
4. Resultados

4.1 Localização da cadeia β A Ativina/Inibina

4.1.1 Não gestantes

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase mostrou-se moderada e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais que demonstraram marcação predominantemente citoplasmática. Em relação ao estroma, a imunocoloração também se mostrou moderada e de forma homogênea (Fig. 2, Tab. 4).

4.1.2 Primeira fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase mostrou-se moderada/intensa e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais que se apresentaram imunocoradas no citoplasma e no núcleo. Em relação ao estroma a imunocoloração demonstrou-se moderada e de forma homogênea (Fig. 2, Tab. 4).

4.1.3 Segunda fase gestacional

A imunocoloração nesta fase se mostrou predominantemente citoplasmática, com poucas marcações nucleares. A intensidade de imunocoloração predominante mostrou-se moderada e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais. Em relação ao estroma a imunocoloração demonstrou-se fraca e homogênea. Estes dados sugerem a expressão protéica da cadeia β A ativina/inibina nas estruturas epiteliais e estromais da glândula mamária em animais púberes não gestantes e gestantes (Fig. 2, Tab. 4).

A análise de variância não-paramétrica seguida pelo teste Dunn demonstrou que as estruturas epiteliais alveolares e ductais apresentaram marcação mais intensa na 1ª fase gestacional quando comparada às outras duas fases ($p < 0,05$). Em relação à marcação estromal, essa se mostrou de intensidade fraca na 2ª fase gestacional quando comparada à fase não gestante e a 1ª fase gestacional, em que a imunocoloração estromal se mostrou moderada ($p < 0,05$, Tab. 4).

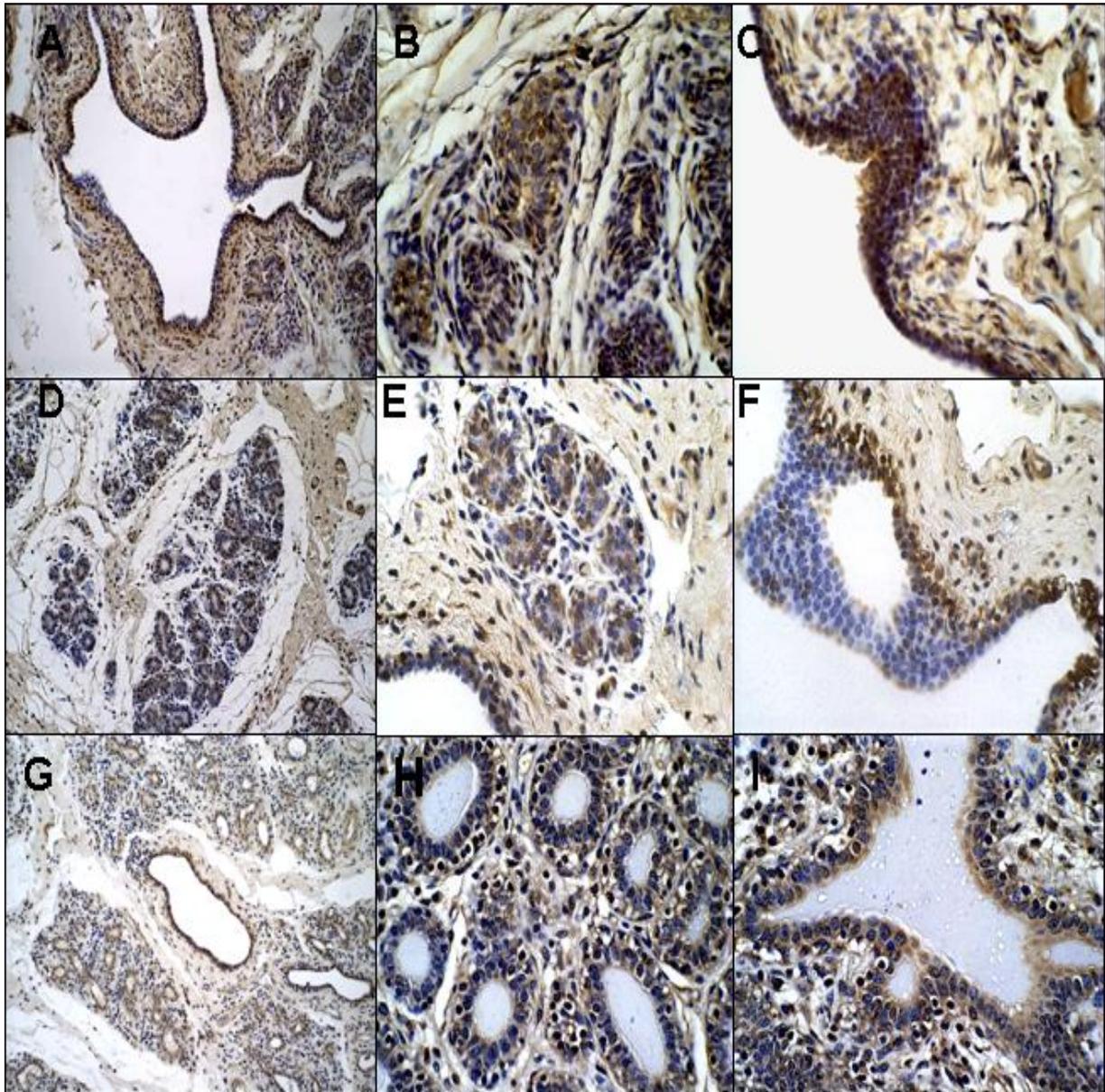


FIGURA 2 – Imunolocalização da sub-unidade β A ativina/inibina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.

A, D, G) 20x; B, E, H) Marcação alveolar na 1^a fase gestacional, 60x; C, F, I) Marcação ductal na 2^a fase gestacional, 60x.

TABELA 4

Sumário da intensidade de imunocoloração para a subunidade β A ativina/inibina

Estrutura	Não Gestante	1ª Fase Gestacional	2ª Fase Gestacional
Alveolar	++	+++	++
Ductal	++	+++	++
Estromal	++	++	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++, intensa.

4.2 Localização da cadeia β B Ativina/Inibina

4.2.1 Não gestantes

A intensidade de imunocoloração das células alveolares, ductais e estromais foi predominantemente fraca. A expressão da cadeia β B da ativina/inibina não ocorreu de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais, pois a imunocoloração foi mais evidente na periferia das unidades lobulares ductais terminais. Com relação as células estromais, a marcação foi homogênea.

4.2.2 Primeira fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase mostrou-se fraca e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais, assim como para as estruturas estromais. A marcação nas células epiteliais apresentou-se tanto nuclear quanto citoplasmática.

