

Enrrico Bloise

**Expressão e Localização de β A/ β B Ativina, Seus
Receptores ActRIB e ActRIIA, de α -Inibina e de
Folistatina na Glândula Mamária Bovina
Gestacional**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Belo Horizonte – MG
2007**

Enrrico Bloise

**Expressão e Localização de β A/ β B Ativina, Seus
Receptores ActRIB e ActRIIA, de α -Inibina e de
Folistatina na Glândula Mamária Bovina
Gestacional**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de concentração em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Fernando Marcos dos Reis

Co-orientador: Geovanni Dantas Cassali

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte - MG

2007

Este trabalho foi realizado sob orientação do

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis*

e sob co-orientação do

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali** .

* Laboratório de Reprodução Humana

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina –
UFMG

Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo

Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB – UFMG

Fone: 3248-9484/3499-2929 FAX: 3248-9299

e-mail: reis@medicina.ufmg.br

** Laboratório de Patologia Comparada

Departamento de Patologia Geral – ICB – UFMG

Fone: 3499-2891 FAX: 3499-2879

e-mail: cassalig@icb.ufmg.br

A todos os animais da espécie bovina
por terem fornecido à espécie
humana carne, leite, agasalhos e
trabalho mecânico.

A todas as pessoas que não medem esforços
ou dedicam as suas vidas pelo
bem estar animal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho profissional e pessoal.

Aos meus pais, Francesco Bloise e Maria José Fernandes Bloise pelo amor e apoio incondicional a todas as decisões tomadas na minha vida.

Aos meus irmãos, Fausto Bloise e Vitor Franco Bloise e suas esposas Ana Paula Ferreira Bloise e Maria Daniele Cristiny Araújo Bloise pelo incentivo e colaboração.

Aos meus sobrinhos, Dayana Fernandes, Luah Allana Araújo Bloise, Juliana Ferreira Bloise e José Miguel Ferreira Bloise, por fazerem a minha vida mais feliz.

Ao Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, por aceitar me orientar durante o mestrado e por ter sido um modelo de pessoa e de pesquisador a ser seguido durante toda a minha carreira profissional.

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, por ter prontamente aceito co-orientar a minha dissertação de mestrado e por ter me acolhido em seu laboratório durante as análises de microscopia.

A Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis por ter me recebido em seu laboratório e por ter influenciado bastante a minha vida profissional pelo seu exemplo de dedicação aos seus alunos e ao curso de pós graduação em Fisiologia e Farmacologia.

Ao Prof. Dr. Celso Cândido Coimbra por ter me ensinado muitas práticas laboratoriais e por ter me auxiliado a importar alguns reagentes para a confecção desta dissertação

A Profa. Dra. Umeko Marubayashi por estar sempre disposta a ajudar a todos no laboratório com seus conhecimentos práticos e teóricos.

Aos amigos Alex Porto, Cláudio Heitor, Fabiano Rodrigues, Laura Leite, Luciana Firmes, Luciano Máximo, Márcia Cristina, Natasha Ricci, Rosemary Bastos e Sarah Altoé por terem dividido comigo tantas alegrias e tristezas durante o mestrado.

Aos técnicos do laboratório, André Pimenta, Janine Ivo e Patrícia Mítre por contribuírem de forma ativa e definitiva na confecção dos experimentos.

A técnica do laboratório de Morfologia, Maristane por ter confeccionado as lâminas histológicas com zelo e profissionalidade.

A colega de mestrado Jaqueline Dantas por ter intermediado os contatos necessários com o Frigorífico Industrial de Betim Ltda, para a aquisição das amostras de mama bovina.

Aos dirigentes e funcionários do Frigorífico Industrial de Betim Ltda, por terem autorizado a coleta das amostras e por fazerem todo o possível para que eu pudesse coletar as mesmas.

Ao Prof. Wylie Vale (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) por ceder gentilmente os anticorpos anti β A, anti-FS, anti-ActRIB e anti-ActRIIA utilizados neste estudo.

Aos colegas de laboratório e de pós - graduação, Alécio, Alex, Ana Cristina, Ana Luíza, Augusto, Daniela, Daniel, Érika, Fabiano, Hélen, João Vaz, Juliana, Kinulpe, Marcivane, Michele, Najara, Renato, Samuel e Virgínia, por se tornaram pessoas muito estimadas por mim.

A Laura Aparecida Fernandes do Carmo – Fundação Casa de Ruy Barbosa, RJ - por ter feito as correções dos erros de Português que foram necessárias.

RESUMO

Ativinas são fatores de crescimento pertencentes a superfamília de fatores de crescimento β (TGF- β) e agem através dos receptores ActRIB e ActRIIA e seus efeitos são antagonizados pelas inibinas e folistatinas. As ativinas estão relacionadas ao crescimento ductal mamário e à diferenciação lóbulo-alveolar de camundongos. Por esse motivo, o presente trabalho avaliou a expressão gênica e protéica de β A/ β B, ActRIB e ActRIIA, inibina e folistatina na glândula mamária de novilhas gestantes e não gestantes. As glândulas mamárias foram obtidas a partir de novilhas da raça nelore não gestantes (NG, n=9) e gestantes na 1^o fase (GP, n=9) e 2^o fase (GS - n=9) do desenvolvimento mamário gestacional. O tecido mamário foi analisado por imunohistoquímica e PCR em tempo real. Os anticorpos primários utilizados foram os policlonais de coelho anti- β A (1:400), anti-ActRIB (1:200), anti-ActRIIA (1:200) e anti-FS (1:200) e os policlonais de cabra anti- β B (1:200) e anti- α (1:200), seguidos pela técnica de coloração por streptavidina-peroxidase. A imunocoloração ductal e lóbulo-alveolar de β A, ActRIB e ActRIIA, foi mais intensa no grupo GP que nos grupos NG e GS ($p < 0.05$, ANOVA, Kruskal-Wallis e teste de Dunn). A subunidade β B ativina, a FS e a INB foram localizadas nas células epiteliais alveolares e ductais com intensidade de imunocoloração similar em todas as fases. A região estromal foi imunopositiva para todas as proteínas nas 3 fases estudadas. Os mRNAs das subunidades β A/ β B, FS e ActRIIA foram similarmente expressos nas 3 fases estudadas. Contudo, o mRNA da cadeia α -INH foi mais expresso durante a fase gestacional e o receptor ActRIB foi mais expresso somente durante a lactogenesis. Concluindo, este estudo demonstra pela primeira vez que as subunidades β A e β B da ativina, os receptores ActRIB e ActRIIA, α -inibina e FS são expressos nas estruturas estromais ductais e lobulares durante o desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária bovina.

ABSTRACT

Gestational Expression of β Activin, ActRIB and ActRIIA Receptors, α -Inhibin and Follistatin in Bovine Mammary Gland.

Activins belong to the transforming growth factor β superfamily and bind selectively to ActRIB and ActRIIA receptors. Their effects are antagonized by inhibins (INH) and follistatins (FS). Since activins have been related to mammary ductal elongation and lobular-alveolar differentiation in mice, we evaluated gene and protein expression of Activin- β A/ β B subunits, ActRIB and ActRIIA receptors, FS and α -INH in the mammary gland of nulliparous and pregnant heifers. Mammary glands were obtained from beef heifers slaughtered in nulliparous (NP; n=9), pregnant in the 1st (60-120 days - mammogenesis; n=9) and in the 2nd stages of gestation (150-210 days – lactogenesis; n=9). Mammary tissue was analyzed by immunohistochemistry and Real Time PCR. We found a higher intensity of ductal and lobular immunostaining for β A, ActRIB and ActRIIA in the mammogenesis group when compared to NP and lactogenesis groups, however the stromal cells displayed less immunostaining for β A and ActRIB during lactogenesis ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's test). Activin β B subunit, FS and α -INH proteins were localized in ductal, lobular and stromal cells with similar intensity during all the stages. The mRNA transcripts of Activin- β A/ β B subunits, FS and ActRIIA were expressed equally in the mammary tissue of non-pregnant and pregnant heifers. However α -INH mRNA expression was up regulated during gestation and ActRIB mRNA was up regulated only during lactogenesis. In conclusion, this study firstly shows that β A/ β B activin, ActRIB, ActRIIA, α -INH and FS are expressed in stromal, ductal and lobular structures in the bovine mammary gland during non-gestational and gestational mammary gland development and differentiation.

SUMÁRIO

1. Introdução e revisão da literatura	01
1.1 Introdução	01
1.2 Revisão de literatura	04
1.2.1 Morfogênese da glândula mamária	04
1.2.2 Desenvolvimento embrionário	05
1.2.3 Desenvolvimento fetal	07
1.2.4. Morfogênese neonatal e pré-puberal	08
1.2.5 Endocrinologia da morfogênese mamária durante a gravidez e lactação	10
1.2.6 Ativinas, inibinas e folistatinas	15
1.2.7 Ativinas, inibinas e folistatina na glândula mamária	18
2. Justificativa e objetivos	21
2.1 Justificativa	21
2.2 Objetivo geral	22
2.3 Objetivo específico	22
3. Material e métodos	23
3.1 Sujeitos	23
3.1.1 Determinação da idade gestacional	24
3.1.2 Considerações Éticas	25
3.2 Métodos	25
3.2.1 Coleta das amostras	25

3.2.2	Histologia e imunoistoquímica	26
3.2.2.1	Inclusão e corte	26
3.3.2.2	Imunoistoquímica	27
3.2.2.3	Coloração imunoistoquímica da cadeia β A ativina/inibina, de seus receptores, ActRIB e ActRIIA e da folistatina.	30
3.2.2.4	Coloração imunoistoquímica das cadeias: β B ativina/inibina e α -inibina.	32
3.2.2.9	Leitura das lâminas	33
3.2.3	PCR quantitativa em tempo real	34
3.2.3.1	Análise de RNA	34
3.2.3.2	Extração de RNA	34
3.2.3.3	Síntese de DNA complementar (cDNA)	36
3.2.3.4	Seleção de oligonucleotídeos iniciadores para a PCR em tempo real	37
3.2.3.5	PCR em tempo real	39
4.	Resultados	42
4.1	Localização da cadeia β A Ativina/Inibina	44
4.1.1	Não gestantes	44
4.1.2	Primeira fase gestacional	44
4.1.3	Segunda fase gestacional	45
4.2	Localização da cadeia β B Ativina/Inibina	47
4.2.1	Não gestantes	47

