de ordenha e da interação deste fator com os dias da lactação ( $P > 0,05$ ; Figura

6 e 7A). A percentagem de CEM em apoptose foi influenciada pelos dias da lactação ( $P < 0,05$ ). No segundo dia da lactação foi observada a maior taxa de apoptose (0,3%), enquanto que os dias sete, 14, 21 e 28 apresentaram taxas semelhantes e menores que a do segundo dia da lactação, média de 0,12% ( $P > 0,05$ ; Figura 7B). Assim como o presente estudo, elevado índice de apoptose também foi observado no início da lactação, no primeiro (0,56%) e sétimo (0,67) (Annen et al., 2007) e 14º dia após o parto (Aproximadamente 0,3% - Capuco et al., 2001; 0,76% - Sorensen et al., 2006). No entanto, com exceção dos resultados obtidos por Capuco et al. (2001) estas respostas apresentaram valores superiores aos descritos no presente estudo. Várias hipóteses foram sugeridas para explicar a maior proporção de apoptose no início da lactação, dentre elas destacam-se a dificuldade em diferenciar leucócitos apoptóticos que migraram para o interior do epitélio de células em apoptose no epitélio mamário (Capuco et al., 2001), e a possível eliminação de células que não se diferenciaram durante a lactogênese (Sejrsen et al., 2003) ou que, durante o processo de proliferação, apresentaram erro na replicação do DNA (Alberts et al., 2002). A percentagem de células do estroma mamário em apoptose foi em média de  $0,11 \pm 0,020$  e  $0,12 \pm 0,022$  para os grupos 2X e 4X, respectivamente, não sendo observado efeito da frequência de ordenha, dias da lactação e nem da interação entre estes fatores ( $P > 0,05$ , Figura 8).

Estudos com a utilização da metodologia de ordenhas unilaterais tem demonstrado que os mecanismos que controlam o aumento da produção de leite e seus efeitos residuais são regulados localmente por fatores restritos à glândula mamária (Wright et al., 2013; Wall e McFadden, 2010; Wall e McFadden, 2007a). A produção de leite é determinada pelo número e atividade celular, sendo número de células resultante do balanço entre os processos de proliferação e apoptose (Capuco et al., 2003; Boutinaud et al., 2004). Desta forma, nós hipotetizamos que os efeitos da frequência de ordenha no início da lactação sobre a resposta aguda e persistente no aumento da produção de leite, estariam associadas com o aumento do número de células mamárias via maior proliferação, ou diminuição da apoptose, ou ambos. No entanto, nossos resultados não comprovam esta hipótese, uma vez que não houve efeito residual do AFO sobre a produção de leite, assim como não foi observada diferença entre 2X ou 4X quanto ao índice de proliferação e apoptose em nenhum dos períodos avaliados. Também não foi observada mudança na morfologia do tecido, baseado na semelhança entre a proporção de epitélio e estroma celular, o que corrobora com estes achados (Figura 9).

Outros estudos, ao avaliarem a dinâmica celular mamária, também relataram ausência de efeito do aumento da frequência de ordenha sobre a proliferação e apoptose durante e após o período de aumento da frequência de ordenhas (Norgaard et al., 2005; Wall et al., 2006; Soberón et al., 2010; Wall e McFadden, 2010 e Wall et al., 2013). No entanto, Hale et al. (2003) demonstraram efeito positivo do AFO no início da lactação sobre a proliferação celular no tecido mamário coletado no sétimo dia da lactação. Contudo, esta resposta celular não foi observada para todos os grupos de vacas ordenhadas 4X, caracterizando efeito modesto e inconsistente. Enquanto que Murney et al. (2015) relataram maior índice de proliferação celular e ausência de efeito sobre a apoptose, 14 dias depois do início do aumento da frequência de ordenhas em vacas a pasto e de baixa produção de leite.

É possível que a ausência de diferença do efeito do AFO no início da lactação em relação à percentagem de apoptose e proliferação no ECM seja devida à elevada variação entre os animais (Wall e McFadden, 2006), ou o momento da amostragem possa não coincidir com a resposta mitogênica a frequência de ordenha, ou até mesmo que pequena variação na taxa de células em proliferação e apoptose, desde que se mantenha constante, possa influenciar o número de células mamárias (Wall e MacFadden, 2010).

Outra possibilidade é que a maior frequência de ordenha estimula o aumento na atividade enzimática das células mamárias (Hillerton et al., 1990; Murney et al., 2014) ou hipertrofia das mesmas (Knight et al., 1990) ou possa mudar a proporção de células diferenciadas em relação as em repouso. Qualquer uma destas alterações pode promover efeito persistente mesmo que em menor intensidade, alterando a capacidade de secreção da glândula mamária mediando assim o aumento na produção de leite observado mesmo após o retorno a menor número de ordenhas.

De acordo com Connor et al. (2008), em estudo comparando expressão gênica entre 2X e 4X, foi observado que os efeitos do AFO sobre a produção de leite tem caráter multifatorial, alterando a expressão de diversos genes relacionados principalmente com o aumento da remodelagem da matriz extracelular, metabolismo, proliferação e apoptose celular, transportes de nutrientes, função imune e neovascularização. No entanto, outros estudos tem sugerido que a maior utilização da glândula mamária durante o início da lactação, período em que esta é capaz de responder a demanda para maior produção de leite, resultaria em “imprinting lactacional”, ou seja, padrão de ativação gênica que persiste mesmo após o término AFO (Wall e McFadden, 2012a).

Os dados dos índices de proliferação e apoptose no ECM quando analisados em conjunto demonstram que em nenhum dos períodos avaliados houve maior índice de células morrendo por apoptose do que se proliferando (Tabela 3). Isto indica saldo positivo no número de células ao longo dos 28 dias da lactação. De acordo com Capuco et al. (2003) o aumento da produção de leite até o pico da lactação é devido ao maior número e/ou atividade celular mamária. Desta forma, no presente experimento a maior proliferação em relação a apoptose durante os três primeiros períodos avaliados, dias 2, 7 e 14 da lactação, sugere que o aumento do número de células possa ser o mecanismo responsável pelo aumento na produção de leite até o pico da lactação, que ocorreu em ambos os grupos por volta do final da terceira semana após o parto. No entanto, este resultado deve ser analisado com cautela uma vez que as células mamárias podem descamar para o lúmen ou serem eliminadas por outro processo além da apoptose, como a autofagia (Zarzynska e Motyl, 2008), e não avaliados no presente estudo, sugerindo que o número de células eliminadas possa ter sido maior do que o observado. Além disso, Capuco et al. (2001) relatam menor duração do processo de apoptose celular comparado a proliferação e como as avaliações são efetuadas em apenas um momento, provavelmente ao longo de um período de 24 h, mais células morreriam por apoptose do que proliferariam. Por isso, segundo estes autores o aumento da produção de leite durante o início da lactação, ou seja, o desenho da curva de lactação até o pico de produção é resultado da elevação da atividade secretora por célula, na ausência de crescimento mamário, uma vez que a taxa estimada de proliferação celular (0,3% por dia) foi menor que a de apoptose (0,56% por dia).