4.2.3 Segunda fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase seguiu o padrão demonstrado nas outras fases, ou seja, foi fraca nas células epiteliais lobulares e ductais, assim como nas células estromais. A marcação nas células epiteliais apresentou-se tanto nuclear quanto citoplasmática.

Este padrão de expressão demonstra que de modo diverso a cadeia βA , a expressão protéica da cadeia βB ativina/inibina não diferiu nas 3 estruturas celulares estudadas (Fig. 3, Tab. 5). A intensidade de imunocoloração da cadeia βB não diferiu nas estruturas epiteliais alveolares, ductais e estromais ($p.>0,05$, Tab. 5).

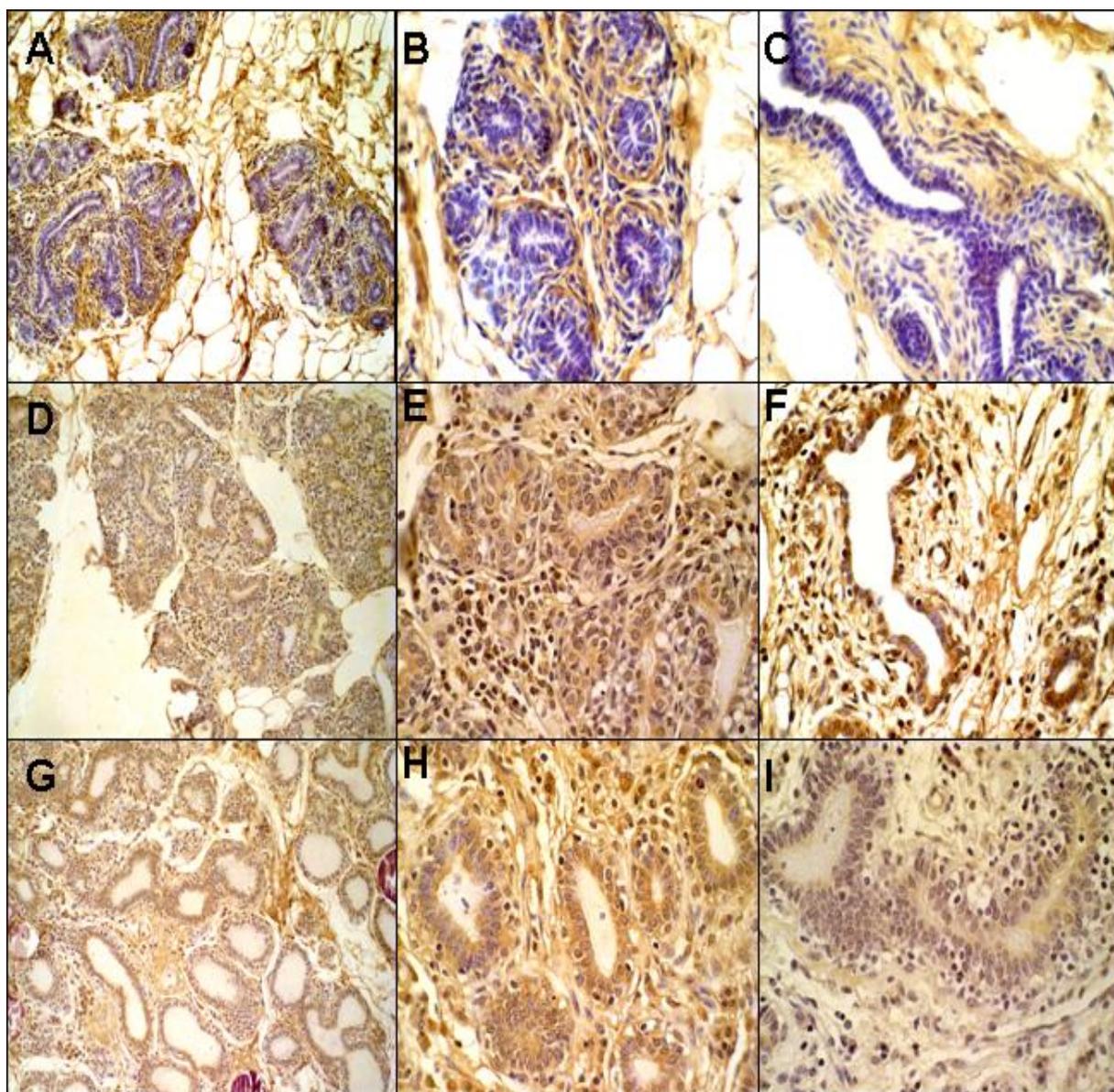


FIGURA 3 - Imunolocalização da sub-unidade β B ativina/inibina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.

A, D, G) 20x; B, E, H) Marcação alveolar na 1ª fase gestacional, 60x; C, F, I) Marcação ductal na 2ª fase gestacional 60x

TABELA 5

Sumário das intensidades de imunocoloração para a subunidade β B ativina/inibina

Estrutura	Não Gestante	1^a Fase Gestacional	2^a Fase Gestacional
Alveolar	+	+	+
Ductal	+	+	+
Estromal	+	+	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++ ,intensa.

4.3 Localização do receptor ActRIB

4.3.1 Não gestantes

Em animais não gestantes, a intensidade de imunocoloração do tecido mamário, apresentou-se fraca e heterogênea nas células epiteliais alveolares e ductais com a imunocoloração mais evidente nas regiões peri-alveolares e peri-ductais. Nas células não epiteliais, a intensidade de imunocoloração também foi fraca e homogênea (Fig. 4, Tab. 6).

4.3.2 Primeira fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase mostrou-se moderada e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais. A

imunocoloração estava presente no citoplasma e nos núcleos celulares. Em relação ao estroma a imunocoloração demonstrou-se fraca (Fig. 4, Tab. 6).

4.3.3 Segunda fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante foi fraca nas células epiteliais lobulares e ductais, assim como nas células estromais. A marcação pelo anticorpo secundário seguiu o mesmo padrão da apresentada na 1ª fase gestacional, foi citoplasmática e nuclear (Fig. 4, Tab. 6).

A análise não paramétrica seguida pelo teste Dunn, demonstrou diferenças na intensidade de imunocoloração do receptor to tipo IB nas estruturas epiteliais tanto alveolares quanto ductais, assim como nas células estromais durante as fases. Desta forma, a 1ª fase gestacional apresentou imunocoloração alveolar e ductal mais intensa que a 2ª fase gestacional ($p < 0,01$). Adicionalmente, a intensidade de imunocoloração estromal foi maior na fase não gestante quando comparada a 2ª fase gestacional ($p < 0,05$, Tab. 6).