4.2.2	Primeira fase gestacional	48
4.2.3	Segunda fase gestacional	48
4.3	Localização do receptor ActRIB	50
4.3.1	Não gestantes	50
4.3.2	Primeira fase gestacional	50
4.3.3	Segunda fase gestacional	51
4.4	Localização do receptor ActRIIA	53
4.4.1	Não gestantes	53
4.4.2	Primeira fase gestacional	53
4.4.3	Segunda fase gestacional	54
4.5	Localização da α -inibina	56
4.5.1	Não gestantes	56
4.5.2	Primeira fase gestacional	56
4.5.3	Segunda fase gestacional	57
4.6	Localização da folistatina	59
4.6.1	Não gestantes	59
4.6.2	Primeira fase gestacional	60
4.6.3	Segunda fase gestacional	60
4.7	Expressão gênica da cadeia β A Ativina/Inibina	63
4.8	Expressão gênica da cadeia β B Ativina/Inibina	64
4.9	Expressão gênica do receptor ActRIB	65
4.10	Expressão gênica do receptor ActRIIA	66
4.11	Expressão gênica de α -inibina	67

4.12 Expressão gênica de Folistatina	68
5. Discussão	69
6. Conclusões	81
7. Bibliografia	83

LISTA DE ABREVIATURAS

(-/-)	animal Knock-out
µg	micro-grama
µL	micro-litro
ActRIB	receptor da ativina do tipo I
ActRIIA	receptor da ativina do tipo II
BMP	do inglês – Bone Morphogenetic Protein
cm	centímetro
cDNA	DNA complementar
C_T	do inglês - threshold cycle
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
EGF	do inglês – Epidermal Growth Factor
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
ERα	receptor alpha do estradiol
FGF	do inglês – Fibroblast Growth Factor
FLRG	do inglês – Follistatin Related Gene
FS	folistatina
FS288	folistatina isoforma 288
FS303	folistatina isoforma 303
FS315	folistatina isoforma 315

FSRP	do inglês – Follistatin Related Protein
GH	do inglês – Growth Hormone
HLP	hormônio lactogênico placentário
IGF-I/II	do inglês – Insulin-Like Growth Hormone I/II
IgG	imuglobulina G
mL	mililitro
mm	milímetro
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	pares de base
PBS	salina fosfatada tamponada
PCR	reação em cadeia da polimerase
PRL	prolactina
RNA	ácido ribonucléico
RT	retro-transcrição
RT-PCR	do inglês – reverse transcriptase polimerase chain reaction
TDLUs	unidades lobulares ductais terminais
TEBs	botões terminais
TGF-β	do inglês – Transforming Growth Factor - β

LISTA DE FIGURAS

1. Fluxograma do estudo.	41
2. Imunolocalização da sub-unidade β A ativina/inibina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.	46
3. Imunolocalização da sub-unidade β B ativina/inibina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.	49
4. Imunolocalização do receptor ActRIB na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.	52
5. Imunolocalização do receptor ActRIIA na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.	55
6. Imunolocalização de α -inibina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.	56
7. Imunolocalização da folistatina na glândula mamária bovina púbere não gestante e gestante.	61
8. Expressão gênica da cadeia β A ativina/inibina	63
9. Expressão gênica da cadeia β B ativina/inibina	64
10. Expressão gênica da ActRIB.	65
11. Expressão gênica da ActRIIA.	66
12. Expressão gênica α -inibina.	67
13. Expressão gênica folistatina.	68

LISTA DE TABELAS

1.	Protocolo utilizado para os diferentes ensaios imunoiistoquímicos.	32
2.	Escala de distribuição da intensidade de coloração dos tecidos imunocorados.	34
3.	Seqüências de oligonucleotídeos usados como <i>primers</i> para as reações de PCR em tempo real.	38
4.	Sumário das medianas relativas às intensidades de imunocoloração para a subunidade β A ativina/inibina.	47
5.	Sumário das medianas relativas as intensidades de imunocoloração para a subunidade β B ativina/inibina.	50
6.	Sumário das medianas relativas às intensidades de imunocoloração para o receptor de ativina ActRIB.	53
7.	Sumário das medianas relativas às intensidades de imunocoloração para o receptor de ativina ActRIIA.	56
8.	Sumário das medianas relativas às intensidades de imunocoloração para a subunidade α -inibina.	59
9.	Sumário das medianas relativas às intensidades de imunocoloração para a enzima folistatina.	62
10.	Sumário das intensidades de imunocoloração para β A, β B, α -inibina, ActRIB, ActRIIA e FS durante a fase não gestacional, mamogenesis e lactogenesis.	62

1. Introdução e revisão de literatura

1.1 Introdução

A milhares de anos, bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos foram domesticados, e o leite proveniente destas espécies tornou-se um alimento nutricionalmente importante na dieta humana. Esculturas e gravuras em paredes de cavernas, datadas de 2300 antes de cristo, são os primeiros indícios do interesse do homem em entender os complexos processos relacionados à reprodução animal e à produção de leite (SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

A despeito do papel central que a lactação desempenha nas estratégias reprodutivas, muito ainda tem que ser aprendido sobre o desenvolvimento da glândula mamária. Embora camundongos tenham sido usados como modelo primário para se investigar a fisiologia da glândula mamária, é improvável que uma única espécie possa prover um modelo compreensivo que englobe todas as outras espécies. Isto ocorre porque a regulação endócrina e parácrina, assim como a estrutura e a arquitetura tecidual da glândula mamária podem diferir entre as espécies (HOVEY *et al.*, 1999).

Estudos demonstram similaridades na arquitetura tecidual do parênquima mamário em desenvolvimento entre humanos e bovinos.

Desta maneira, certos aspectos da diferenciação e do crescimento mamário bovino podem ser aplicáveis ao desenvolvimento mamário humano. De modo oposto, devido às desigualdades entre os tecidos mamários de humanos e de camundongos, aspectos do desenvolvimento mamário humano podem ser refratários ao uso de camundongos como modelos investigativos (CAPUCO *et al.*, 2005).

Desde suas origens embrionárias, a glândula mamária feminina é submetida a um curso de desenvolvimento ductal que viabiliza o estabelecimento de estruturas alveolares durante a gravidez, previamente ao início da lactogênese. Tal desenvolvimento ocorre devido a interações entre o epitélio e o estroma durante os estágios de proliferação celular. Essas interações são reguladas por diferentes hormônios e fatores de crescimento, que podem diferir entre as espécies (HOVEY *et al.*, 2002).

Ativinas e inibinas são fatores de crescimento relacionados ao desenvolvimento da glândula mamária. Pertencem à superfamília de fatores de crescimento β (Transforming Growth Factor β - TGF- β) e estão envolvidas no controle de funções reprodutivas e não reprodutivas (VALE W, 1988). Suas subunidades são expressas nas células epiteliais ductais e lobulares do tecido mamário de humanos, ratos e camundongos (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997; DI LORETO *et al.*, 1999; BUSSMANN *et al.*, 2004).

Essas moléculas agem em suas células-alvo através de complexos de receptores heteroméricos serino-treonina quinase do tipo II, (ActRIIA e

ActRIIB) ou através de um receptor do tipo I, (ActRIA e ActRIB). Quando estimulados, estes receptores ativam proteínas Smads responsáveis por regular a expressão gênica (VALE W, 1988; BERNARD *et al.*, 2001).

A folistatina (FS) é uma proteína monomérica que possui ação neutralizante sobre as ativinas e, em menor intensidade, sobre as demais proteínas da superfamília TGF- β (SIDIS *et al.*, 2002). Adicionalmente, uma isoforma da folistatina, a proteína relacionada à folistatina (FSRP), se liga à ativina com a mesma afinidade e irreversibilidade que a FS (SAITO *et al.*, 2005).

A expressão da FS no tecido mamário foi caracterizada somente em uma espécie de roedores, possuindo um importante papel na regulação da morfogênese desta glândula durante a prenhez e a lactação em ratas (BUSSMANN *et al.*, 2004), não havendo descrição de sua expressão em tecido mamário humano ou bovino. A FSRP não foi caracterizada no tecido mamário de nenhuma espécie.

O papel fisiológico destes fatores de crescimento no desenvolvimento da glândula mamária foi evidenciado pela utilização de fêmeas de camundongos geneticamente modificadas. Quando adultos, estes animais apresentaram desenvolvimento ductal e diferenciação do epitélio alveolar limitado, além de não produziram leite (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997).

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Morfogênese da glândula mamária

O parênquima da glândula mamária lactante é composto por estruturas epiteliais alveolares e ductais, que estão intimamente associadas a tecidos conectivos que compõem o estroma. O estroma da glândula mamária lactante é primariamente composto por entidades celulares e também por entidades não celulares que compõem os tecidos conectivos que circundam as estruturas epiteliais (SILBERSTEIN, 2001). Os componentes celulares do estroma incluem as células mioepiteliais, os fibroblastos, as células endoteliais associadas aos vasos sanguíneos e os leucócitos teciduais, enquanto os componentes não celulares incluem o colágeno e outras proteínas conectivas teciduais (DJONOV *et al.*, 2001). Em contraste com a glândula mamária lactante, existe uma quantidade considerável de tecido adiposo no tecido mamário de fetos em desenvolvimento e no tecido mamário de animais desde o nascimento até estágios avançados de gravidez (SILBERSTEIN, 2001).

A glândula mamária é um órgão dinâmico que é submetido a várias mudanças morfofuncionais durante o seu desenvolvimento, que começa na vida fetal e prossegue além do começo da lactação. Grande parte destas mudanças ocorre após o nascimento, estágio em que o ritmo de desenvolvimento é muito mais rápido quando comparado à fase embrionária (OLLIVIER-BOUSQUET & DEVINOY, 2005). No começo da gravidez, o sistema endócrino sofre mudanças bruscas que são responsáveis pela indução do ciclo lactacional. Tal ciclo pode ser dividido em quatro estágios consecutivos: mamogênese, lactogênese, galactopoiese e involução. Todas as fases são controladas pela associação de diferentes hormônios e fatores de transcrições, e também são influenciadas por fatores externos, nutricionais e comportamentais (SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

1.2.2 Desenvolvimento embrionário

O primeiro estágio de desenvolvimento mamário ocorre com o surgimento de uma estrutura denominada “fita ou listra mamária” e continua com a formação da faixa mamária, da linha mamária, da crista mamária, da elevação mamária e finalmente do botão mamário (*mammary streak*, *mammary line*, *mammary crest*, *mammary hillock* and *mammary bud* respectivamente) (LARSON, 1985).

A fita mamária é um espessamento das células ectodérmicas da superfície ventral do embrião, que surge quando o embrião bovino apresenta comprimento entre a cabeça e as nádegas em torno de 14 mm, o que corresponde à idade fetal de 32 dias em média (SHEFFIELD, 1987). Ela é uma linha pálida que se origina do espessamento das células ectodérmicas que se encontram perto da estrutura primordial dos membros posteriores (LARSON, 1985). Pelo fato de existirem estruturas similares à faixa mamária nos répteis e nos pássaros, a importância desta estrutura na ontogênese da glândula mamária ainda não está totalmente elucidada (HOWARD & GUSTERSON, 2000).