### ***Morfologia mamária***

A proporção de tecido mamário ocupado por alvéolos, estroma, epitélio e lúmen não foi influenciada pelo aumento da frequência de ordenhas no início da lactação ( $P > 0,05$ ). Com exceção da área de lúmen, todos os parâmetros avaliados para morfologia mamária foram afetados pelos dias de lactação ( $P < 0,05$ ; Figura 9). A proporção de tecido ocupado pelos alvéolos foi menor no segundo dia após o parto, com elevação de seus valores até o dia 21 da lactação, ponto de maior área de tecido alveolar, e posterior redução no dia 28 pós-parto. Devido à consistência da proporção de área luminal observada ao longo dos primeiros 28 dias da lactação, a proporção de área de epitélio celular mamário apresentou comportamento semelhante à área alveolar, enquanto que a área do estroma teve relação inversa à mesma. O

aumento da proporção de ECM até o dia 21 da lactação está de acordo com o maior índice de proliferação em relação ao de apoptose e ao aumento na produção de leite até o pico da lactação encontrado neste estudo. O que reforça o argumento de que talvez o aumento do número de células a partir do parto até o pico da lactação seja o responsável pelo aumento da produção de leite durante esta fase. Não descartando que o aumento da proporção de ECM até o dia 21 também possa ser consequência da hipertrofia do epitélio devido à elevada atividade enzimática do mesmo.

Poucos estudos avaliaram o efeito do AFO no início da lactação sobre características morfométricas do tecido mamário em bovinos. Wall et al. (2013) e Wall et al. (2012b), também não relataram efeito do maior número de ordenha sobre a proporção de tecido mamário ocupado pelo ECM e estroma. Wall et al. (2013) também não observaram efeito da influência dos períodos avaliados sobre a morfometria, além da proporção de ECM ser superior e de estroma inferior ao do presente estudo. Segundo Akers et al. (2006), variações principalmente na proporção de estroma e lúmen alveolar podem ocorrer devido a diferença no potencial de produção de leite entre as raças estudadas. Desta forma, as diferenças observadas entre este estudo e o de Wall et al. (2013) podem ser devido ao fator raça, uma vez que, Wall et al. (2013) utilizaram como modelo experimental vacas da raça Holandês, com média da produção de leite ultrapassando os 40 kg/d até 21 dias da lactação, e o presente estudo vacas F1 Holandês x Zebu, alcançando média de produção de 19 kg/d no mesmo período.

## CONCLUSÕES

O maior número de ordenhas no início da lactação resultou em maior produção de leite durante os 21 primeiros dias da lactação, no entanto após este período não foi observado efeito residual sobre a persistência da lactação. Os efeitos da frequência de ordenha sobre a resposta da glândula mamária durante o período de tratamento parecem não estar envolvidos com mudanças na proliferação e apoptose celular, ou seja, na dinâmica da população de células mamárias, sugerindo que outro mecanismo ou a interação entre diversos fatores possam ser responsáveis pela maior produção de leite em resposta a AFO e conseqüentemente da manutenção deste efeito sobre a produção de leite após cessado o maior número de ordenhas. Já o aumento da produção de leite até o pico da lactação parece está associado à

maior proliferação em relação a apoptose celular, no entanto, estudos mais detalhados devem ser realizados para a comprovação deste fato.

## REFERÊNCIAS

- Akers, R. M., A. V. Capuco, and J. E. Keys. 2006. Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers. *Livest. Sci.* 105:44–49.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. The cell cycle and programmed cell death. Pages 983–1026 in *Molecular Biology of the Cell*. 4th Ed. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, ed. Garland Science, New York, NY.
- Annen, E. L., A. C. Fitzgerald, P. C. Gentry, M. A. McGuire, A. V. Capuco, L. H. Baumgard, and R. J. Collier. 2007. Effect of continuous milking and bST supplementation on mammary epithelial cell turnover. *J. Dairy Sci.* 90:165–183.
- Bar-Peled, U., E. Maltz, I. Bruckental, Y. Folman, Y. Kali, H. Gacitua, and A. R. Lehrer. 1995. Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2726–2736.
- Blevins, C. A., L. E. Shirley, and J. S. Stevenson. 2006. Milking frequency, estradiol cypionate, and somatotropin influence lactation and reproduction in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89:4176–4187.
- Boutinaud, M., J. Guinard-Flamenta, and H. Jammes. 2004. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:499–508.
- Capuco, A. V., D. L. Wood, R. Baldwin IV, K. McLeod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177–2187.
- Capuco, A. V., S. E. Ellis, S. A. Hale, E. Long, R. A. Erdman, X. Zhao, and M. J. Paape. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81:18–31.
- Capuco, A. V., and S. E. Ellis. 2005. Bovine Mammary Progenitor Cells: Current Concepts and Future Directions. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 10:5–15.
- Connor, E. E., S. Siferd, T. H. Elsasser, C. Clover, C. P. Van Tassell, T. S. Sonstegard, V. Fernandes, and A. V. Capuco. 2008. Effects of increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. *BMC Genomics.* 9:362–376.

- Dahl, G. E., R. L. Wallace, R. D. Shanks, and D. Lueking. 2004. Hot topic: Effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *J. Dairy Sci.* 87:882–885.
- Duchrow, M., M. H. H. Schmidt, M. Zingler, S. Anemüller, H. Bruch, and R. Broll. 2001. Suppression of cell division by pKi-67 antisense-RNA and recombinant protein. *Cell. Physiol. Biochem.* 11:331–338.
- Eslamizad, M., M. Dehghan-Banadaky, K. Rezayazdi, and M. Moradi-Shahrbabak. 2010. Effects of 6 times daily milking during early versus full lactation of Holstein cows on milk production and blood metabolites. *J. Dairy Sci.* 93:4054–4061.
- Erdman, R. A., and M. Varner. 1995. Fixed yield responses to increased milking frequency. *J. Dairy Sci.* 78:1199–1203.
- Fernandez, J., C. M. Ryan, D. M. Galton, and T. R. Overton. 2004. Effects of milking frequency during early lactation on performance and health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):424.(Abstr.).
- Hale, S. A., A. V. Capuco, and R. E. Erdman. 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:2061–2071.
- Hillerton, J. E., C. H. Knight, A. Turvey, S. D. Wheatley, and C. J. Wilde. 1990. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *J. Dairy Res.* 57:285–294.
- Ingvartsen, K. L., and J. B. Andersen. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83:1573–1597.
- Ingvartsen, K. L., R. J. Dewhurst, and N. C. Figgens. 2003. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that cause production disease in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* 83:277–308.
- Knight, C. H., P. A. Fowler, and C. J. Wilde. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J. Endocrinol.* 127:129–138.
- Lamote, I., E. Meyer, A. M. Massart-Leën, and C. Burvenich. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids.* 69:145–159.
- Li, C., P. Chen, and M. S. Smith. 1999. Neuropeptide Y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: Role of prolactin. *Endocrinol.* 140:118–123.
- Lima, J. A. M., S. G. Coelho, J. R. M. Ruas, A. M. Q. Lana, H. M. Saturnino, and R. B. Reis. 2011. Efeito do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre produção e composição do leite de vacas mestiças Holandês / Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63:1160–1160.