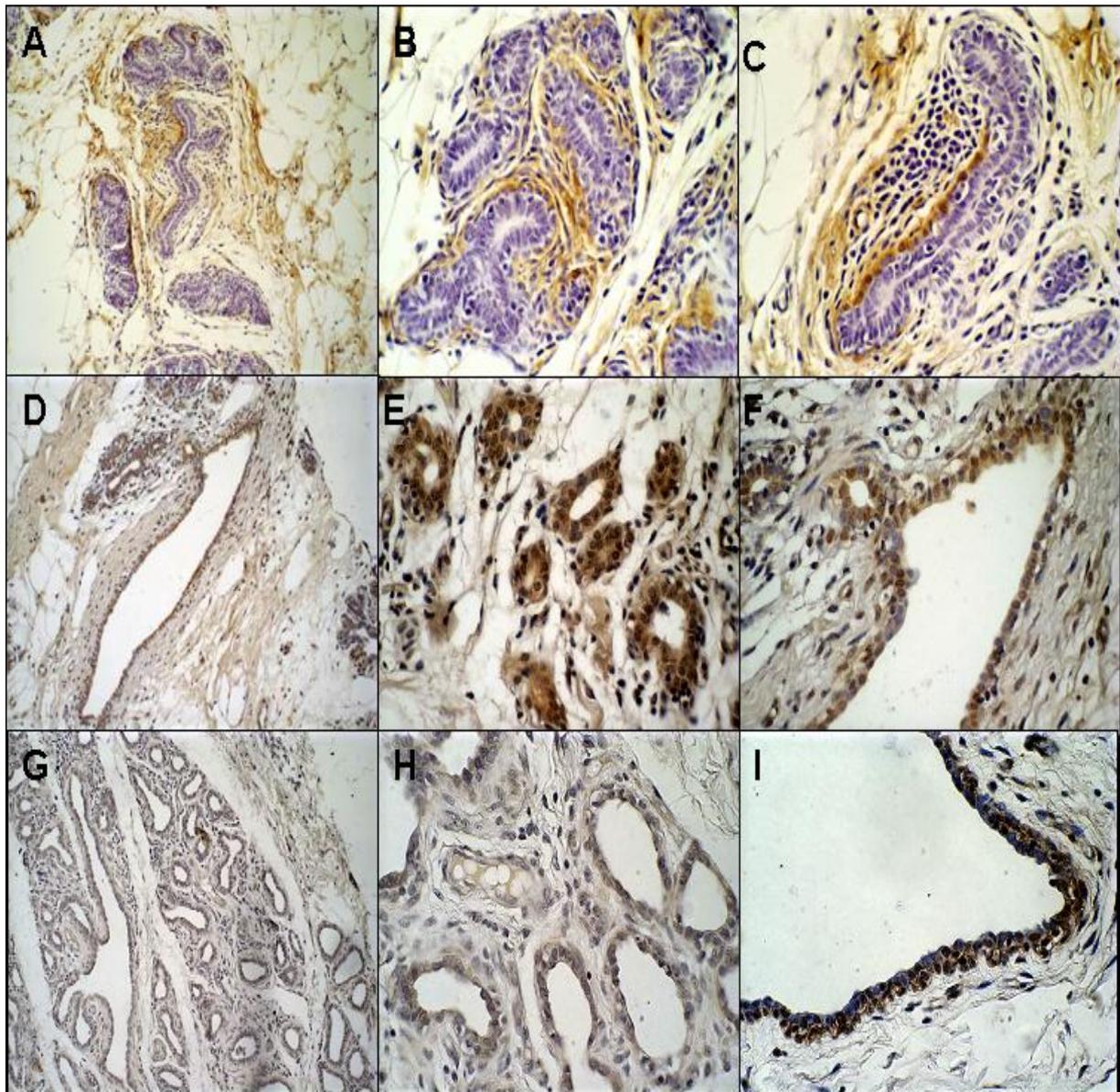


FIGURA 4 – Imunolocalização do receptor ActRIB na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.

A, D, G) 20x; B, E, H) Marcação alveolar na 1ª fase gestacional, 60x; C, F, I) Marcação ductal na 2ª fase gestacional, 60x.

TABELA 6

Sumário das intensidades de imunocoloração para o receptor de ativina ActRIB

Estrutura	Não Gestante	1^a Fase Gestacional	2^a Fase Gestacional
Alveolar	+	++	+
Ductal	+	++	+
Estromal	++	++	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++, intensa.

4.4 Localização do receptor ActRIIA

4.4.1 Não gestantes

Nesta fase, predominou a imunocoloração fraca, heterogênea nas regiões peri-alveolares e peri-ductais. Nas células estromais, a intensidade de imunocoloração também foi fraca e heterogênea (Fig. 5, Tab. 7).

4.4.2 Primeira fase gestacional

Para as estruturas alveolares e ductais a intensidade de imunocoloração predominante foi moderada e homogênea, concentrada no citoplasma celular. Contudo o estroma apresentou imunocoloração fraca.

4.4.3 Segunda fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante foi fraca no citoplasma das células epiteliais lobulares e ductais. As células estromais também apresentaram marcação fraca (Fig. 5, Tab. 7).

O padrão de expressão do receptor em questão, demonstra que em animais púberes em ambas as fases gestacionais, expressão protéica do receptor IIA ocorre simultaneamente em grande parte das estruturas epiteliais e não epiteliais da glândula mamária. Adicionalmente, o receptor ActRIIA apresentou intensidade de coloração alveolar e ductal mais intensa na 1ª fase gestacional que na fase não gestacional ($p < 0,05$, Tab. 7).