Com o estabelecimento da faixa mamária, há um espessamento das células ectodérmicas até que ocorra a formação de uma linha distinta, a linha mamária. Há uma diferença sutil entre a faixa mamária e a linha mamária, e tal diferença pode ser definida como uma orientação reconhecida das células epiteliais que proliferam ao longo de uma linha distinta (LARSON, 1985; ELLIS, 1998). Adicionalmente, a linha mamária bovina não se prolonga além do umbigo, enquanto que as linhas mamárias suínas e murinas se prolongam até a região torácica. Esta diferença explica por que as glândulas mamárias dos ruminantes localizam-se na região inguinal (ELLIS, 1998).

Com o estabelecimento das linhas mamárias, algumas áreas ao longo da linha proliferam mais aceleradamente. Desta forma, este perfil de proliferação celular caracteriza o estabelecimento da crista mamária

ou “*milk line*”. Quando ocorre uma compartimentalização das áreas crescentes do epitélio proliferativo, completa-se o estabelecimento da elevação mamária e o surgimento da área mesodermal, que passa a ser nomeada de mesênquima. Finalmente, quando as áreas epiteliais compartimentalizadas se tornam esféricas, ocorre a formação do botão mamário, caracterizando o último estágio do desenvolvimento mamário dos embriões bovídeos (LARSON, 1985; ELLIS, 1998; HOVEY *et al.*, 2002).

Histologicamente, o botão mamário é formado pela reorganização do epitélio da superfície, originando um bloco compacto de células epiteliais, que são separadas do mesênquima adjacente por uma membrana basal bem definida. Esses botões mamários surgem quando o embrião está se tornado um feto, quando o mesmo mede de 4 cm a 8 cm entre a cabeça e a nádega (ELLIS, 1998; HOVEY *et al.*, 2002).

1.2.3 Desenvolvimento fetal

O primeiro estágio de desenvolvimento mamário fetal bovino ocorre com a formação dos quatro botões mamários que surgem no final do desenvolvimento mamário embrionário. Logo após a formação da forma esférica, algumas células estão programadas para romperem a membrana basal, causando descontinuidade do arcabouço esférico. Este

processo forma uma pequena ramificação denominada broto primário ou “*primary sprout*” (HOVEY & TROTT, 2004). Estes brotos são as estruturas primordiais das aberturas do teto mamário responsáveis pela saída do leite para o meio externo, também denominados galactóforos (LARSON, 1985).

A canalização dos brotos mamários acontece rapidamente; isso ocorre devido à morte das células centrais do canal por falta de nutrientes, formando uma luz que se tornará a cisterna do teto. Após o crescimento e canalização do broto primário, a ramificação (denominada broto primário) bifurca-se, caracterizando os brotos secundários que se ramificam até o nascimento no feto. Essas estruturas formarão no futuro os ductos mamários que desembocarão na cisterna da glândula quando o animal estiver em lactação (LARSON, 1985, SHEFFIELD, 1987; ELLIS, 1998; HOWARD & GUSTERSON, 2000; HOVEY & TROTT, 2004).

O esboço básico do sistema excretor estará completo ao final do segundo trimestre da vida fetal, quando o feto apresentar o tamanho de 60 cm em média. À época do nascimento, a glândula mamária consistirá de uma estrutura ductal ramificada, embebida em uma camada de gordura que circunda o teto mamário (HOVEY *et al.*, 2002; SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

1.2.4. Morfogênese neonatal e pré-puberal

A glândula mamária de ruminantes recém-nascidos é composta de modestos lóbulos ramificados, conectados a uma rede de ductos rudimentares ligados a uma pequena cavidade denominada cisterna, que se comunica ao teto (SHEFFIELD, 1987; HOVEY *et al.*, 1999; CAPUCCO & ELLIS, 2005). Desde o nascimento até a puberdade, os animais crescem rapidamente, até atingirem a maturidade sexual. Uma característica importante desta fase de crescimento é o fato de que nem todos os órgãos se desenvolvem na mesma velocidade. Na bezerra recém-nascida, o parênquima mamário inicialmente se desenvolve na mesma velocidade que o resto do corpo (crescimento isométrico). Aos três meses de idade, contudo, esse crescimento é duas a quatro vezes mais rápido que o resto do corpo (crescimento alométrico) e se estende até os nove meses de idade, período em que o animal está entrando na puberdade. Dos nove aos 16 meses o crescimento da glândula mamária volta a ser isométrico (SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

Relatos na literatura demonstram que o crescimento alométrico anterior à puberdade é influenciado tanto por hormônios, quanto por fatores de crescimento (HOVEY *et al.*, 2002; STERNLICHT, 2005). Ressalte-se, contudo, que as mudanças histomorfológicas em ruminantes, relacionadas a este período, ainda não foram extensivamente caracterizadas. Nesta fase, surge uma única cisterna primordial, proveniente do ducto primário, e se estende a partir do teto

em direção à camada de gordura, originando múltiplos ductos. Cada ducto é circundado por numerosos pequenos ductos, de modo que, em uma secção horizontal, o parênquima é formado por muitas unidades ductais (SHEFFIELD, 1987; ELLIS, 1998).

O parênquima mamário bovino, similarmente ao parênquima mamário humano, apresenta um padrão de proliferação em forma de “unidades lobulares ductais terminais” (TDLU) (HOVEY *et al.*, 1999). Desta forma, a maioria da proliferação celular do parênquima mamário bovino efetua-se nos pequenos ductos das TDLUs – estruturas compactas altamente arborizadas com tecido conectivo frouxo (HOVEY *et al.*, 1999; CAPUCO *et al.*, 2002). Já em camundongos, o parênquima mamário se desenvolve na forma de longas ramificações ductais que terminam em “botões terminais” (TEBs), que são as unidades de proliferação celular do parênquima mamário murino (CAPUCO *et al.*, 2002; STERNLICHT, 2005).

Os sinais hormonais que sinalizam o começo do crescimento alométrico podem variar entre as espécies (HOVEY *et al.*, 2002). Em bezerras, a ovariectomia pré-puberal compromete o desenvolvimento mamário subsequente. A administração de estrógeno, entretanto, promove a restauração do desenvolvimento ductal em bezerras pré-puberes ovariectomizadas. Além do estrógeno, o hormônio do crescimento (GH) também exerce um papel crítico durante o desenvolvimento ductal em bezerras. A administração de GH exógeno em bezerras pré-púberes

intactas estimula o desenvolvimento da glândula mamária (PURUP *et al.*, 1993). Em roedores a prolactina (PRL) exerce um papel fundamental na formação dos TEBs. Os corpos celulares destas estruturas expressam mRNA tanto para a PRL quanto para o seu receptor (ATWOOD *et al.*, 2000). A administração de PRL exógena estimula a síntese de DNA na matriz extracelular ductal de camundongos pré-púberes (HOVEY *et al.*, 2001).

1.2.5 Endocrinologia da morfogênese mamária durante a gravidez e a lactação

Durante a gestação, verifica-se um desenvolvimento exponencial da glândula mamária, com uma notável diferenciação celular durante os estágios finais da gestação. A gestação é freqüentemente conhecida como o período de maior crescimento mamário.

A mamogênese que corresponde à 1ª fase do desenvolvimento mamário, acontece devido à ação de pelo menos quatro hormônios funcionalmente interconectados. Estes são: estradiol, progesterona, prolactina/hormônio lactogênico placentário e o GH e suas somatomedinas, IGF-I/IGF-II (OLLIVIER-BOUSQUET & DEVINOY, 2005). No começo desta fase o prolongamento das estruturas ductais e a ramificação final dos ductos mamários ocorrem principalmente pela

relação estradiol/progesterona característica desta fase, que é mantida inicialmente pelo ovário e subseqüentemente pela placenta (NEVILLE *et al.*, 2002; LAMOTE *et al.*, 2003).

Conforme o desenvolvimento mamário gestacional passa da 1ª para a 2ª fase (lactogênese), a relação entre as concentrações de estradiol/progesterona aumenta progressivamente ao longo da gestação. Esse padrão hormonal determina a diferenciação do epitélio mamário de um estado não secretor, para um estado pré-secretor (AKERS *et al.*, 2000; CAPUCO *et al.*, 2002; SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005). Ainda que os hormônios estradiol e progesterona sejam fundamentais para o desenvolvimento mamário, não há mamogênese ou lactogênese na ausência dos hormônios GH e prolactina/ lactogênio placentário (PRL/hLP). Embora as concentrações plasmáticas de GH e PRL não se alterem durante a gestação, as concentrações plasmáticas do hLP aumentam progressivamente durante a lactogênese, diminuindo sua expressão drasticamente ao se aproximar do parto (NEVILLE *et al.*, 2002).

O hormônio progesterona durante a 2ª fase gestacional possui um efeito inibitório sobre a secreção dos componentes do leite nas estruturas epiteliais da glândula mamária. Este hormônio impede portanto, que essas estruturas produzam leite copiosamente (TUCKER, 2000). Próximo ao nascimento o ovário e a placenta deixam de produzir progesterona, fazendo com que o efeito inibitório que eles exercem sobre a produção de

leite deixe de existir, permitindo assim que as células lobo alveolares comecem a secretar o colostro (SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

É importante dizer que o GH age indiretamente através dos fatores de crescimento *insulin-like growth factor I / II* (IGF-1/2). Esses não são, contudo, os únicos fatores de crescimento que possuem ação local, modulando a sobrevivência e morte celular tanto do parênquima quanto do estroma mamário (FLINT & KNIGHT, 1997; LAMOTE *et al.*, 2004; AKERS *et al.*, 2005).

Dentre os fatores de crescimento que regulam o desenvolvimento mamário bovino, podemos citar o fator de crescimento epidermal (EGF) e sua isoforma, o *transforming growth factor- α* (TGF- α). Tanto o EGF quanto seu receptor, o EGFR, são expressos no tecido mamário em vários estágios de desenvolvimento, sendo cruciais para o desenvolvimento e diferenciação alveolar de bovinos e de ovinos durante a gestação (FORSYTH, 1996; AKERS, 2006).

Pelo menos três isoformas do fator de crescimento dos fibroblastos, FGF-1, FGF-2 e FGF-7, estão envolvidas na mamogênese bovina. Elas são expressas no estroma mamário adjacente às estruturas alveolares, influenciando assim o ciclo celular das células epiteliais ductais e alveolares, principalmente durante o crescimento isométrico e durante o período de involução mamária (HOVEY *et al.*, 2001b).

Membros da superfamília de fatores de crescimento β (TGF- β) também são conhecidos por influenciarem o desenvolvimento mamário, embora o papel específico destas proteínas ainda não esteja totalmente esclarecido. Sabe-se, porém, que o TGF- β 1 possui efeito antiproliferativo sobre o parênquima mamário, apresentando uma menor expressão durante a lactogênese/ galactopoese e uma maior expressão durante a mamogênese e a involução, períodos em que ocorrem grande remodelamento celular (PLATH *et al.*, 1997; ZARZYNSKA *et al.*, 2005).