- Murney, R., K. Stelwagen, T. T. Wheeler, J. K. Margerison, and K. Singh. 2014. The effects of milking frequency in early lactation on milk yield, mammary cell turnover, and secretory activity in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:1–7.
- Nørgaard, J., A. Sorensen, M. T. Sorensen, J. B. Andersen, and K. Sejrsen. 2005. Mammary cell turnover and enzyme activity in dairy cows: Effects of milking frequency and diet energy density. *J. Dairy Sci.* 88:975–982.
- Reis, G. L., A. A. Alves, and A. M. Q. Lana. 2007. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Ciênc. Rural*, 37:1134-1138.
- Schams, D.; S. Kohlenberg, W. Amselgruber, W., B. Berisha, M. W. Pfaffl and F. Sinowatz. 2003. Expression and localization of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol.* 177:305–317.
- Sejrsen, K., S. Purup, M. Vestergaard, and M. T. Sorensen. 2003. Fodringens betydning for mælkekirtlernes vækst og udvikling. Pages 463–487 in *Kvægets ernæring og fysiologi* (vol. 1). Eds: T. Hvelplund and P. Nørgaard. DJF Report number 53. Jordbrugs Forskning (Danish Institute of Agricultural Sciences), Foulum, Denmark.
- Shields, S. L., P. Rezamand, D. L. Sevier, K. S. Seo, W. Price, and M. A. McGuire. 2011. Effects of increased milking frequency for the first 21 days postpartum on selected measures of mammary gland health, milk yield and milk composition. *J. Dairy Res.* 78:301–307.
- Smith, J. W., L. O. Ely, W. M. Graves, and W. D. Gilson. 2002. Effect of milking frequency on DHI performance measures. *J. Dairy Sci.* 85:3526–3533.
- Soberón, F., J. L. Lukas, M. E. Van Amburgh, A. V. Capuco, D. M. Galton, and T. R. Overton. 2010. Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:565–573.
- Soberón, F., C. M. Ryan, D. V. Nydam, D. M. Galton, and T. R. Overton. 2011. The effects of increased milking frequency during early lactation on milk yield and milk composition on commercial dairy farms. *J. Dairy Sci.* 94:4398–4405.
- Sorensen, B. A., D. D. Muir, and C. H. Knight. 2001. Thrice-daily milking throughout lactation maintains epithelial integrity and thereby improves milk protein quality. *J. Dairy Res.* 68:15–25.
- Sorensen, M. T., J. V. Nørgaard, P. K. Theil, M. Vestergaard, and K. Sejrsen. 2006. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:4632–4639.

- Stelwagen, K., and C. H. Knight. 1997. Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *J. Dairy Res.* 64:487–494.
- Sutton, J. D. 1989. Altering Milk Composition by feeding. *J. Dairy Sci.*, v. 72, p. 2801–2814.
- VanBaale, M. J., D. R. Ledwith, J. M. Thompson, R. Burgos, R. J. Collier, and L. H. Baumgard. 2005. Effect of increased milking frequency in early lactation with or without recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 88:3905–3912.
- Wall, E. H., H. M. Crawford, S. E. Ellis, G. E. Dahl, and T. B. McFadden. 2006. Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:4640–4648.
- Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2007a. The milk yield response to frequent milking in early lactation of dairy cows is locally regulated. *J. Dairy Sci.* 90:716–720.
- Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2007b. Optimal timing and duration of unilateral frequent milking during early lactation of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5042–5048.
- Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2010. The effects of milk removal or four-times-daily milking on mammary expression of genes involved in the insulin-like growth factor-I axis. *J. Dairy Sci.* 93:4062–4060.
- Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2012a. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: A local affair: How the mammary gland adapts to changes in milking frequency. *J. Anim. Sci.* 90:1695–1707.
- Wall, E. H., J. P. Bond, and T. B. McFadden. 2012b. Acute milk yield response to frequent milking during early lactation is mediated by genes transiently regulated by milk removal. *Physiol. Genomics.* 44:25–34.
- Wall, E. H., J. P. Bond, and T. B. McFadden. 2013. Milk yield responses to changes in milking frequency during early lactation are associated with coordinated and persistent changes in mammary gene expression. *BMC Genomics.* 14:296–312.
- Wright, J. B., E. H. Wall, and T. B. McFadden. 2013. Effects of increased milking frequency during early lactation on milk yield and udder health of primiparous Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 91:195–202.
- Zarzynska, J., and T. Motyl, 2008. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. *J. Physiol. Pharmacol.* 59:275–288.

**Tabela 1.** Produção de leite e componentes do leite (%), durante 4-21 d, 22-210 d e 4-210 d da lactação, de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro vezes ao dia (4X) do 2-21 d pós-parto (PP) e seguidas por duas ordenhas no restante da lactação

Itens	Dias PP	Tratamento			Probabilidade		
		2X	4X	EPM	ORD <sup>1</sup>	DIAS <sup>2</sup>	ORD*DIAS <sup>3</sup>
Leite, kg/d	4-21 d	17,95 <sup>B</sup>	20,55 <sup>A</sup>	0,24	0,0001	0,0001	NS
	22-210 d	14,70	14,71	0,06	NS	0,0001	NS
	4-210 d	14,98	15,21	0,07	NS	0,0001	NS
	210 d	3096	3146	132	NS	-	-
Gordura, %	4-21 d	4,30	4,38	0,034	NS	NS	NS
	22-210 d	4,10	4,32	0,011	NS	0,0001	NS
	4-210 d	4,11	4,33	0,012	NS	0,0001	NS
Proteína, %	4-21 d	3,36	3,47	0,019	NS	0,0001	NS
	22-210 d	3,10	3,21	0,005	NS	0,0001	NS
	4-210 d	3,12	3,23	0,005	NS	0,0001	NS
Lactose, %	4-21 d	4,59	4,50	0,012	NS	0,0001	NS
	22-210 d	4,65	4,59	0,003	NS	0,0001	NS
	4-210 d	4,65	4,58	0,003	NS	0,0001	NS
CCS, x1000 cél./mL	4-21 d	224,6 <sup>A</sup>	167,7 <sup>B</sup>	16,53	0,002	0,001	NS
	22-210 d	264,8	292,6	38,11	NS	0,003	NS
	4-210 d	246,8 <sup>A</sup>	235,8 <sup>B</sup>	22,28	0,0002	0,01	NS

<sup>A-B</sup>Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Fisher ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Efeito da frequência de ordenha.

<sup>2</sup>Efeito dos dias (d) de avaliação.

<sup>3</sup>Interação entre a frequência de ordenha e o dia de avaliação.

NS = Não significativo ( $P > 0,05$ )

**Tabela 2.** Produção dos componentes do leite (kg/d) e da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (kg/d), durante 4-21 d, 22-210 d e 4-210 d da lactação, de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro vezes ao dia (4X) do 2-21d pós-parto (PP) e seguidas por duas ordenhas no restante da lactação

Itens	Dias PP	Tratamento				Probabilidade	
		2X	4X	EPM	ORD <sup>1</sup>	DIAS <sup>2</sup>	TRAT*DIAS <sup>3</sup>
Gordura, kg/d	4-21 d	0,776 <sup>B</sup>	0,895 <sup>A</sup>	0,010	0,03	0,0001	NS
	22-210 d	0,609	0,638	0,003	NS	0,0001	NS
	4-210 d	0,623	0,661	0,003	NS	0,0001	NS
Proteína, kg/d	4-21 d	0,612	0,711	0,008	0,06	0,0001	NS
	22-210 d	0,462	0,473	0,002	NS	0,0001	NS
	4-210 d	0,475	0,494	0,002	NS	0,0001	0,0001
Lactose, kg/d	4-21 d	0,833	0,928	0,011	NS	0,0001	NS
	22-210 d	0,702	0,685	0,003	NS	0,0001	NS
	4-210 d	0,713	0,707	0,003	NS	0,0001	0,0001
LCG 3,5%, kg/d <sup>4</sup>	4-21 d	20,45 <sup>B</sup>	23,43 <sup>A</sup>	0,255	0,04	0,0001	NS
	22-210 d	16,39	16,79	0,64	NS	0,0001	NS
	4-210 d	16,74	17,39	0,07	NS	0,0001	0,0001

<sup>A-B</sup>Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Fisher ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Efeito da frequência de ordenha.

<sup>2</sup>Efeito dos dias (d) de avaliação.

<sup>3</sup>Interação entre a frequência de ordenha e os dias de avaliação.