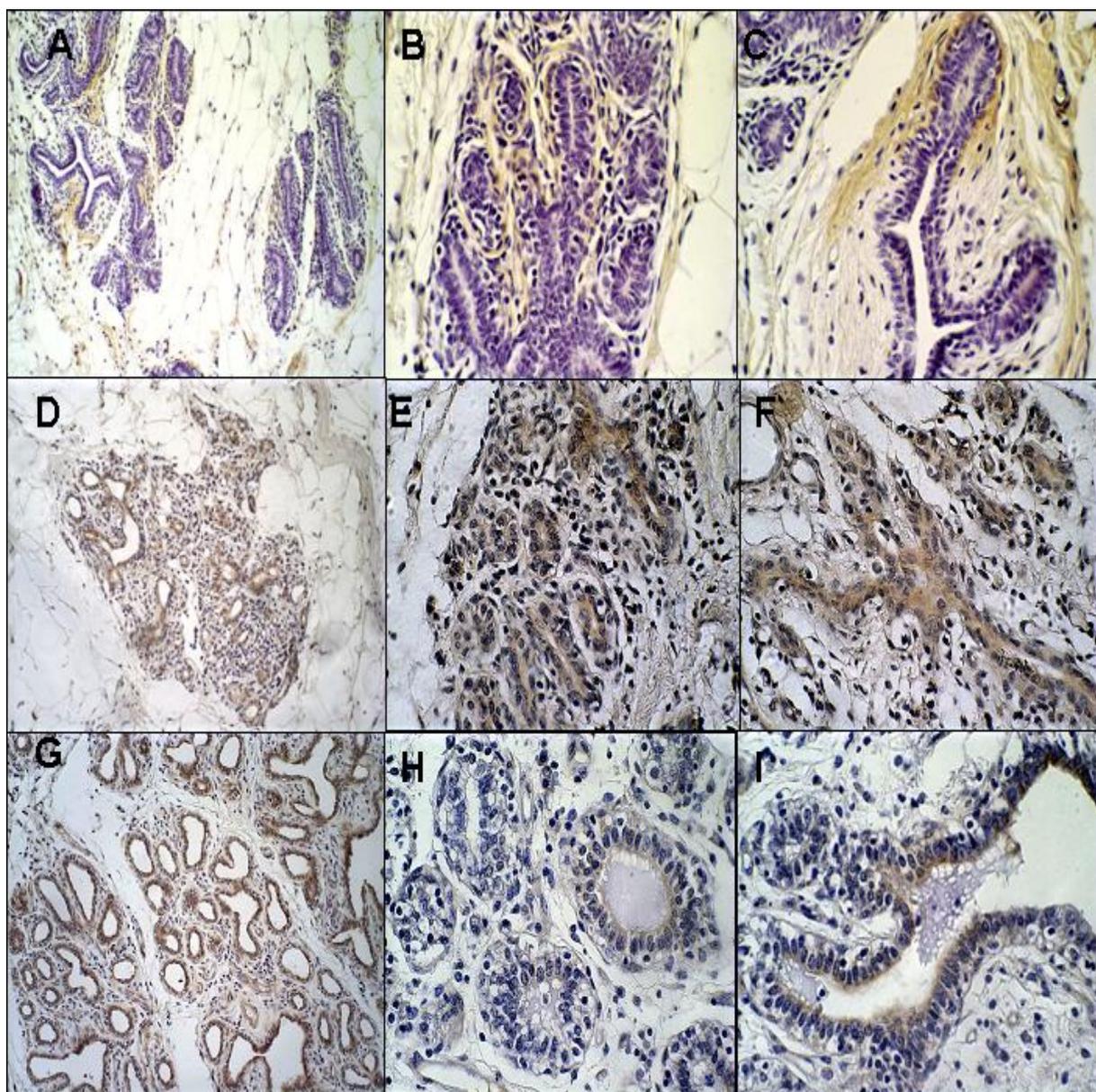


FIGURA 5 – Imunolocalização do receptor ActRIIA na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.

A, D, G) 20x; B, E, H) Marcação alveolar na 1ª fase gestacional, 60x; C, F, I) Marcação ductal na 2ª fase gestacional, 60x.

TABELA 7

Sumário das intensidades de imunocoloração para o receptor de ativina ActRIIA

Estrutura	Não Gestante	1ª Fase Gestacional	2ª Fase Gestacional
Alveolar	+	++	+
Ductal	+	++	+
Estromal	+	+	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++, intensa.

4.5 Localização da α -inibina

4.5.1 Não gestantes

Na fase não gestante, a intensidade de imunocoloração das células alveolares, ductais e estromais foi predominantemente fraca. A expressão da cadeia α -inibina ocorreu de forma homogênea somente nas células estromais, o que não ocorreu nas células epiteliais alveolares e ductais que apresentaram maior marcação peri-alveolar e peri-ductal.

4.5.2 Primeira fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase mostrou-se fraca e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais, assim como para as estruturas estromais. A marcação ocorreu tanto no citoplasma como no núcleo das células epiteliais alveolares e ductais (Fig. 6, Tab. 8).

4.5.3 Segunda fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase seguiu o padrão demonstrado nas outras fases, ou seja, foi fraca nas células epiteliais lobulares e ductais, assim como nas células estromais. A imunocoloração também se apresentou citoplasmática e nuclear.

O padrão de expressão protéica encontrado nas duas fases de proliferação e desenvolvimento celular do período gestacional, evidencia que a expressão de α -inibina ocorre simultaneamente em grande parte das estruturas epiteliais e estromais da glândula mamária (Fig. 6, Tab. 8).

Os resultados da análise não paramétrica indicaram que a intensidade de imunocoloração nas estruturas alveolares e ductais, assim como nas células estromais não variou entre as fases estudadas ($p.>0,05$, Tab. 8).