No período pré e pós-parto, grandes mudanças hormonais ocorrem, permitindo que a glândula mamária passe de um estado pré-secretor para um estado secretor em poucos dias (LAMOTE *et al.*, 2004; OLLIVIER-BOUSQUET & DEVINOY, 2005). Os hormônios que são responsáveis por manter a galactopoese são a PRL e o GH. A PRL age principalmente estimulando a expressão gênica nas células epiteliais secretoras de leite, e o GH possui um papel metabólico muito importante, redirecionando nutrientes e fluxo sanguíneo para a glândula mamária, além de estimular a proliferação celular e inibir a apoptose das células epiteliais produtoras de leite, principalmente através do IGF-I (NEVILLE *et al.*, 2002; HOVEY & TROTT, 2004; AKERS, 2006). A galactopoese é basicamente mantida pelo estímulo mecânico produzido sobre o teto, estímulo esse que promove a saída do leite. Esse estímulo provoca aumento da secreção de prolactina, de GH e de glicocorticóides que

estimulam a secreção de leite pelas células lobo alveolares (WALL & MCFADDEN, 2007).

O estímulo mecânico sobre os tetos também provoca a liberação reflexa de oxitocina e vasopressina pelos núcleos supra-ópticos e paraventriculares hipotalâmicos. A oxitocina ganha a corrente sanguínea e provoca a contração das células mioepiteliais que circundam as estruturas lobo alveolares resultando na ejeção do leite para a cisterna do teto (TUCKER, 2000). Curiosamente, as células epiteliais alveolares expressam o receptor da oxitocina e, recentemente, verificou-se que esse hormônio acelera o tráfego intracelular de caseína nas células epiteliais alveolares de coelhas, demonstrando que ele também age sobre a secreção de pelo menos um componente do leite (LOLLIVIER *et al.*, 2006). O papel da vasopressina na ejeção do leite ainda não se encontra definido, mas, em animais que vivem em condições desérticas ou que se encontram desidratados, a vasopressina causa ejeção de leite. Em animais hidratados, porém, é comumente aceito que a oxitocina seja o principal hormônio causador da ejeção de leite mediada por neuroreflexos (SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

Quando o estímulo mecânico que provoca a saída do leite para o meio externo é interrompido, começa o processo de involução mamária. Processo caracterizado por altas taxas de apoptose e remodelamento tecidual. A involução mamária possui um grande impacto sobre a lactação seguinte, de modo que a fase gestacional em que ela ocorre

poderá definir o montante de leite que será produzido na próxima lactação. Assim como em outros estágios, a involução está sobre o controle hormonal e sobre o controle da frequência da ordenha efetuada. Hormônios como o GH e fatores de crescimentos como o TGF- β 1 possuem papéis decisivos no controle desta fase (PLATH *et al.*, 1997; LAMOTE *et al.*, 2004; SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

1.2.6 Ativinas, inibinas e folistatinas

Estruturalmente relacionadas à superfamília de fatores de crescimento TGF- β , as ativinas e inibinas são dímeros protéicos que controlam diversos processos celulares como respostas imunes, funções endócrinas, diferenciação, proliferação e morte celular (HARRINSON *et al.*, 2005). A atividade desregulada desses fatores está freqüentemente associada a estados patológicos decorrentes de diferenciação celular e de processos metabólicos desordenados (MASSAGUE *et al.*, 2000).

As ativinas são secretadas como homo ou heterodímeros de subunidades β . Embora quatro diferentes genes transcrevam as subunidades β em humanos (β A, β B, β C e β E), somente dímeros de β A e β A (ativina A), β B e β B (ativina B) e β A e β B (ativina AB) se mostram biologicamente ativos. As subunidades β A e β B da ativina podem se ligar

à subunidade α da inibina e formar heterodímeros, como a inibina A (βA e α) ou a inibina B (βB e α) (HARRINSON *et al.*, 2005).

Gaddy Kurten e colaboradores, em 1995, demonstraram que as ativinas sinalizam através de interações com dois receptores transmembrânicos serino/treonina quinase, os receptores do tipo I e do tipo II. A ativina se liga inicialmente ao seu receptor do tipo II, ActRIIA e ActRIIB. Tal ligação recruta, fosforila e conseqüentemente ativa o receptor do tipo I, ActRIA e ActRIB. Durante a ativação, o receptor do tipo I se liga a um subconjunto de proteínas, as Smads reguladas por receptor (R-Smads), responsáveis por regular a expressão gênica (DERYNCK *et al.*, 1998). As inibinas se ligam aos receptores do tipo II, ActRIIA e ActRIIB, antagonizando competitivamente a sinalização da ativina, inibindo o recrutamento do receptor do tipo I. Entretanto, tal antagonismo requer a presença de um co-receptor, o betaglicano, que se liga à inibina com alta afinidade (MATHEWS & VALE, 1991; LEWIS *et al.*, 2000). Os receptores ActRIIB são passíveis de serem ligados por outros membros da superfamília TGF- β . Dentre eles podemos citar as TGF- β s e as BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). O complexo ligante-ActRIIB se liga ao receptor ActRIA. Esses dois últimos receptores apresentam, portanto, um padrão promíscuo de ligação com outros membros da superfamília TGF- β , enquanto os receptores ActRIIA e ActRIB são ligados principalmente pelas ativinas e pelo complexo ativina-ActRIIA,

respectivamente (HARRINSON *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006; KOMATSU *et al.*, 2007).

A folistatina é uma proteína monomérica que possui ação neutralizante sobre as ativinas e em menor intensidade sobre as demais proteínas da superfamília TGF- β , como a miostatina. Ela se liga à ativina, com alta afinidade, formando complexos inativos (HILL *et al.*, 2002; SIDIS *et al.*, 2002). Em tecidos e fluídos humanos, a folistatina está presente em pelo menos três isoformas: a) a FS315, que é caracterizada como a isoforma que possui o maior comprimento; b) a FS303 que presumivelmente é derivada de processos proteolíticos e c) a FS288 que é produto de *splicing* alternativo. Curiosamente, suas habilidades de se ligarem a proteoglicanos da camada superficial celular são diferentes, sugerindo diferentes propriedades bioquímicas e, conseqüentemente, distintas funções entre as isoformas. (ALAN *et al.*, 2004).

O gene relacionado à folistatina (FLRG), também conhecida como proteína relacionada à folistatina (FSRP), é um membro da família das folistatinas, recentemente caracterizada, que se liga à ativina com alta afinidade, neutralizando seus efeitos (HARRINSON *et al.*, 2005). Curiosamente, estudos de regulação da expressão gênica demonstraram que a FSRP não se liga aos proteoglicanos da camada superficial celular e possui um padrão de expressão nuclear, ao contrário da FS que se liga aos proteoglicanos e possui um padrão de expressão citoplasmático (SAITO *et al.*, 2005). Adicionalmente, a FSRP é altamente expressa na

placenta, no testículo, na pele e no tecido cardíaco, enquanto a expressão da FS é consideravelmente maior no ovário e na pituitária (WELT *et al.*, 2002.). Esses dados sugerem que ambas as folistatinas não sejam homólogos funcionais, possuindo distintas funções entre os tecidos.

1.2.7 Ativinas, inibinas e folistatina na glândula mamária

Apesar do grande número de estudos que investigam a biologia das ativinas, análises que visam a caracterizar a sua expressão e elucidar sua função na glândula mamária *in vivo* são poucas. Relatos demonstraram que as células epiteliais lobulares e ductais humanas foram imunorreativas a anticorpos anti- α , β A e β B, demonstrando sua expressão na mama de mulheres (DI LORETO *et al.*, 1999). Recentemente, foi descrita a presença das subunidades β -ativina/inibina, dos seus receptores e das SMADS na glândula mamária de camundongos e de ratos (JERUSS *et al.*, 2003; BUSSMANN *et al.*, 2004).

O papel fisiológico da ativina B no desenvolvimento da glândula mamária foi evidenciado pela utilização de camundongos fêmeas geneticamente modificadas. Quando adultas, elas apresentaram desenvolvimento ductal e diferenciação do epitélio alveolar limitado e não

produziram leite (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997). Com relação ao papel da ativina A, estudos utilizando camundongos *knock-out* para a subunidade βA não puderam relacionar essa proteína com o desenvolvimento da glândula mamária, pois os animais (-/-) nasciam com malformações no palato, levando-os à morte antes que o tecido mamário pudesse se desenvolver (MATZUK *et al.*, 1995).

Inúmeras evidências indicam que há síntese de RNA mensageiro, subunidades protéicas e dímeros de ativina e inibina em carcinoma mamário humano (REIS *et al.*, 2004), além de o nível de expressão do RNA mensageiro da cadeia βA ser maior em carcinoma mamário que em tecido mamário hígido (REIS *et al.*, 2002).

Similarmente aos fatores TGF- β , a ativina possui um efeito antiproliferativo sobre as células epiteliais mamárias. Tal efeito pôde ser observado ao se adicionar ativinas A e B a culturas de células mamárias cancerígenas T47D. Esse efeito foi causado pela fosforilação da SMAD 3, que reorganizou o ciclo celular de forma a mantê-lo entre as fases G₀-G₁, impedindo, conseqüentemente, que a célula entrasse em mitose e, portanto, não permitindo a proliferação celular (LIU *et al.*, 1996; BURDETTE *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos com ácinos mamários em diferentes estágios de desenvolvimento, isolados em cultura e tratados com ativina A e B, apresentaram uma menor taxa de proliferação celular quando comparados aos seus controles (BUSSMANN *et al.*, 2004).

Recentemente, a regulação do estradiol sobre a expressão da ativina B pelas células epiteliais mamárias foi descrita utilizando culturas celulares T47D. Foi relatado que o tratamento dessas células com estradiol diminuiu as concentrações de mRNA da cadeia β B. Demonstrou-se também que o complexo estradiol-ER α se liga a SMAD 3 fosforilada, impedindo que a mesma se dirija ao núcleo e regule a transcrição gênica. Por outro lado, a ativina reprimiu um fator de transcrição estradiol dependente, o *trefoil factor 1*, bloqueando dessa maneira um clássico efeito do estradiol (BURDETTE & WOODRUFF, 2007). Estes dados sugerem uma importante interação entre esses dois hormônios sobre células epiteliais mamárias.

Em relação à folistatina, ela foi caracterizada somente na glândula mamária de ratas. Análises quantitativas de mRNA extraído de ácinos isolados demonstraram um alto nível de expressão de folistatina nesta parte da glândula (BUSSMANN *et al.*, 2004). A expressão da FSRP não foi descrita no tecido mamário de nenhuma espécie até a presente data.