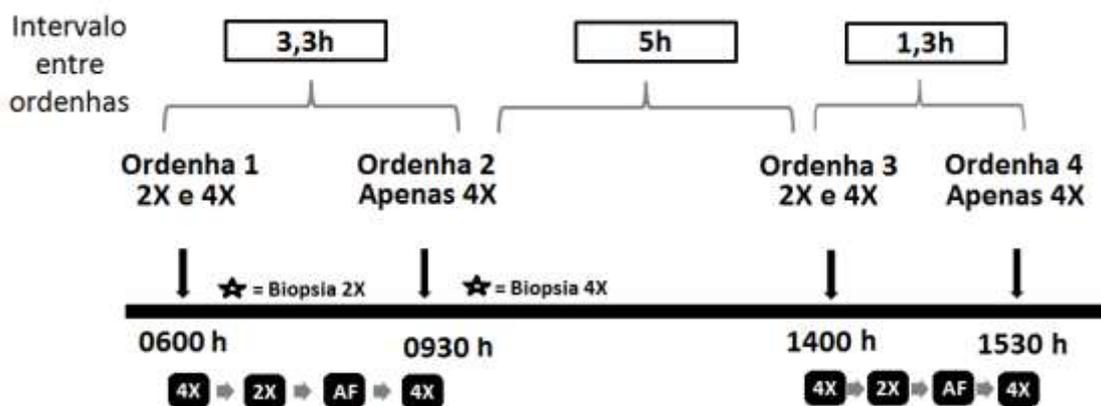
<sup>4</sup>Fórmula para leite corrigido para 3,5% de gordura:  $LCG\ 3,5\% = [(0,4324 \times \text{kg de leite}) + (16,216 \times \text{kg de gordura})]$ .

NS = Não significativo ( $P > 0,05$ ).

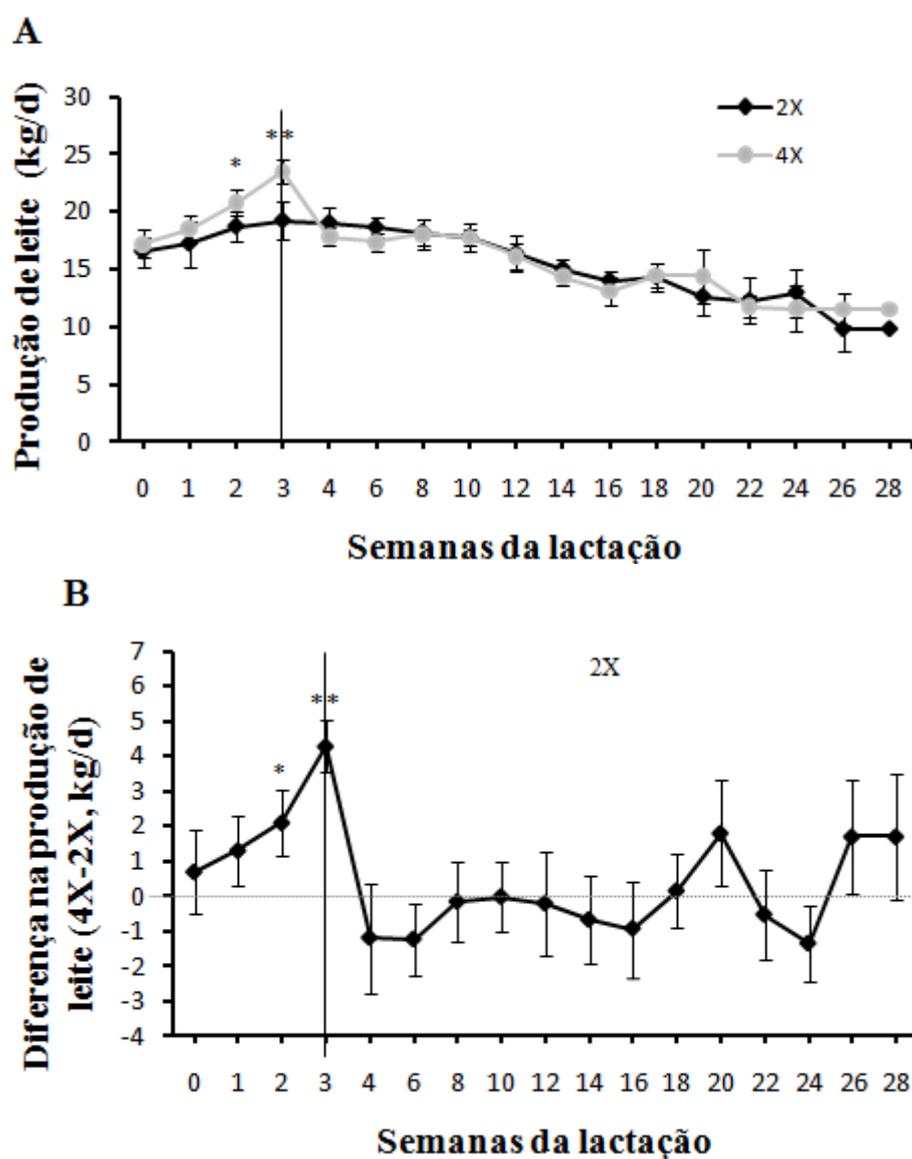
**Tabela 3.** Diferença entre a taxa de proliferação e apoptose no epitélio celular mamário de vacas ordenhadas quatro vezes diariamente, do segundo ao 21º dia da lactação (4X) e vacas ordenhas duas vezes ao dia durante toda a lactação (2X)

Itens	Dias (PP)				
	2	7	14	21	28
<b>2X</b>					
Proliferação, %	2,26	0,95	0,86	0,56	0,46
Apoptose, %	0,34	0,13	0,10	0,11	0,03
<sup>1</sup> Diferença, %	1,92	0,82	0,76	0,45	0,43
<b>4X</b>					
Proliferação, %	1,97	1,03	0,88	0,42	0,40
Apoptose, %	0,27	0,20	0,17	0,12	0,08
<sup>1</sup> Diferença, %	1,70	0,83	0,71	0,30	0,32

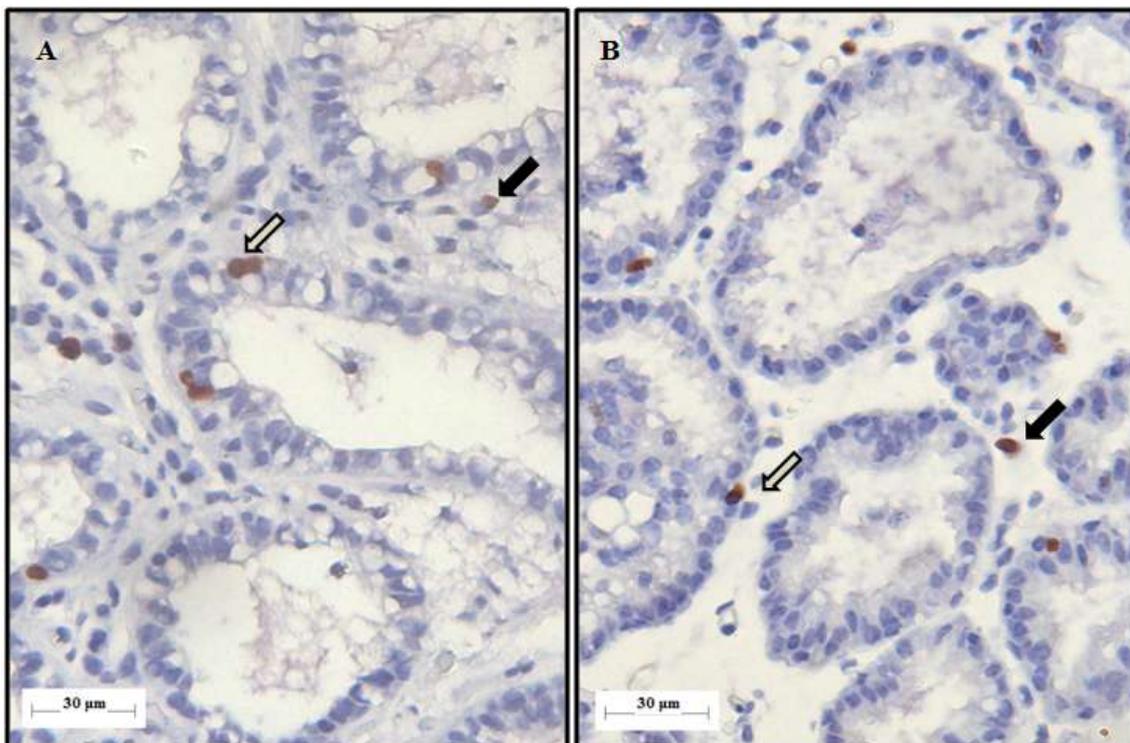
<sup>1</sup>Diferença foi obtida pela subtração da taxa de apoptose e taxa de proliferação celular.