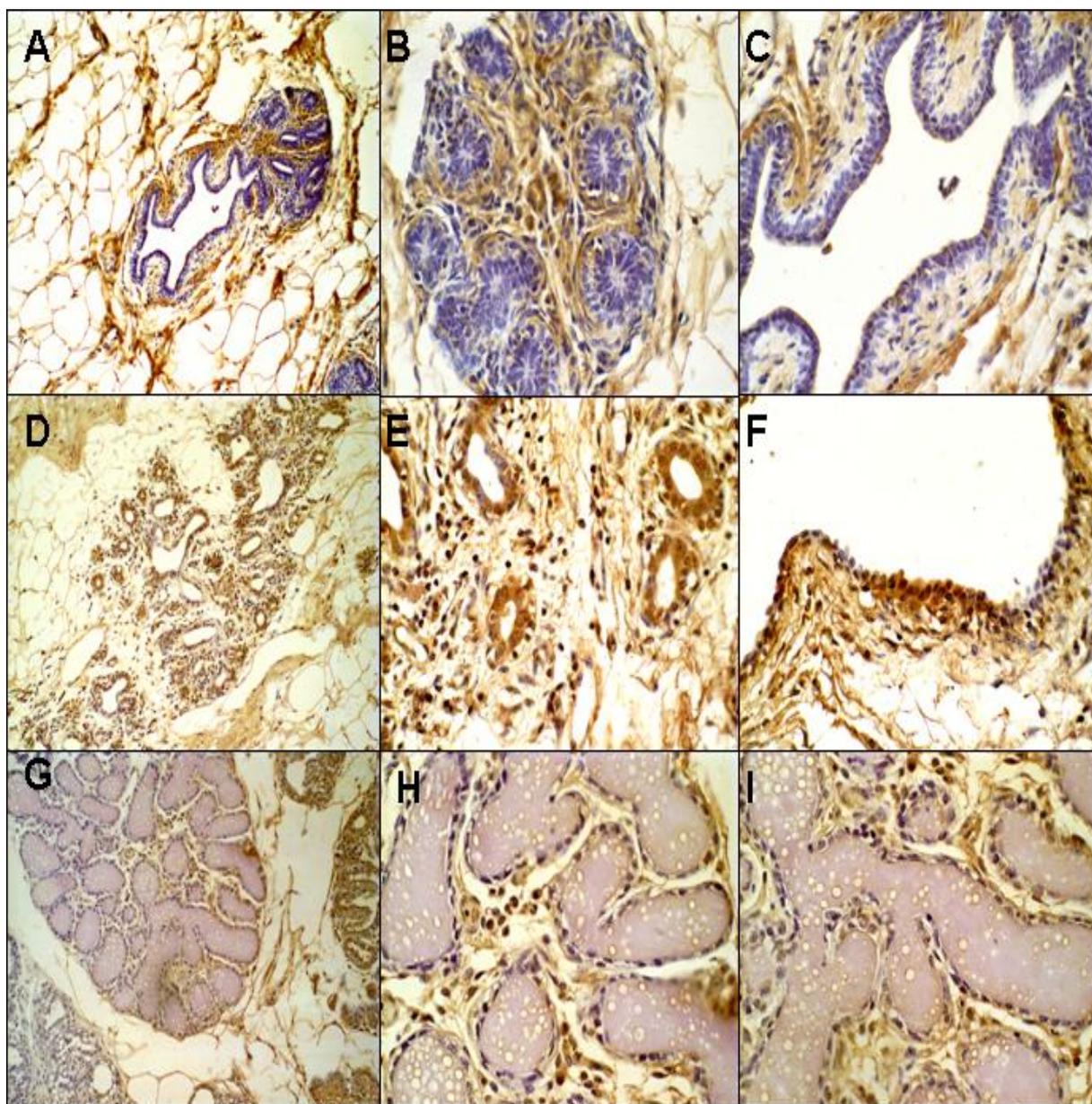


FIGURA 6 – Imunolocalização de α -inibina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.

A, D, G) 20x; B, E, H) Marcação alveolar na 1ª fase gestacional, 60x; C, F, I) Marcação ductal na 2ª fase gestacional, 60x.

TABELA 8

Sumário das intensidades de imunocoloração para a subunidade α -inibina

Estrutura	Não Gestante	1ª Fase Gestacional	2ª Fase Gestacional
Alveolar	+	+	+
Ductal	+	+	+
Estromal	+	+	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++, intensa.

4.6 Localização da folistatina

4.6.1 Não gestantes

A intensidade de imunocoloração da folistatina na fase em que a mama encontra-se com proliferação celular influenciada pelo ciclo estral, foi moderada e de forma heterogênea nas células epiteliais alveolares e ductais. Em relação às células estromais, a imunocoloração também demonstrou-se moderada e de forma homogênea. A imunocoloração se localizou tanto no citoplasma, quanto no núcleo das células epiteliais alveolares e ductais (Fig. 7, Tab. 9).

4.6.2 Primeira fase gestacional

A intensidade de imunocoloração predominante nesta fase mostrou-se moderada e de forma homogênea nas células epiteliais alveolares e ductais. Em relação ao estroma a imunocoloração demonstrou-se fraca e de forma homogênea. A imunocoloração se localizou tanto no citoplasma, quanto no núcleo das células epiteliais alveolares e ductais.

4.6.3 Segunda fase gestacional

Na última fase de desenvolvimento mamário gestacional, a intensidade da imunocoloração predominante foi a moderada de forma homogênea. Tal marcação ocorreu nas células epiteliais alveolares e ductais, se localizando tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. Em relação ao estroma a imunocoloração demonstrou-se fraca e homogênea.

A análise não paramétrica demonstrou que a intensidade de imunocoloração da folistatina nas estruturas epiteliais alveolares e ductais, não diferiu entre as fases ($p>0,05$). Contudo, a intensidade de imunocoloração da folistatina nas células estromais foi mais intensa na fase não gestacional que em ambas as fases gestacionais ($p<0,05$, Tab. 9).