Pela existência da síntese e produção dessas moléculas no tecido mamário de roedores e de mulheres e pela importância que estes fatores de crescimento exercem sobre o desenvolvimento normal do tecido mamário e, conseqüentemente, sobre a lactação, o presente trabalho visa a caracterizar a expressão das cadeias β A/ β B da ativina/inibina, dos seus receptores mais específicos ActRIB e ActRIIA, da subunidade α -

inibina e da folistatina na glândula mamária bovina durante o desenvolvimento gestacional.

2. Justificativa e objetivos

2.1 Justificativa

Embora não haja relatos publicados sobre a expressão das cadeias β A/ β B da ativina/inibina, dos seus receptores ActRIB e ActRIIA, de α -inibina e de folistatina na glândula mamária bovina, a expressão dessas proteínas foi demonstrada em outras espécies como a humana e a murina (DI LORETO *et al.*, 1999; JERUSS *et al.*, 2003; BUSSMANN *et al.*, 2004). Estudos em camundongos geneticamente modificados demonstraram que a depleção da cadeia β B causava retardo na ramificação ductal e na morfogênese alveolar, impossibilitando os animais de produzirem leite (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997). Pela importância que essas proteínas exercem na morfogênese mamária, decidimos testar a hipótese de que as mesmas sejam expressas durante o período gestacional de fêmeas da espécie bovina. O período de desenvolvimento mamário gestacional foi escolhido pelo fato de que este é o período em que ocorre maior proliferação e diferenciação celular na glândula mamária.

2.2 Objetivo geral

Verificar a expressão das cadeias da ativina/inibina, $\beta A/\beta B$, dos seus receptores ActRIB e ActRIIA, de α -inibina e de folistatina na glândula mamária bovina.

2.3 Objetivos específicos

- Caracterizar, através de imunistoquímica, a distribuição das cadeias da ativina/inibina, βA e βB , de seus receptores ActRIB e ActRIIA, de α -inibina e de folistatina na glândula mamária bovina de animais púberes não gestantes e de animais púberes gestantes na 1ª fase (mamogênese) e na 2ª fase (lactogênese) do desenvolvimento mamário gestacional.

- Identificar e comparar, através de PCR em tempo real, a expressão gênica das cadeias da ativina/inibina, βA e βB , de seus receptores ActRIB e ActRIIA, de α -inibina e de folistatina na glândula mamária bovina não gestacional, gestacional na 1ª fase (mamogênese) e gestacional na 2ª fase (lactogênese) do desenvolvimento mamário.

3. Material e métodos

3.1 Sujeitos

Foram utilizadas amostras de glândulas mamárias de bovinos de corte da raça nelore do sexo feminino, obtidas no Frigorífico Industrial de Betim Ltda – Frigobet, localizado na cidade de Betim – Minas Gerais. Para se investigar a expressão das proteínas de interesse durante as diferentes fases do desenvolvimento mamário gestacional, fez-se necessário coletar amostras tanto de animais não gestantes, como de animais gestantes. No intuito de melhor entender o padrão de expressão dessas proteínas na mama gestante, foi utilizado um grupo controle não gestante composto de animais que nunca amamentaram anteriormente e que estavam com suas mamas “intactas” (n=9). Para tanto foram coletadas amostras provenientes de novilhas com idade em torno de 18 e 24 meses que não apresentavam úteros gravídicos no momento do abate. Com relação aos animais gestantes, dois grupos diferentes foram utilizados. O grupo constituído por novilhas primíparas (n=9), com idade gestacional entre 60 e 120 dias (primeira metade da gestação – mamogênese), foi utilizado para investigar o padrão de expressão das proteínas de interesse durante o prolongamento e ramificação dos ductos mamários. Por outro lado, para se verificar o padrão de expressão das

proteínas de interesse durante a diferenciação dos alvéolos de um estado não secretor para um estado “pré-secretor” foi utilizado um grupo composto por novilhas primíparas (n=9), com idade gestacional entre 150 e 210 dias (segunda metade da gestação – lactogênese) (NEVILLE *et al.*, 2002; SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

3.1.1 Determinação da idade gestacional

Visando determinar se os animais se encontravam na primeira ou na segunda fase da gestação, as medidas do comprimento cabeça-nádega dos fetos foram aferidas e comparadas com uma tabela que correlaciona tal comprimento com a idade gestacional do animal (REXROAD *et al.*, 1974). Assim, os fetos que apresentavam a medida do comprimento cabeça-nádega entre 9,3 cm – 31,6 cm tinham idade gestacional em torno de 60-120 dias, indicando que esses animais se encontravam na primeira metade da gestação, e os fetos que apresentavam a medida do comprimento cabeça-nádega entre 45,4 cm – 78,6 cm tinham idade gestacional em torno de 150 -210 dias, indicando que esses animais se encontravam na segunda metade da gestação (REXROAD *et al.*, 1974).

3.1.2 Considerações éticas

De acordo com Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, não existe a necessidade de parecer técnico desta entidade, devido ao fato de não se utilizar animais vivos neste estudo e, tampouco, haver a necessidade de sacrificar animais diretamente para a obtenção dos tecidos em estudo.

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta das amostras

Um pequeno fragmento (aproximadamente 1cm³) do tecido mamário dos animais foi retirado e imerso em nitrogênio líquido no momento da coleta e, em seguida, armazenado em freezer a -80° C, para posteriores análises do mRNA. O restante do material coletado foi fixado em solução de formol tamponado a 10% em frascos devidamente separados e identificados. O material fixado em formol tamponado a 10% foi levado ao laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral da UFMG e foi processado e incluído em blocos de parafina.

O animal abatido teve o úbere removido e dividido em quatro complexos. O quarto traseiro direito do animal foi separado dos quartos restantes, foi traçada uma linha imaginária a partir do teto em direção à superfície dorsal da glândula mamária e o tecido da região do parênquima mamário, que se situa entre a cisterna mamária e o estroma adiposo, foi coletado e devidamente processado (CAPUCO *et al.*, 2002).

3.2.2 Histologia e imunoistoquímica

3.2.2.1 Inclusão e corte

As amostras fixadas em solução de formol tamponado a 10% foram desidratadas em etanol a concentrações crescentes, variando de 70% a 99% (60 min cada), depois imersas em xilol (2x60 min) e em parafina a 60°C. A seguir, foram incluídas em blocos de parafina, deixadas por pelo menos 24 horas para solidificar. Os blocos foram resfriados por aproximadamente -10°C e seccionados num micrótomo em cortes de 6µm de espessura que, dispostos num banho aquecido, foram cuidadosamente transferidos para as lâminas de vidro. A seguir, essas lâminas foram aquecidas em estufa de 37°C por 24 horas para fazer escorrer o excesso de parafina dos cortes histológicos.

3.2.2.2 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica utilizada foi a da avidina-biotina-peroxidase, através do *kit* Vectastain (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA). A avidina é uma glicoproteína de alto peso molecular que apresenta grande afinidade com a biotina (vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes). Após a incubação do tecido com o anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína ou peptídeo em estudo, aplica-se o anticorpo secundário (que se liga ao anticorpo primário) previamente ligado a uma molécula de biotina. A avidina amplifica o efeito da biotina, pois cada molécula que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três outras moléculas de biotina conjugadas a peroxidase. Esta age sobre um corante especial e os sítios antigênicos ficam corados de forma estável, geralmente em tonalidade amarronzada. Adaptações e particularidades do nosso protocolo para cada antígeno estudado são apresentadas na TAB. 1.

As lâminas com os cortes de tecido foram desparanifizadas em xilol (duas incubações de 10 minutos) e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol que variaram de 90% a 50% (uma incubação de cinco minutos em cada solução) e, finalmente, foram imersas em água destilada por 5 minutos. A segunda etapa foi constituída pelo bloqueio da peroxidase endógena, com imersão das lâminas em uma solução

preparada a partir de 87 ml de metanol e 3 ml de H₂O₂ a 30% por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas por imersão em uma solução de PBS. Seguiu-se uma incubação dos cortes durante 60 minutos com soro normal de cavalo ou de coelho, dependendo do anticorpo primário utilizado, com o objetivo de ocupar os sítios antigênicos inespecíficos e favorecer a ligação do anticorpo secundário biotinizado ao seu antígeno alvo, o anticorpo primário.

A quarta etapa foi a incubação dos cortes com o anticorpo primário específico para o antígeno pesquisado. O anticorpo foi diluído em solução de PBS com albumina a 0,1% numa proporção variável, ajustada para cada protocolo. Nessa etapa, os cortes foram cobertos com aproximadamente 50µl da solução do anticorpo. Para evitar a evaporação ou ressecamento dos cortes, essa incubação foi feita com as lâminas dispostas em uma câmara úmida e a duração do período de incubação para todos os anticorpos utilizados foi de 24 horas com temperatura de 4°C. A câmara utilizada consistiu de uma caixa plástica retangular rasa contendo água destilada no seu fundo. Terminado o tempo de incubação com o anticorpo primário, removia-se o excedente mergulhando as lâminas em PBS por 10 minutos e passava-se à quinta etapa, incubação com o anticorpo secundário.

Foram empregados os anticorpos biotinizados antiimunoglobulina G (antiIgG) de coelho feito em cavalo (Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA) para os anticorpos primários anti-βA, anti-ActRIB, anti-ActRIIA

e anti-FS, e anti-IgG de cabra feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, EUA) para os anticorpos primários anti- β B e anti- α . Diluiu-se o anticorpo secundário em solução de PBS na proporção de 1:200 e aplicaram-se 50 μ l da solução sobre os cortes, que permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada a incubação, foi removido o excedente de anticorpo secundário, após imersão das lâminas durante 10 minutos na solução de PBS, e iniciou-se a sexta etapa, que consistiu em uma incubação dos cortes por 30 minutos com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain). As soluções de avidina (solução A) e biotina + peroxidase (solução B) foram associadas e diluídas em PBS (1:200) cerca de 30 minutos antes da incubação. Após nova incubação de 10 minutos em PBS, os cortes foram finalmente corados por uma solução de cromógeno DAB [3,3'-diaminobenzine] (Sigma Chem. CO, St Louis, MO, USA) preparada minutos antes e mantida ao abrigo da luz. Uma alíquota da solução de estoque da DAB (5mg/ml) era diluída na proporção de 1:4 em PBS e acrescida de 10 μ l de peróxido de hidrogênio a 30%. Os cortes foram cobertos com 50 μ l da solução de DAB, em média por três minutos, e imediatamente imersos em água destilada para remover-se o corante excedente.

Concluída a imunocoloração, os cortes foram submetidos a uma contracoloração com hematoxilina e desidratados em concentrações crescentes de etanol, variando de 50% a 90%, sendo, finalmente, imersos

em xilol (duas incubações de 10 minutos) e montados com lamínula e entelan.

Controles negativos foram realizados em todos os ensaios, substituindo-se os anticorpos primários anti- β A, anti-FS, anti-ActRIB e anti ActRIIA por soro de coelho normal e os anticorpos primários anti- β B e anti- α por soro de cabra normal.