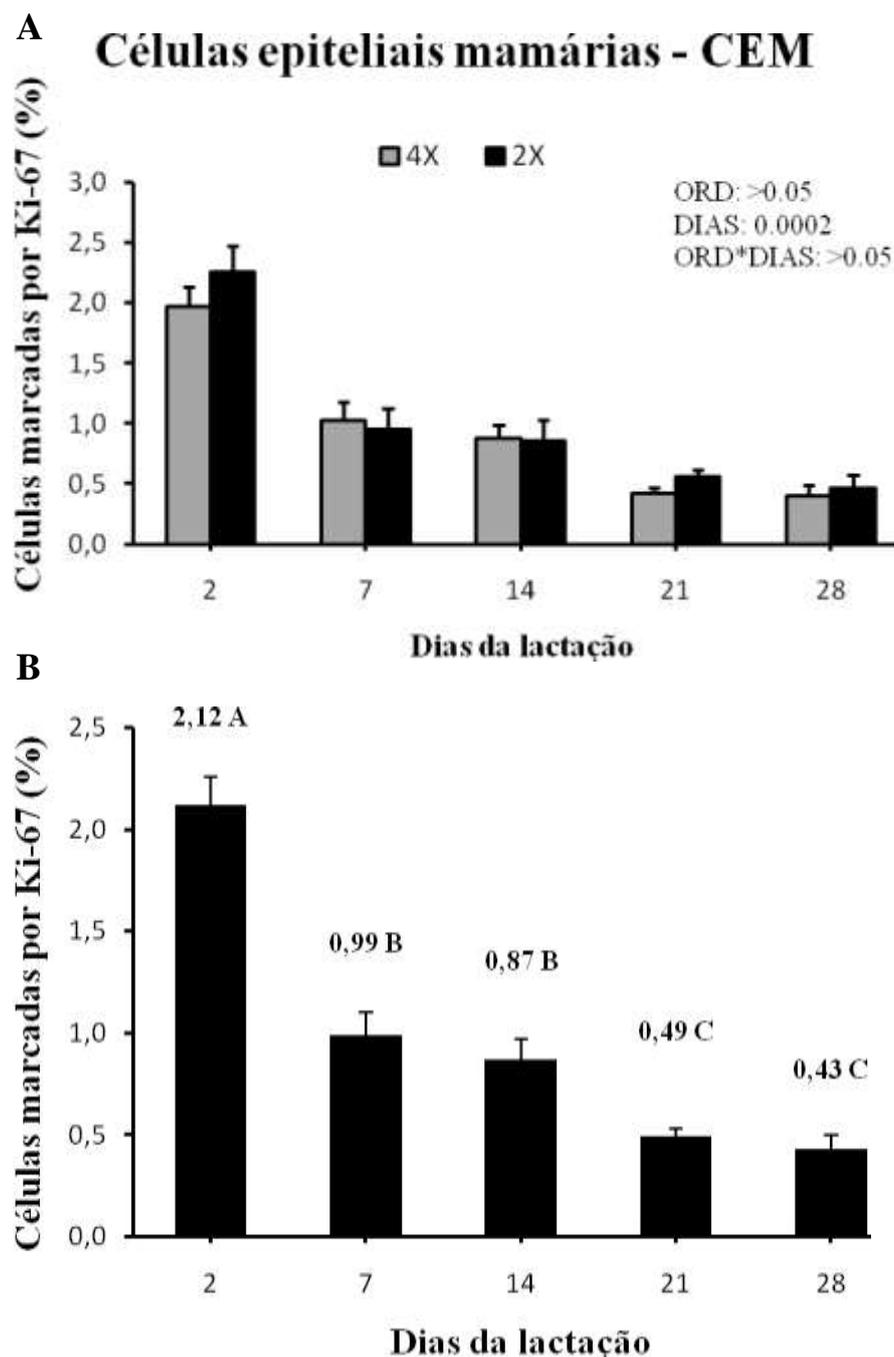
**Figura 1:** Rotina de ordenha e horário das biopsias mamárias. As vacas ordenhadas quatro vezes ao dia do segundo ao 21º dia da lactação (4X) eram as primeiras a serem ordenhadas, seguidas das vacas ordenhadas duas vezes ao dia durante toda lactação (2X) e o restante dos animais da fazenda (AF). Após o término da ordenha dos demais animais da fazenda não pertencentes ao experimento, as vacas dos grupos 4X foram novamente ordenhadas. A biopsia das vacas dos grupos 2X e 4X foram realizadas imediatamente após a primeira ordenha de ambos os grupos e segunda ordenha do grupo 4X, respectivamente.