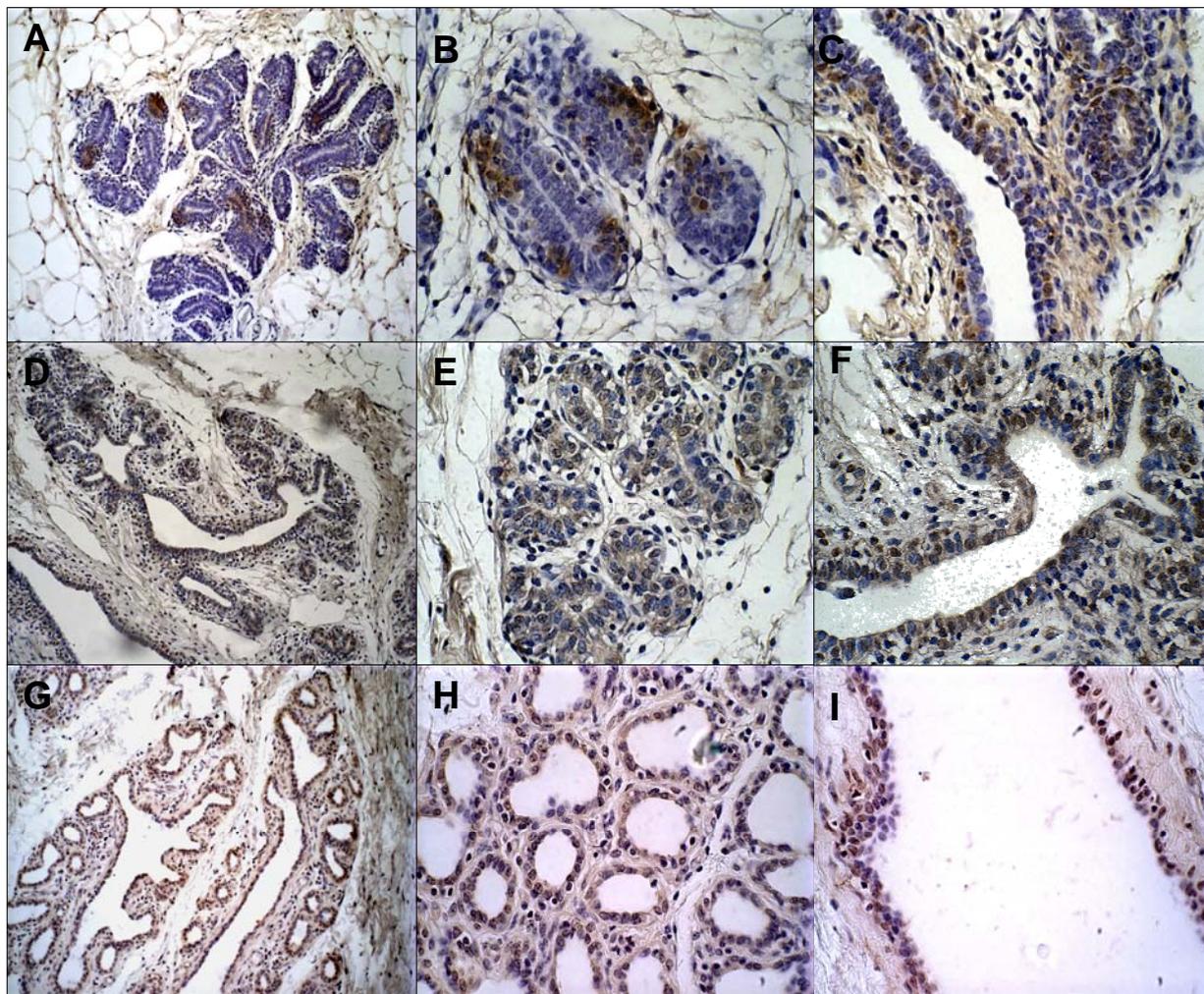


FIGURA 7 – Imunolocalização da folistatina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.

A, D, G) 20x; **B, E, H)** Marcação alveolar na 1ª fase gestacional, 60x; **C, F, I)** Marcação ductal na 2ª fase gestacional, 60x.

TABELA 9

Sumário das intensidades de imunocoloração para folistatina

Estrutura	Não Gestante	1ª Fase Gestacional	2ª Fase Gestacional
Alveolar	++	++	++
Ductal	++	++	++
Estromal	++	+	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++, intensa.

TABELA 10

Sumário das intensidades de imunocoloração para β A, β B, α -inibina, ActRIB, ActRIIA e FS durante a fase não gestacional, mamogênese e lactogênese.

Proteína	Alveolar			Ductal			Estromal		
	Não gestante	Mamogênese	Lactogênese	Não gestante	Mamogênese	Lactogênese	Não gestante	Mamogênese	Lactogênese
β A	++	+++	++	++	+++	++	++	++	+
β B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ActRIB	+	++	+	+	++	+	++	++	+
ActRIIA	+	++	+	+	++	+	+	+	+
α	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FS	++	++	++	++	++	++	++	+	+

As unidades de imunocoloração foram baseadas na seguinte escala de intensidade de coloração: 0, Ausente; +, Fraca; ++, Moderada; +++, intensa.

4.7 Expressão gênica da cadeia β A Ativina/Inibina

A reação de PCR em tempo real indicou que o mRNA da cadeia β A ativina/inibina é expresso na glândula mamária bovina de animais expostos ou não aos hormônios gestacionais. O teste de Newman-Keuls indicou que não houve diferenças significativas entre o ΔC_T dos grupos: não gestante ($10,52 \pm 5,13$) e gestante na 1^a ($9,31 \pm 4,32$) e 2^a ($7,36 \pm 3,31$) fase do desenvolvimento mamário (Fig. 8a). Assim, o grupo na 1^a fase do desenvolvimento mamário gestacional apresentou a expressão de mRNA da cadeia β A, 2,32 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) vezes maior que o grupo não gestante e o grupo na 2^a fase do desenvolvimento mamário gestacional apresentou a expressão de mRNA da cadeia β A, 8,96 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) vezes maior que o grupo não gestante (Fig. 8b).

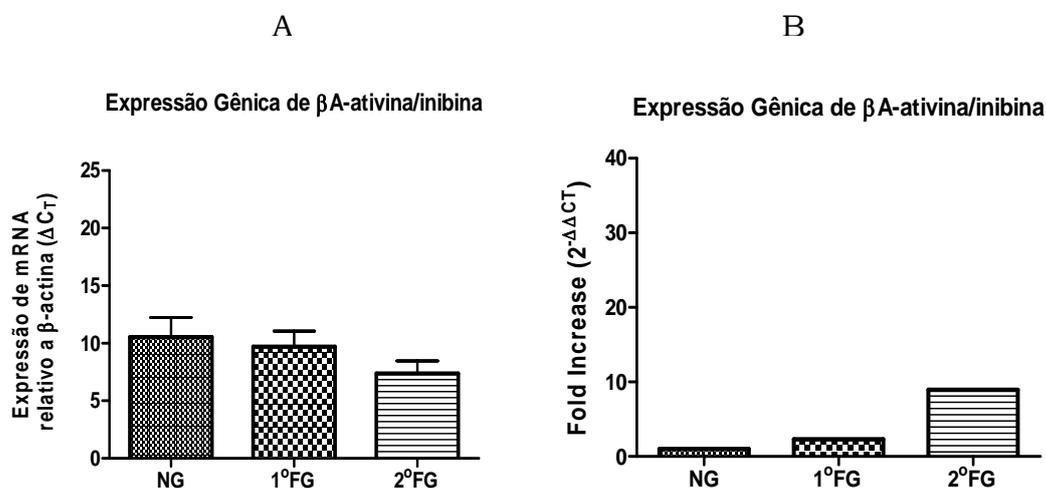


Figura 8: Expressão do mRNA da cadeia β A ativina/inibina relativa a β -actina nos períodos não gestacional (NG), 1^o fase gestacional (1^o FG) e 2^o fase gestacional (2^o FG). **A** = ΔC_T ; **B** = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4.8 Expressão gênica da cadeia β B Ativina/Inibina

A equação $2^{-\frac{\Delta\Delta CT}{A}}$ demonstrou que o mRNA da cadeia β B foi 0,86 vezes mais expresso na 1ª fase e 38 vezes mais expresso na 2ª fase gestacional quando comparado a fase não gestacional (Fig. 9b). Embora a referida equação tenha demonstrado um claro aumento da expressão do mRNA da cadeia β B na glândula mamária dos animais na 2ª fase gestacional, não houve diferenças significativas entre as três fases. O ΔC_T da cadeia β B, foi similar na mama de animais não gestantes ($12,33 \pm 6,24$) e animais na 1ª fase gestacional ($12,54 \pm 3,99$) e não diferiu significativamente na 2ª fase gestacional ($7,08 \pm 5,13$) (Fig. 9a).