Todos os anticorpos utilizados no presente experimento foram confeccionados a partir de antígenos humanos. Pelo fato de existir 97% de homologia entre seqüências de humanos e de animais domésticos (dentre eles a espécie bovina) para os componentes da superfamília de fatores de crescimento TGF- β , os anticorpos policlonais descritos na Tabela 1 foram utilizados porque apresentam boa imunorreatividade a tecidos bovinos (PHILLIPS, 2005).

3.2.2.3 Coloração imunoistoquímica da cadeia β A ativina/inibina, de seus receptores, ActRIB e ActRIIA e da folistatina.

Os anticorpos policlonais, IgG anti- β A, anti-ActRIB, anti-ActRIIA e anti-FS, produzidos em coelhos, foram gentilmente doados pelo Dr. Wylie Vale, do Salk Institute, (La Jolla, CA, USA), na forma de soro integral liofilizado.

Uma curva de diluição baseada em cortes de tecido mamário bovino foi realizada em nosso laboratório para se determinar a menor concentração de anticorpo, capaz de produzir uma imunocoloração específica no tecido mamário bovino. Essa concentração foi de 1:400 para o anticorpo Anti- β A e de 1:200 para os anticorpos anti-ActRIB, anti-ActRIIA e anti-FS (TAB. 1).

Controles negativos e positivos foram utilizados em cada experimento. Como controle positivo, foram utilizadas lâminas histológicas confeccionadas a partir de tecido mamário humano, visto o fato destas proteínas terem sido caracterizadas na mama humana anteriormente (DI LORETO *et al.*, 1999; JERUSS *et al.*, 2003b). Os cortes histológicos de mama humana foram obtidos no arquivo do Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral, ICB-UFMG. Como controles negativos, cortes de tecido mamário bovino de cada grupo experimental foram simultaneamente incubados com soro normal de coelho a 1:200. O anticorpo biotilado anti-IgG de coelho diluído a 1:200 foi aplicado durante 30 minutos. (TAB. 1).

3.2.2.4 Coloração imunoistoquímica das cadeias: β B ativina/inibina e α -inibina.

Os anticorpos policlonais anti- β B e anti- α , produzidos em cabras, foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology, INC. (CA, USA) na forma

de solução contendo 200 µg de IgG em 1.0 ml de PBS. O anticorpo primário foi utilizado na diluição de 1:200 para ambas as proteínas, e o anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de cabra feito em coelho na diluição 1:200 (TAB. 1).

TABELA 1

Protocolo utilizado para os diferentes ensaios imunistoquímicos

Antígeno	Soro normal para bloqueio	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Controle Negativo
βA Ativina	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:400)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:400)
βB Ativina	Coelho 1:30	Policlonal feito em cabra (1:200)	Anti-IgG de cabra feito em coelho (1:200)	Soro normal de cabra (1:200)
ActRIB	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)
ActRIIA	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)
α Inibina	Coelho 1:30	Policlonal feito em cabra (1:200)	Anti-IgG de cabra feito em coelho (1:200)	Soro normal de cabra (1:200)
Folistatina	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)

3.2.2.5 Leitura das lâminas

As lâminas foram examinadas com aumento de 20x e 60x, sempre no mesmo microscópio (Laboratório de Patologia Geral, ICB-UFMG), procurando manter-se a mesma intensidade de luz. Os resultados foram avaliados separadamente para a região lobo alveolar (células epiteliais alveolares e mioepiteliais), para a região ductal (células epiteliais dos ductos mamários) e para a região estromal da mama (tecido adiposo e conjuntivo). Foram atribuídos valores às intensidades de coloração conforme descrito na tabela 4. Assim, o seguinte esquema de intensidade de coloração nas lâminas coradas foi adotado: ausente, fraca, moderada ou intensa (TAB. 2). Os controles negativos foram usados para revelar a coloração inespecífica, que foi desconsiderada.

Os dados das análises imunoistoquímicas foram descritos como mediana \pm intervalo interquartil. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância não paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis. As diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas e submetidas ao teste Dunn de comparações múltiplas.

TABELA 2

Escala de distribuição da intensidade de coloração dos tecidos imunocorados.

Intensidade deColoração	Pontuação
Ausente	0 (0)
Fraca	1 (+)
Moderada	2 (++)
Intensa	3 (+++)

3.2.3 PCR quantitativa em tempo real

3.2.3.1 Extração de RNA

O RNA total do tecido mamário bovino coletado em nitrogênio líquido e armazenado a uma temperatura de -80°C foi isolado para ser quantificado. Para tal, os tecidos foram colocados em tubos plásticos estéreis e identificados, em solução de fenol e isocianato de guanidina (Trizol® Reagent, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) 1ml/100mg de tecido. As amostras foram trituradas por um homogeneizador elétrico Polytron. Após 5 minutos de maceração dos tecidos no homogeneizador, foi adicionado clorofórmio (0,2 ml/100mg de tecido) seguido de centrifugação (15300xg, 4 °C, 15 minutos). Após a centrifugação, as amostras apresentavam três fases, uma fase orgânica no fundo do tubo

plástico, uma fase constituída principalmente por DNA, que se localizava entre as três fases, e uma fase aquosa contendo RNA total, que se situava no sobrenadante (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987).

A próxima etapa constituía-se na transferência cuidadosa do sobrenadante (para não contaminar RNA total com DNA genômico) para novos tubos plásticos estéreis e identificados. Álcool isopropílico (0,5ml) foi adicionado ao RNA total para promover a sua precipitação e, após 30 minutos de repouso a uma temperatura de -20 °C, seguiu-se nova centrifugação (15.300xg, 4 °C, 15 minutos). O precipitado de RNA foi então lavado por duas vezes com 1ml de etanol a 75% seguido de centrifugação curta (9600xg, 4 °C, 5 minutos).

O precipitado de RNA foi ressuspendido em 50µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e aquecido a 60°C por 10 minutos para desnaturação. Para a quantificação, alíquotas de 10µl da solução de RNA foram diluídas em 1ml de água tratada com dietilpirocarbonato e a solução resultante foi submetida a leitura em espectrofotômetro nas faixas de 260 e 280nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280nm era superior a 1,7. Considerando que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40µg de RNA por ml de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40\mu\text{g/ml}$$

onde A = absorvância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação, no caso 100, visto que, 10µl de solução de RNA foram diluídos em 1ml de água.

Após a extração, 3µg de RNA foram submetidos à transcrição reversa, como será descrito a seguir.

3.2.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) – Transcrição reversa

A obtenção do cDNA foi feita a partir do mRNA, utilizando-se oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do mRNA, um processo chamado de retro-transcrição (RT).

Para a RT, foi utilizado o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen Corporation, Brasil), de acordo com as instruções contidas no protocolo do fornecedor. 3µg de RNA total foram adicionados a 1µl de *oligo (dT)*, a 1 µl de tampão específico e a 1µl de água livre de DNASE/RNASE. A seguir foram incubados a 65°C por 5 minutos e, após esse período, as amostras foram condicionadas no gelo para a adição de 10µl de uma solução *2x First-Strand Reaction Mix* e 2µl de solução contendo a transcriptase reversa *Superscript™ III* e inibidor de RNAase, *RNASE Out*. A solução foi mantida a 50°C por 50 minutos para a síntese de DNA complementar.

3.2.3.3 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores para a PCR em tempo real

Para a determinação dos oligonucleotídeos iniciadores para a PCR em tempo real, foram utilizadas as seqüências de mRNA publicadas na base de dados do NCBI.

A análise da estrutura secundária das moléculas de mRNA foi realizada utilizando-se o programa *Real Time PCR Primer Design* da empresa *Genscript Corporation* no endereço eletrônico www.genscript.com/ssi-bin/app/primer. Este programa foi escolhido por escolher as regiões a serem amplificadas, que se encontram fora das alças das moléculas de mRNA, o que poderia prejudicar a correta amplificação das mesmas. A metodologia utilizada para a construção dos *primers* foi feita segundo os parâmetros universais (INNIS *et al.*, 1990). Desta forma foram escolhidos dois *primers* para cada gene de interesse cujas seqüências estão descritas na tabela 3. Para os genes das cadeias β A e β B e para o gene de controle interno β -actina, foram situados em áreas de transição intron-exon. Essa manobra é utilizada para certificar-se de que não haja amplificação de DNA genômico, caso o mesmo esteja presente nas amostras de cDNA. Não foi possível, contudo, adotar esse método para os outros genes, cuja região codificadora apresenta apenas um exon.

TABELA 3

Seqüências de oligonucleotídeos usados como *primers* para as reações de PCR em tempo real

Gene Alvo	Seqüência 5'→3'	Produto (pb)	Acesso NCBI
β A		117	NM_174363
Senso	gga atc agc aca gcc agg aa		
Antissenso	tcc tgt tgg cct tgg gaa ct		
β B		98	NM_176852
Senso	cag ctt cgc cga gac aga tg		
Antissenso	ctg gcc tgc acc aca aac ag		
ActRIB		137	AY185302
Senso	gca tca aga aga ccc tct cc		
Antissenso	aga ggt agg cct cca tcg ta		
ActRIIA		108	U43208
Senso	aaa gtt tga ggc tgg caa gt		
Antissenso	gca tcc ctt tgg aag ttg at		
α		86	NM_174094
Senso	cac gta tgt gtt cca gcc at		
Antissenso	gtc tgt cca gtc ctg <u>tgt</u> <u>gg</u>		
Folistatina		126	L21716
Senso	ttt ctg tcc agg cag ctc ta		
Antissenso	gtc act cca tca ttc cca ca		
β -actina		82	AY141970
Senso	agc aga tgt gga tca gca ag		
Antissenso	taa cag tcc gct tag aag ca		

3.2.3.4 PCR em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real é uma tecnologia empregada para se detectar os produtos da PCR a cada ciclo da reação. Seus principais atrativos incluem a possibilidade de se gerar dados em duas ou três horas. Além da rapidez, esta tecnologia também reduz as variáveis e o risco de contaminação por ser confeccionada em sistemas fechados.

A técnica que usa o composto *SYBR GREEN* tem como base uma molécula fluorescente altamente específica ao DNA dupla fita. Essa molécula em solução exibe pouca fluorescência, mas durante a PCR várias moléculas fluorogênicas se ligam ao DNA, em locais formados por depressões da estrutura tridimensional da molécula de DNA (*minor groove*), aumentando consideravelmente a fluorescência emitida, tornando possível a detecção dos fragmentos de DNA amplificados por aparelhos adequados.