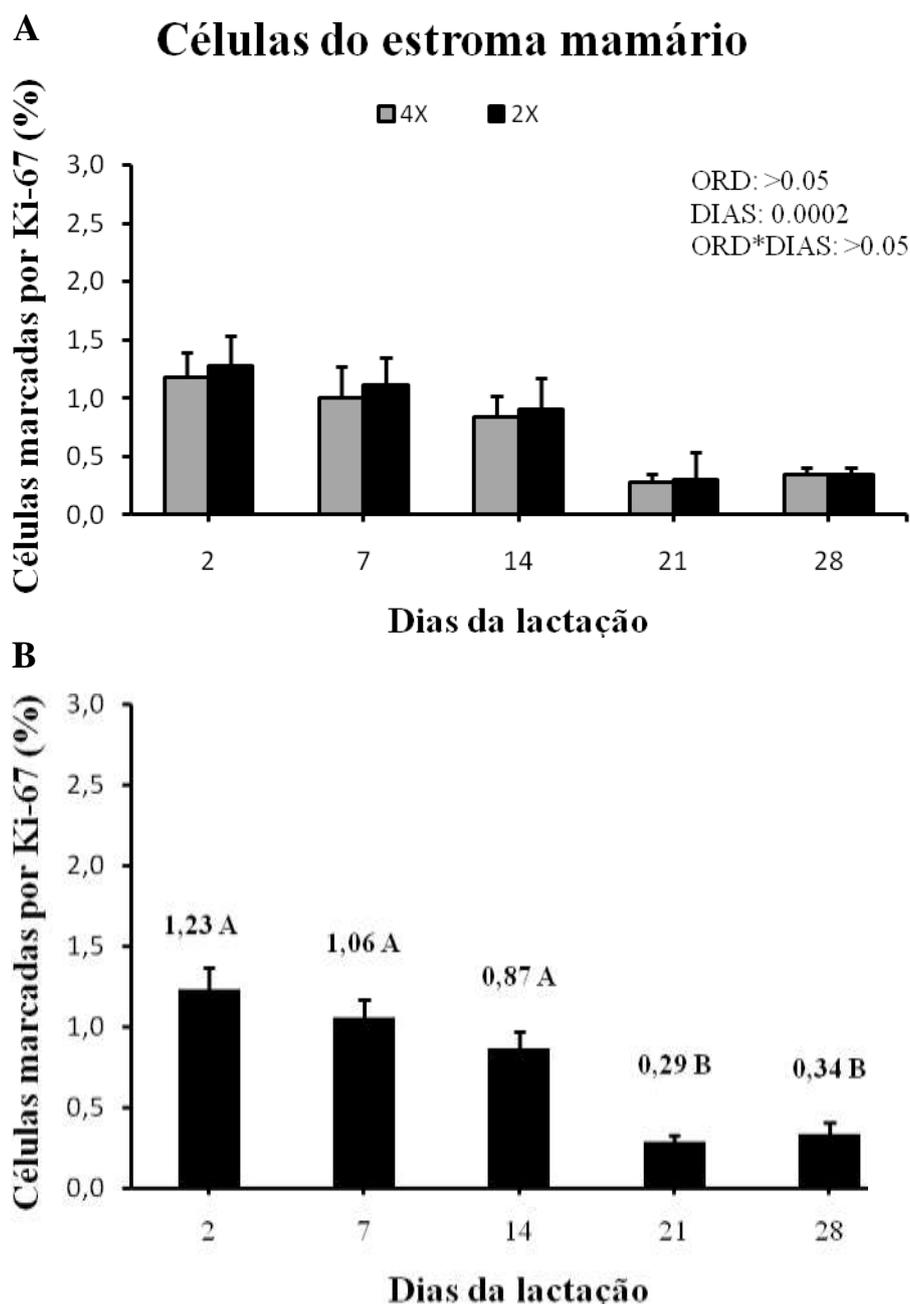
**Figura 2.** Mudança na produção de leite em resposta ao aumento da frequência de ordenha (AFO). A) Produção total de leite. B) Diferença entre a produção total de leite de vacas ordenhadas quarto vezes diariamente, do segundo ao 21º dia da lactação (4X) e vacas ordenhas duas vezes ao dia durante toda a lactação (2X). A diferença na produção de leite foi obtida pela subtração da produção total de leite das vacas submetidas a 4X pela produção total do grupo submetido a 2X. A produção de leite do grupo 4X foi maior do que a do grupo 2X apenas na segunda e terceira semana da lactação (\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,001$ ). A semana 0 representa o quarto dia da lactação.



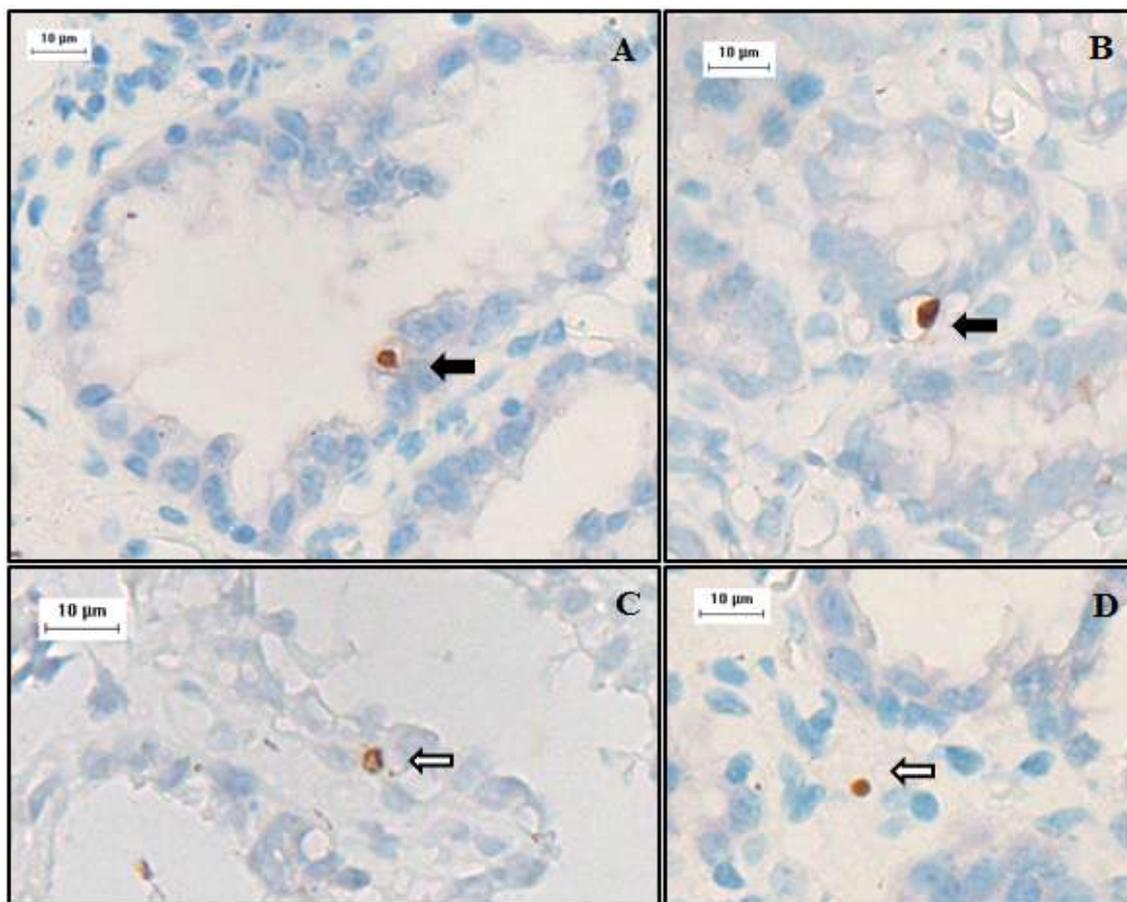
**Figura 3.** Fotomicrografia mostrando células imunorreativas ao anticorpo Ki-67 no epitélio (setas vazadas) e no estroma (setas pretas) mamário de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação. (A) Amostra de biópsia obtida no segundo e (B) sétimo dias da lactação de vaca ordenhada duas e quatro vezes ao dia até 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação, respectivamente (40x).