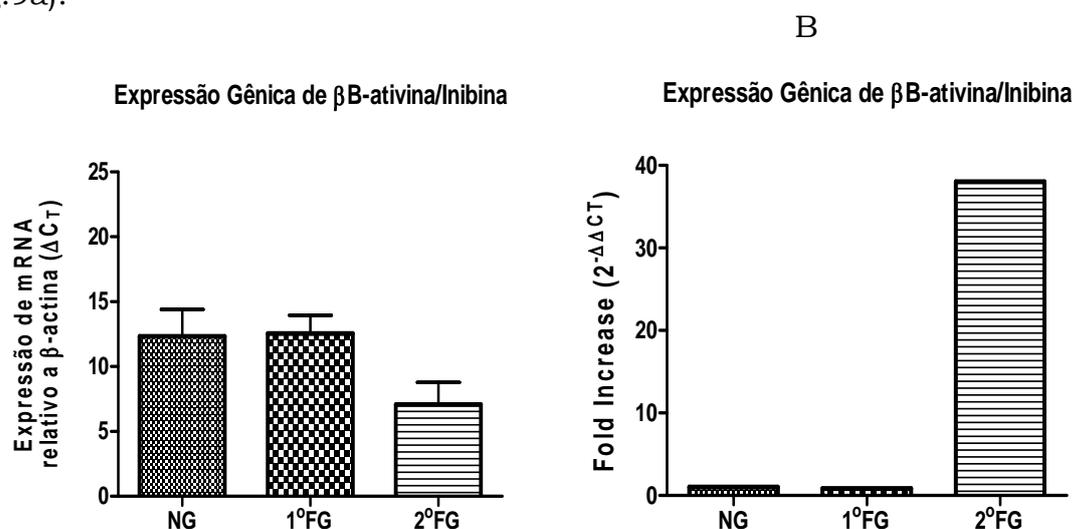


Figura 9: Expressão do mRNA da cadeia β B ativina/inibina relativa a β -actina nos períodos não gestacional (NG), 1º fase gestacional (1º FG) e 2º fase gestacional (2º FG). **A** = ΔC_T ; **B** = $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.9 Expressão gênica do receptor ActRIB

O ΔC_T do receptor ActRIB foi similar entre as fases não gestacional ($16,04 \pm 4,42$) e 1ª fase ($18,43 \pm 4,46$), contudo o ΔC_T da 2ª fase gestacional ($8,18 \pm 1,98$) foi significativamente menor que o ΔC_T das outras fases ($P < 0,05$) (Fig.10a). Assim, a equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ demonstrou que o mRNA do receptor ActRIB foi 0,19 vezes mais expresso na 1ª fase gestacional e 231,66 vezes mais expresso na 2ª fase gestacional quando comparada a fase não gestacional (Fig.10b).

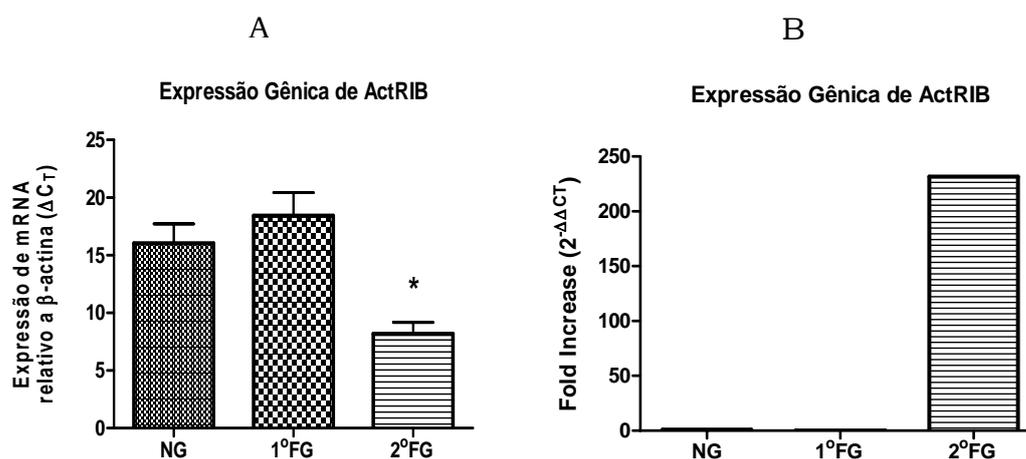


Figura 10: Expressão do mRNA do receptor ActRIB relativa a β -actina nos períodos não gestacional (NG), 1º fase gestacional (1º FG) e 2º fase gestacional (2º FG). * indica que a 2ºFG apresentou uma menor expressão relativa quando comparada a 1ºFG ($P < 0,01$) e a fase NG ($P < 0,05$). **A** = ΔC_T ; **B** = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4.10 Expressão gênica do receptor ActRIIA

O teste de Newman-Keuls não indicou diferenças significativas na expressão do mRNA do receptor ActRIIA durante as fases de desenvolvimento mamário estudadas. Portanto, a média do ΔC_T do receptor estudado na fase não gestacional ($10,31 \pm 5,72$) não diferiu da 1ª fase gestacional ($11,08 \pm 2,97$) ou da 2ª fase gestacional ($6,27 \pm 6,40$) (Fig. 11a). A equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ indicou que na 1ª fase gestacional o mRNA do receptor ActRIIA foi 0,59 vezes mais expresso que na fase não gestacional e 16,41 vezes mais expresso na 2ª fase gestacional que na fase não gestacional (Fig. 11b).