A análise da expressão diferencial através da PCR em tempo real é feita baseada nos valores de C_T (*threshold cycle*), definido como o ponto em que o sinal de fluorescência emitido tem o primeiro registro estatisticamente superior à fluorescência basal, o que sempre ocorre durante a fase exponencial de amplificação (GIBSON *et al.*, 1996). Com isso são calculados os valores de quantificação absoluta ou relativa,

dependendo do objetivo do estudo e dos dados gerados (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado um protocolo básico em todas as reações, mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de 25 μ l. Resumidamente a reação consistiu-se de: 1,3 μ l de cDNA e 23,7 μ l de uma solução *mix* composta por 2,7 μ l de água para PCR (esterilizada e filtrada), 2 μ l do *primer* senso (10 pmol/ μ l), 2 μ l do *primer* antissenso (10 pmol/ μ l) (Invitrogen, Brasil) e por 17 μ l de SYBR[®] *Green Master Mix* (Applied Biosystems, Warrington WA, UK). Cada amostra foi feita em duplicata, inclusive os controles negativos que tiveram o cDNA substituído pelo mesmo volume de água na reação.

A reação em tempo real foi realizada utilizando-se o aparelho *ABI Prism 7000 SDS* (Applied Biosystems, Warrington WA, UK) no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52^oC/2 min.; [estágio 2] um ciclo de 95^oC/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95^oC/0,15 min e 50^oC/1 min.

O gene que apresenta uma expressão constitutiva constante, não sendo influenciado pelo tratamento ou pela fase do desenvolvimento do tecido em estudo escolhido, foi o da β -actina (gene *housekeeping*). Estudos em mama bovina que utilizaram o gene da β -actina para a quantificação relativa por PCR em tempo real indicaram uma expressão constante em diferentes períodos de desenvolvimento (SUCHYTA *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006).

A média dos valores de C_T de cada duplicata obtida pelos genes de interesse foi calculada e subtraída de acordo com média dos valores de C_T das duplicatas obtidas pelo gene normalizador (β -actina), gerando o delta C_T (ΔC_T). Em seguida, estes valores foram aplicados na seguinte fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

que expressa quantas vezes a relação gene alvo/gene controle foi maior no grupo de estudo em relação ao grupo controle (“Fold Increase”).

Os valores médios de ΔC_T dos três grupos foram comparados utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguidos pelo Teste de Newman Keuls, quando pertinente (YUAN *et al.*, 2006).

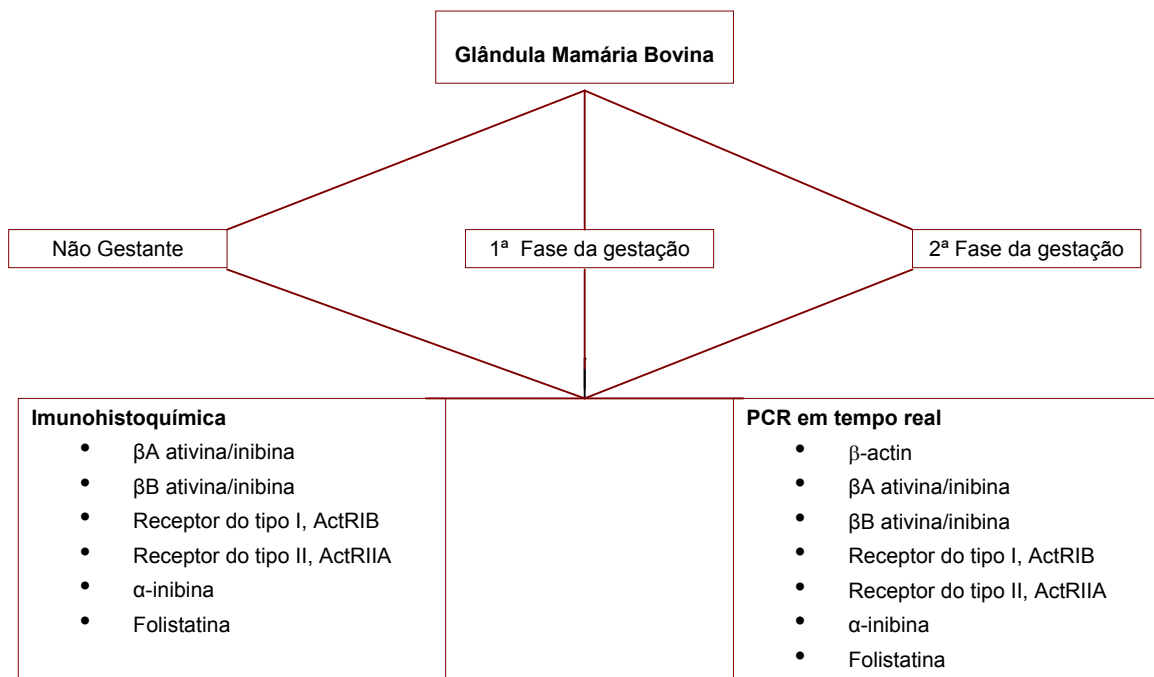


FIGURA 1 – Fluxograma do estudo.

5. Discussão

A expressão das subunidades e receptores de ativina/inibina e da folistatina foi previamente demonstrada em humanos, ratos e camundongos. Esses fatores de crescimento foram apontados como determinantes para o crescimento ductal e a produção de leite de camundongas (ROBINSON & HENNIGHAUSEN, 1997). Em mulheres, foi identificada uma perda da expressão das ativinas quando o grau de malignidade das neoplasias mamárias aumentava, indicando que esses fatores de crescimento agem como supressores de crescimento tumoral (JERUSS *et al.*, 2003b). Estudos também demonstraram que as ativinas podem ser utilizadas como marcadores de tumores mamários em mulheres (REIS *et al.*, 2004). Portanto, pelo fato desses fatores de crescimento influenciarem a produção de leite de camundongas e também pela razão da mama bovina ser o modelo mais próximo de se estudar o desenvolvimento mamário de mulheres, decidimos investigar a expressão do sistema ativina-inibina-folistatina na glândula mamária bovina gestacional.

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a expressão gênica e protéica das subunidades βA e βB da ativina/inibina, dos seus receptores mais específicos, ActRIB e ActRIIA, da subunidade α -inibina e da folistatina na glândula mamária bovina gestacional. Todas as

proteínas apresentaram expressão gênica e protéica na fase não gestacional, durante a mamogênese e durante a lactogênese.

As subunidades βA e βB , foram identificadas nas células epiteliais ductais e lobulares, assim como na região estromal. Contudo, a intensidade de coloração da cadeia βA foi mais intensa nas células epiteliais ductais e lobulares durante a mamogênese e foi menos intensa nas células estromais durante a lactogênese. Por outro lado, a cadeia βB não apresentou diferenças de imunocoloração nas 3 fases analisadas. Quanto à expressão gênica, o aumento da expressão protéica da cadeia βA durante a mamogênese foi acompanhado por um aumento não significativo do seu mRNA. Porém, houve diminuição da expressão da cadeia βA estromal durante a lactogênese, sem que houvesse a diminuição do seu mRNA. Em relação à expressão gênica da cadeia βB , a mesma foi similar entre a fase não gestacional e a 1ª fase gestacional, com um aumento não significativo das concentrações de mRNA na 2ª fase gestacional.

Ao se estudar a expressão das subunidades ativina/inibina na glândula mamária de ratas, verificou-se que somente o mRNA da subunidade βB era expresso na mesma (BUSSMANN *et al.*, 2004), demonstrando que a ativina B é a ativina responsável pela sinalização autócrina e parácrina realizada nesta espécie. Em contrapartida, o presente trabalho revela que em bovinos, de forma semelhante a humanos e camundongos, essa sinalização parece ser mediada pelos três

tipos de ativinas, as ativinas A/B e AB, visto ambas subunidades β serem expressas na mama dessas espécies (DI LORETO *et al.*, 1999; JERUSS *et al.*, 2003).

Estudos de *hibridização in situ* realizados em testículo humanos mostraram a expressão de mRNA da cadeia β B nas células germinativas, de Sertoli e de Leydig (MARCHETTI *et al.*, 2003), mas a imunoreatividade da cadeia β B pôde ser observada somente nas células germinativas e de Leydig (ANDERSSON *et al.*, 1998; MARCHETTI *et al.*, 2003). Estes dados demonstram que a imunoreatividade da cadeia β B não reflete a presença de mRNA celular, sugerindo a participação de outros agentes moleculares na regulação da tradução das ativinas, o que explicaria o aumento do mRNA das cadeias β A e β B durante a 2^a fase gestacional, sem que houvesse aumento da expressão protéica.

Recentemente, foi demonstrado que as ativinas A e B reduzem a proliferação de ácinos mamários isolados a partir de ratas que se encontravam no 19^o dia de gestação (lactogênese) (BUSSMANN *et al.*, 2004). Em bovinos o aumento da expressão protéica da cadeia β A durante a mamogênese sugere um papel modulatório da ativina A sobre a ramificação dos ductos mamários a partir das unidades lobulares ductais terminais, "TDLUs". Tal modulação poderia ocorrer pela indução de determinadas células a entrarem na fase G₀/G₁ do ciclo celular (LIU *et al.*, 1996; BURDETTE *et al.*, 2005). Este efeito impediria que essas

células se proliferassem ou entrassem em apoptose e desta maneira, possibilitaria a formação da estrutura tridimensional da rede ductal.

Equações matemáticas calculadas a partir do padrão proliferativo de culturas mamárias tubulares demonstraram que as proteínas TGF- β regulam os locais onde as primeiras ramificações ductais surgem; conseqüentemente, esses fatores de crescimento influenciam diretamente a morfogênese da rede ductal mamária que ocorre durante a 1ª fase gestacional (NELSON *et al.*, 2006). As ativinas também influenciam a formação dos botões terminais de camundongos “TEBs”, já que essas estruturas não se desenvolvem durante a mamogênese em animais knock-out para a subunidade β B (ROBINSON & HENNIGHAUSEN, 1997; WISEMAN & WERB, 2002).

A 1ª fase do desenvolvimento mamário gestacional é caracterizada por extensa ramificação dos ductos mamários. Durante este período há uma menor concentração plasmática de estradiol em comparação às suas concentrações na 2ª fase gestacional (HOVEY *et al.*, 1999). Análises gênicas realizadas pela técnica de *microarray* e *PCR em tempo real*, demonstraram que a expressão do mRNA da subunidade β B foi diminuída após o tratamento de células mamárias cancerígenas MCF7 com estradiol (FRASOR *et al.*, 2003). Tal efeito foi confirmado quando culturas mamárias cancerígenas TD47 foram tratadas com estradiol e apresentaram diminuição da expressão do mRNA da cadeia β B da ativina/inibina (BURDETTE & WOODRUFF, 2007).

Curiosamente, durante a 1ª e a 2ª fase gestacional, período em que as concentrações plasmáticas de estradiol são maiores que na fase não gestacional, a expressão gênica e protéica da cadeia β B não foi alterada significativamente, embora sua expressão gênica tenha sido maior na 2ª fase gestacional. Tal fato sugere que o efeito do estradiol *in vivo* possa diferir do seu efeito *in vitro* ou de outra maneira, esse resultado sugere a existência de diferenças do efeito do estradiol sobre a expressão da cadeia β B nas células mamárias de humanos e de bovinos.