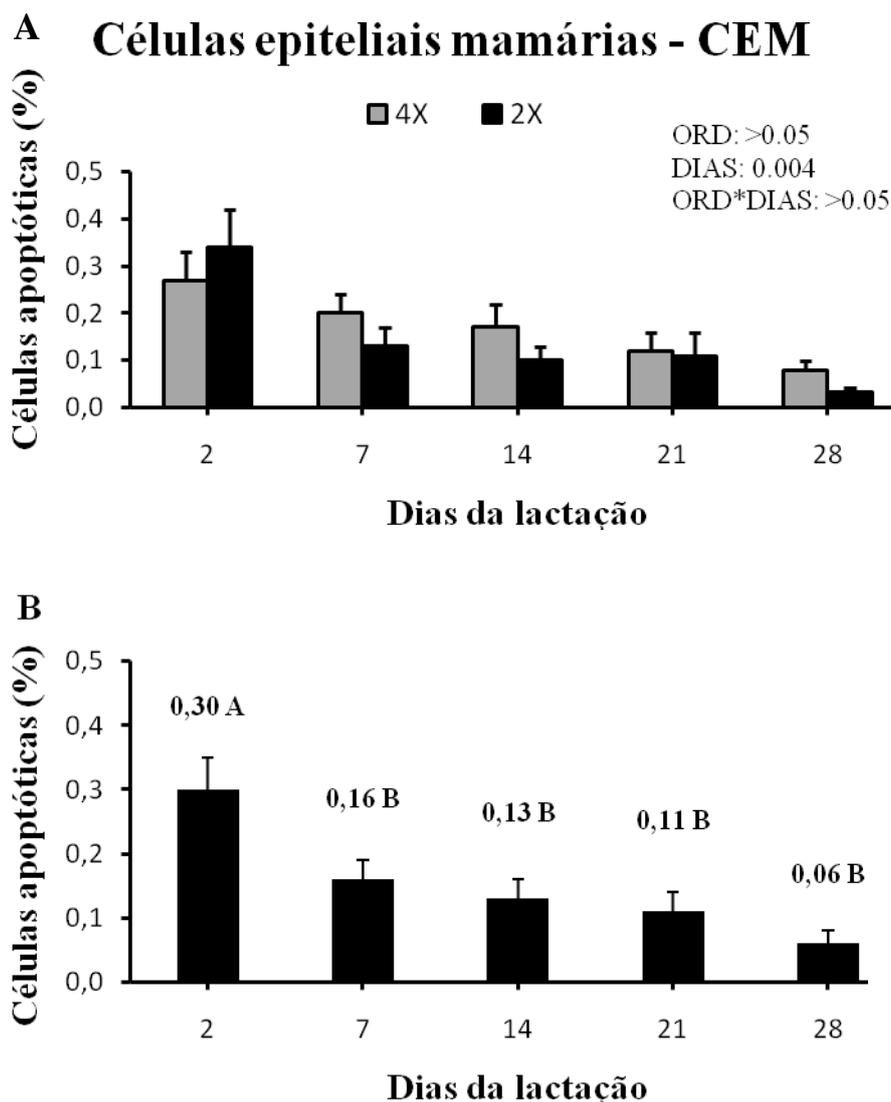
**Figura 4.** Percentagem de células epiteliais mamárias (CEM) marcadas por Ki-67 de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação. (A) Índice de proliferação celular em biopsias mamárias coletadas de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação. (B) Percentagem CEM marcadas por Ki-67 ao longo dos dias de lactação de ambos os grupos. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. P-valor do efeito do número de ordenha (ORD), dias da lactação (DIAS), e interação entre estes fatores (ORD\*DIAS) estão presentes no gráfico. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).



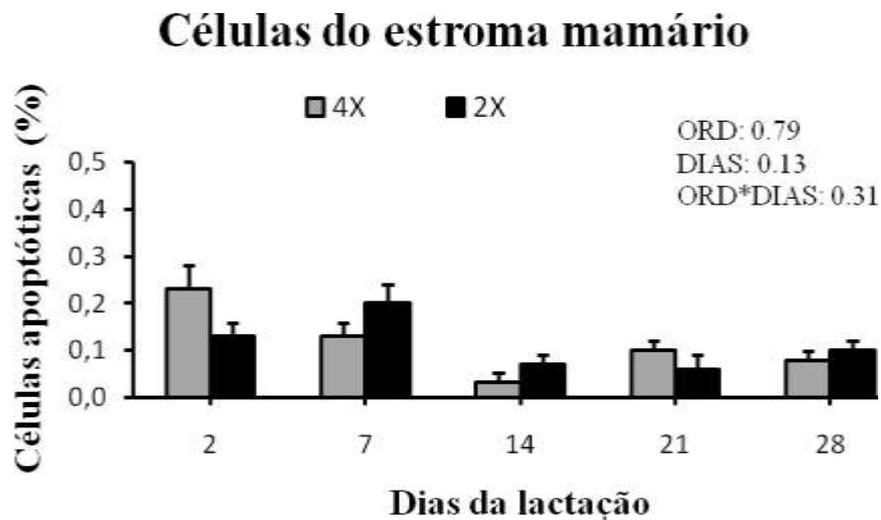
**Figura 5.** Percentagem de células do estroma mamárias marcadas por Ki-67 de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação. (A) Índice de proliferação celular em biopsias mamárias coletadas de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação. (B) Percentagem de células do estroma mamárias marcadas por Ki-67 ao longo dos dias de lactação de ambos os grupos. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. P-valor do efeito do número de ordenha (ORD), dias da lactação (DIAS), e interação entre estes fatores (ORD\*DIAS) estão presentes no gráfico. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).



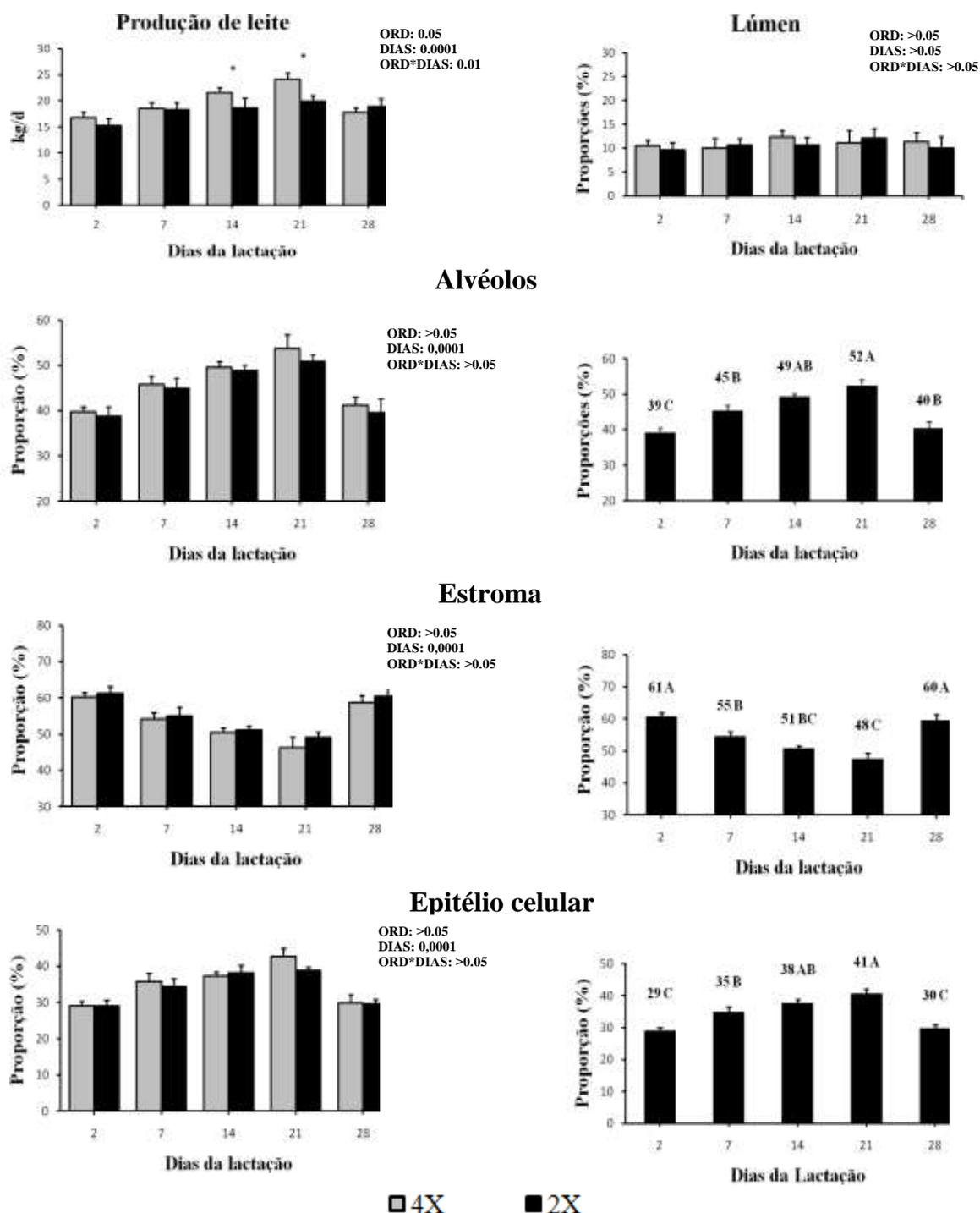
**Figura 6.** Fotomicrografia mostrando células positivas ao TUNEL no epitélio (A e B; setas pretas) e no estroma mamário (C e D; setas vazadas) de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação. (A) Amostras de biopsias obtidas no sétimo (A e D), 14<sup>o</sup> (B) e segundo (C) dias da lactação, respectivamente, de vaca ordenhada quatro (A e D) e duas (B e C) vezes ao dia até 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação (40x).