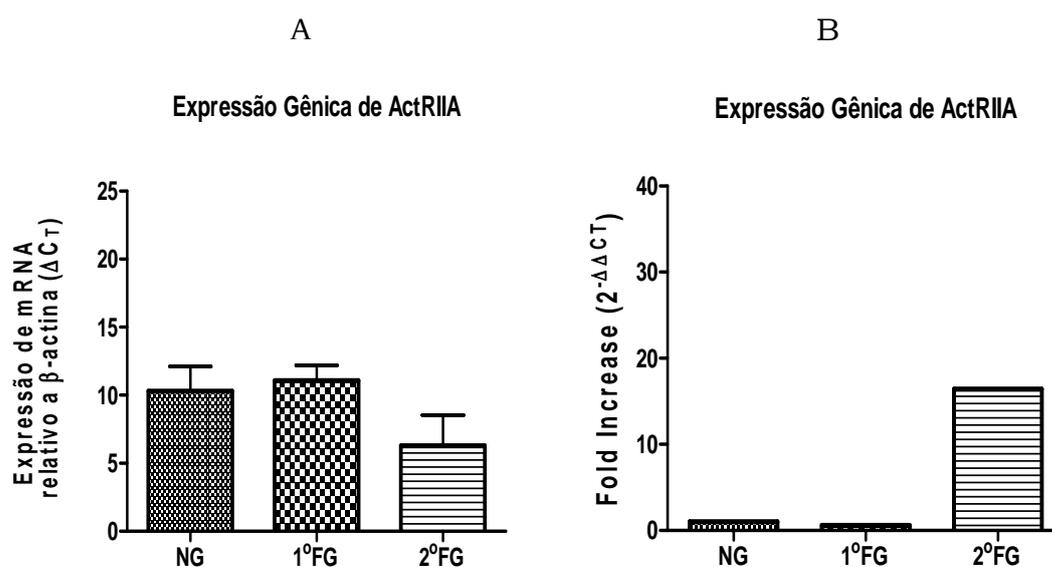


Figura 11: Expressão do mRNA do receptor ActRIIA relativa a β -actina nos períodos não gestacional (NG), 1ª fase gestacional (1º FG) e 2ª fase gestacional (2º FG). **A** = ΔC_T ; **B** = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4.11 Expressão gênica de α -inibina

A quantificação relativa do mRNA da β -actina, demonstrou que o seu ΔC_T apresentou uma expressão significativamente menor na 1^o ($5,50 \pm 3,92$) e 2^a ($4,43 \pm 4,25$) fases gestacionais, quando comparadas a fase não gestacional ($9,28 \pm 2,99$) (Fig. 12a). Portanto, a 1^a e a 2^a fases gestacionais apresentaram a expressão do mRNA da cadeia α -inibina 13,71 e 28,89 vezes maior que a fase não gestacional (Fig. 12b).

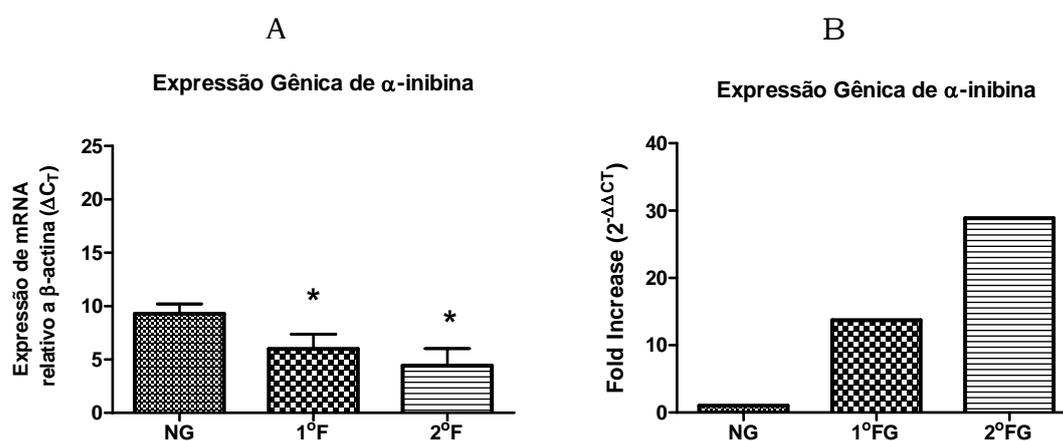


Figura 12: Expressão do mRNA de α -inibina relativa a β -actina nos períodos não gestacional (NG), 1^o fase gestacional (1^o FG) e 2^o fase gestacional (2^o FG). * indica que na figura A, o ΔC_T da fase não gestacional foi maior que o ΔC_T da 1^oFG e a 2^oFG ($P < 0.05$). **B** = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4.12 Expressão gênica de Folistatina

O mRNA da folistatina apresentou expressão similar durante as 3 fases de desenvolvimento mamário estudadas. Assim, a média do ΔC_T da fase não gestacional ($7,30 \pm 3,28$) não diferiu da média do ΔC_T da 1ª fase gestacional ($6,95 \pm 3,80$) e da 2ª fase gestacional ($4,00 \pm 3,26$) (Fig. 13a). A equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ indicou que na 1ª fase gestacional o mRNA da folistatina foi 1,28 vezes mais expresso que na fase não gestacional e 9,86 vezes mais expresso na 2ª fase gestacional que na fase não gestacional (Fig. 13b).

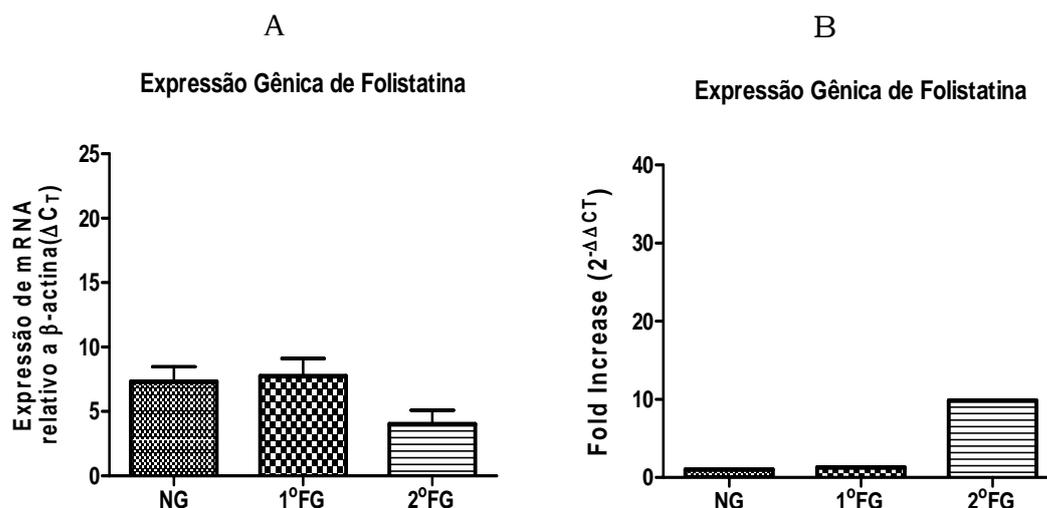


Figura 13: Expressão do mRNA da folistatina relativa a β -actina nos períodos não gestacional (NG), 1ª fase gestacional (1º FG) e 2ª fase gestacional (2º FG). **A** = ΔC_T ; **B** = $2^{-\Delta\Delta C_T}$.