**Figura 7.** A) Percentagem de apoptose em células epiteliais e luminal de vacas submetidas a diferentes frequências de ordenhas no início da lactação. (A) Índice de apoptose em biopsias mamárias coletadas de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação. B) Percentagem de apoptose ao longo dos dias de lactação nos dois grupos. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. P-valor do efeito do número de ordenha (ORD), dias da lactação (DIAS), e interação entre estes fatores (ORD\*DIAS) estão presentes no gráfico. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).



**Figura 8.** A) Percentagem de apoptose em células do estroma em biopsias mamárias coletadas de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação e seguida de duas ordenhas até o final da lactação. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média. P-valor do efeito do número de ordenha (ORD), dias da lactação (DIAS), e interação entre estes fatores (ORD\*DIAS) estão presentes no gráfico.



**Figura 9.** Produção de leite e proporções em percentagem de área (%) ocupada pelos alvéolos, estroma, epitélio celular mamário e lúmen de vacas ordenhadas duas (2X) ou quatro (4X) vezes durante os primeiros 21 dias da lactação, seguidas por duas ordenhas até o final da lactação. P-valor do efeito do número de ordenha (ORD), dias da lactação (DIAS), e interação entre estes fatores (ORD\*DIAS) estão presentes em cada gráfico. \* = Diferença entre os grupos pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Gráficos á direita com barras pretas representam a média  $\pm$  erro padrão dos dois grupos. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos que realizam biopsia mamária em animais lactantes utilizam ou a metodologia cirúrgica ou agulha acoplada com sistema de disparo automático. No entanto, o uso de agulha de biopsia disparada manualmente se mostrou eficiente na obtenção de fragmentos de tecido glandular mamário. Embora a aplicação tanto da metodologia cirúrgica quanto a utilização de agulha de biopsia resulte em alterações de caráter transitório na produção e composição do leite e saúde da glândula mamária, a severidade das alterações como o uso de agulha de biopsia é inferior as observadas pelo método cirúrgico. Independente da metodologia de biopsia realizada, a adoção do uso profilático de antibióticos intramamário ou sistêmico é imprescindível para minimizar a ocorrência de mastite associada ao procedimento de biopsia. Ainda não foi encontrada na literatura a descrição de uma metodologia capaz de permitir a coleta *in vivo* de material biológico da glândula mamária suficiente para a realização de análises morfológicas e fisiológicas e que substitua a utilização do método invasivo de biopsia, embora pesquisas estejam avançando nesta área.

Este provavelmente é o primeiro estudo que avalia a dinâmica da renovação celular em animais mestiços. As células epiteliais mamárias dos animais mestiços parecem alcançar completa diferenciação mais precocemente que animais da raça Holandesa, o que pode explicar a ocorrência precoce do pico de produção em animais mestiços. Animais da raça Holandês e mestiços Holandês x Zebu parecem apresentar comportamento semelhante quanto a dinâmica da renovação celular no início da lactação. Desta forma, mais pesquisas sobre a fisiologia da glândula mamária em animais mestiços são necessárias para sua melhor compreensão.

Pesquisas anteriores tem demonstrado que o AFO apenas no início da lactação tanto em animais da raça Holandês quanto em animais mestiços resulta em efeito residual ao longo de toda a lactação, apesar do presente estudo não ter observado tal efeito. Estes resultados reforçam a ideia de que talvez a realização de procedimentos de biopsia em curto espaço de tempo entre biopsias possa ter afetado negativamente a produção de leite, não sendo possível observar efeito residual.

**Anexo 1.** Comprovante de submissão do artigo que tem como título “Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield.

**Animal: An International Journal of Animal Bioscience**  
**Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield**  
 –Manuscript Draft–

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Effects of bovine mammary gland biopsy and increased milking frequency on post-procedure udder health, histology, and milk yield
<b>Short Title:</b>	Mammary biopsy, milk yield, udder health
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Section/Category:</b>	3. Physiology and functional biology of systems
<b>Keywords:</b>	CCS; cow; histology
<b>Corresponding Author:</b>	Juliana Mello Lima, M.D Universidade Federal de Minas Gerais Belo horizonte, Minas Gerais BRAZIL
<b>First Author:</b>	Juliana Mello Lima, M.D
<b>Order of Authors:</b>	Juliana Mello Lima, M.D José Reinaldo Mendes Ruas, Ph D Anilton Cesar Vasconcelos, Ph D Bruna Figueiredo Silper, M D Ângela Maria Quintão Lana, Ph D Valentim Arabicano Gheller, Ph D Helton Mattana Satumino, Ph D Ronaldo Braga Reis, Ph D Sandra Gesteira Coelho, Ph D
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	BRAZIL
<b>Abstract:</b>	Sixteen cows in early lactation were randomly distributed into two groups in order to evaluate the effects of mammary biopsies and increased milking frequency on tissue characteristics, post-biopsy udder health and histology. One group was milked twice a day (2X) starting on the second day after calving, until 28 days in milk (DIM). The other group was milked four times a day (4X) from two to 21 DIM, and twice a day (2X) from 22 to 28 DIM. On days 2, 7, 14, 21, and 28 postpartum, one fragment of secretory tissue was collected from one mammary quarter at a time. Collections were alternated between the four mammary quarters per collection day. A total of 80 mammary tissue samples were collected. Qualitative and quantitative analyses of the tissues were conducted by histologic examination. Animal health was assessed by observation of food intake behavior immediately after biopsy, and weight and body condition score (BCS) before and one week after biopsy. Udder health was assessed daily from calving to 60 DIM with California Mastitis Test (CMT) and by noting alterations in the milk such as blood, milk clots, blood clots, clinical signs of mastitis. Milk composition and somatic cell count (SCC) were analyzed before and after the biopsies. Milk production was evaluated before biopsy, on the day of biopsy, and after the biopsy. An average of 10 fields at 40x magnification was obtained from each sample. There were no evident changes in mammary morphology as a result of milking two or four times/d at any of the evaluated time points. Biopsy wounds healed rapidly without infection. Intramammary bleeding and CMT alterations were observed in 96% and 75% of the biopsied mammary quarters, respectively. Clinical mastitis was diagnosed in 12% of the biopsied quarters. Different milking frequencies had no effect on the frequency and duration of post-biopsy alterations. Milk production decreased after biopsies done on days 2, 14, and 21, but it returned to pre-biopsy values within two days. Milk composition and SCC were affected transiently. Increased milking frequency did not

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

	influence udder health. Post-biopsy recovery was rapid and the procedure proved effective without damaging the cows' health.
Suggested Reviewers:	Geoffrey E Dahl, Ph D University of Florida USA gdahl@ufl.edu Numerous publications related to lactation and mammary gland function.
	Pierre Lacasse, PhD Research Scientist, Agriculture and Agri-Food Canada pierre.lacasse@agr.gc.ca Numerous publications related to lactation and mammary gland function.
	Thomas B McFadden, PhD University of Vermont mcfaddent@missouri.edu Numerous publications related to lactation and mammary gland function.
Opposed Reviewers:	