Por outro lado, a expressão protéica da cadeia β A não acompanhou o mesmo padrão de expressão da cadeia β B, ou seja, ela aumentou durante a mamogênese e diminuiu durante a lactogênese. Esse aumento demonstra que a cadeia β A está sob os efeitos regulatórios de outros hormônios ou fatores de crescimento durante a mamogênese, pois o aumento da relação estradiol/progesterona característico dessa fase, não foi suficiente para diminuir a expressão protéica da cadeia β A. Contudo, durante a lactogênese, período em que ocorre o maior aumento contínuo de estradiol plasmático em bovinos, houve a esperada diminuição da expressão estromal da cadeia β A. Juntos esses resultados apontam para a ação de outros fatores regulatórios sobre a expressão diferenciada dessas subunidades e sugerem que as ativinas exercem diferentes ações sobre desenvolvimento mamário gestacional de bovinos.

A ativina, quando adicionada a culturas celulares TD47, possui um efeito inibitório sobre a expressão de um elemento responsivo ao

estradiol, o *trefoil factor 1*. O mesmo efeito também pôde ser observado ao se utilizar um constructo com um elemento responsivo ao estradiol ligado a uma luciferase. A adição de ativina A diminuiu o acúmulo da luciferase intracelular demonstrando seu efeito inibitório sobre um elemento responsivo ao estradiol (BURDETTE & WOODRUFF, 2007). Esses efeitos indicam que na glândula mamária influenciada pelo “*status*” hormonal da 1ª fase gestacional, a ativina A poderia agir contra-regulando os efeitos do estradiol que se encontra abundante nesta fase. Desta maneira ela modularia o crescimento ductal, permitindo que o mesmo não pudesse ocorrer de forma desordenada, como ocorre em vários tipos de neoplasias mamárias.

A importância do efeito modulatório que a ativina exerce sobre o crescimento ductal pode ser exemplificada pelos tumores de mama mais agressivos, que apresentam crescimento ductal e ou lóbulo-alveolar desordenado. Esses tumores apresentam uma perda da expressão das ativinas, de seus receptores e de seu mediador intracelular a SMAD3 (JERUSS *et al.*, 2003b).

Durante a mamogênese há um aumento do parênquima mamário e um decréscimo do tecido estromal. Os ductos crescem sobre a matriz adiposa substituindo o tecido estromal por tecido parenquimatoso. O aumento da expressão local de ativina A neste período também poderia influenciar a substituição do tecido estromal por tecido parenquimatoso. Tal suposição consiste no fato de que a ativina A impede a diferenciação

de pré-adipócitos em adipócitos na espécie bovina. Efeito que foi inibido pela adição de folistatina ao meio de cultura (HIRAI *et al.*, 2006).

Com relação à 2ª fase gestacional, a expressão estromal da cadeia β A foi menor que em outras fases. Essa diminuição pode ter sido influenciada pelo aumento progressivo da relação entre estradiol/progesterona, ou por um aumento progressivo das concentrações plasmáticas de lactogênio placentário (hLP) que ocorre ao longo da 2ª fase gestacional (HOVEY *et al.*, 2002; NEVILLE *et al.*, 2002; SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005).

O efeito da PRL/hLP sobre a expressão gênica da ativina A pôde ser evidenciado por estudos realizados em células decíduais primárias. Foi constatado que a ativina A somente é expressa e promove seus efeitos apoptóticos quando os receptores de PRL dessas células não são mais expressos. O tratamento das células decíduais com PRL/hLP promoveu uma inibição da expressão de mRNA da cadeia β A. Adicionalmente, camundongas knock-out para o gene da PRL, expressam abundantemente o mRNA da cadeia β A nas células decíduais e o tratamento dessas camundongas com PRL causou uma inibição acentuada na expressão de mRNA da cadeia β A (TESSIER *et al.*, 2003).

A expressão gênica da cadeia β A não diferiu entre as fases estudadas,

contudo, a diminuição da expressão protéica da subunidade β A

durante a lactogênese ocorreu somente nas células estromais e não

nas células ductais e alveolares. Essa diminuição poderia influenciar

o desenvolvimento/ diferenciação das células epiteliais, pois efeitos da ativina A sobre a diferenciação das células epiteliais mamárias gestacionais foram identificados. Verificou-se que ácinos obtidos a partir de ratas no 19º dia de gestação (lactogênese) e tratados com ativina A expressaram menos mRNA da principal proteína do leite, a β -caseína (BUSSMANN et al., 2004). A diminuição da expressão protéica da ativina A durante esta fase, permitiria que β -caseína começasse a ser expressa. Consistente com esse efeito, em células decíduais verificou-se que a ativina A diminui a expressão do receptor da PRL/hLP, que é conhecido como o principal estimulante da produção de β -caseína nas células epiteliais mamárias (GU *et al.*, 1996; WALL & MCFADDEN, 2007). Sabe-se que as ativinas diminuem a expressão de PRL em lactotrofos hipofisários (LACERTE *et al.*, 2004), porém não existem relatos descrevendo a ação das ativinas sobre a expressão de PRL ou de seu receptor na glândula mamária. Juntos esses dados indicam que as ativinas poderiam participar do processo de diferenciação do epitélio mamário de forma direta ou indireta.

O desenvolvimento/diferenciação das células mamárias durante a lactogênese ocorre pela interação entre o epitélio e o estroma (CUNHA *et al.*, 2004). Exemplificando essas interações temos o hormônio GH que somente age nas células estromais, pois elas são as únicas que expressam seus receptores na glândula mamária. Seu efeito principal é

induzir a expressão de IGF-I pelas células estromais. Essa somatomedina, por sua vez, age nas células epiteliais mamárias induzindo a sua diferenciação (WISEMAN & WERB, 2002).

Outro exemplo da influência dos fatores secretados pelo estroma é a expressão de pelo menos 3 isoformas do fator de crescimento dos fibroblastos, FGF-1; FGF-2 e FGF-7 na mama bovina. Esses fatores de crescimento são expressos no estroma mamário adjacente as estruturas epiteliais alveolares, influenciando o ciclo celular das células ductais e alveolares, principalmente durante o crescimento isométrico e durante o período de involução mamária (HOVEY *et al.*, 2001b).

As ativinas, por sua vez, possuem um papel regulatório parácrino e autócrino em diversos tecidos, como por exemplo a hipófise (BILEZIKJIAN *et al.*, 2004). A presença das ativinas e de seus receptores no parênquima e estroma mamário durante as fases não gestacional e gestacional sugere que as ativinas desempenhem um papel regulatório parácrino e ou autócrino neste tecido durante as fases não gestante e gestante.

No presente estudo as técnicas de *PCR em tempo real* e de *imunoistoquímica* demonstraram a expressão gênica e protéica dos receptores ActRIB e ActRIIA nas células epiteliais e estromais durante as 3 fases de desenvolvimento mamário estudadas. Durante a lactogênese houve um aumento significativo na expressão gênica do receptor ActRIB e um aumento não significativo na expressão gênica do receptor ActRIIA.

A expressão protéica do receptor ActRIB nas células estromais foi menor na 2ª fase gestacional que na fase não gestacional. De forma contrária, a expressão estromal do receptor ActRIIA não diferiu entre as fases.

O receptor ActRIIA manteve o mesmo nível de expressão durante a lactogênese e a fase não gestacional. Sua expressão durante a mamogênese nas células epiteliais ductais e alveolares foi maior que a fase não gestacional, acompanhando o aumento da expressão protéica da cadeia β A ativina/inibina.

Esses resultados sugerem que durante a mamogênese o aumento da expressão da cadeia β A ativina/inibina e do seu co-receptor ActRIIA são necessários para o desenvolvimento da estrutura tridimensional ductal. Por outro lado, durante a lactogênese, a diminuição da expressão da cadeia β A ativina/inibina e do seu receptor ActRIB pode ser necessária para que ocorra a diferenciação do epitélio mamário de um estado não secretor, para um estado pré-secretor.

Os contra-reguladores ou antagonistas endógenos das ativinas são as inibinas e as folistatinas. O presente estudo identificou pela primeira vez a presença protéica e gênica da cadeia α -inibina e da folistatina na glândula mamária bovina.

A expressão protéica da cadeia α -inibina não demonstrou diferenças entre as fases de desenvolvimento mamário. Mas, durante o período gestacional, o mRNA da presente proteína apresentou uma expressão significativamente maior quando comparada à fase não

gestacional. Experimentos realizados com testículos de javalis demonstraram que um inibidor da aromatase, o *letrozole*, foi eficaz em diminuir a expressão protéica de inibina A pelas células leydig, demonstrando que em machos o estradiol influencia a expressão protéica de inibina testicular (AT-TARAS *et al.*, 2006). No presente estudo somente o mRNA da α -inibina aumentou durante a gestação, sugerindo que uma maior concentração de estradiol plasmático durante a gestação poderia influenciar a expressão gênica da α -inibina. Pouco é sabido sobre o controle transducional das ativinas, seus receptores e antagonistas endógenos na glândula mamária. Contudo, estudos em camundongos gestantes e não gestantes, mostraram padrões de expressão gênica e protéica divergentes para as cadeias ativina/inibina e seus receptores (JERUSS *et al.*, 2003).

Outro antagonista endógeno estudado no presente estudo foi a folistatina. Sua expressão protéica foi similar em todas as fases, porém a folistatina apresentou imunocoloração estromal mais acentuada na fase não gestacional, indicando uma maior necessidade do antagonismo das ativinas realizado pela folistatina nesta fase do desenvolvimento mamário.

Além das ativinas, a folistatina também é conhecida por neutralizar os efeitos de outro membro da superfamília TGF- β , a miostatina (HILL *et al.*, 2002). O efeito clássico da miostatina é regular o crescimento

das fibras musculares esqueléticas, interferindo na massa total da musculatura esquelética de vertebrados (LEE & McFERRON, 2001). Em adipócitos bovinos, a miostatina age impedindo que os pré-adipócitos se diferenciem em adipócitos, efeito similar a ativina neste tecido (HIRAI *et al.*, 2007). Portanto, um aumento da folistatina estromal na fase em que há uma maior deposição de tecido adiposo na mama, a fase não gestacional, poderia evitar que a ativina e a miostatina impedissem a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Na glândula mamária a expressão gênica da miostatina foi detectada em diferentes estágios do desenvolvimento na espécie suína (JI *et al.*, 1998).

A folistatina foi unicamente caracterizada na glândula mamária de ratas, onde foi apontada como a única contra-reguladora das ações da ativina na glândula mamária desta espécie até o presente momento (BUSSMANN *et al.*, 2004). Essa conclusão foi publicada devido ao fato de que o mRNA da cadeia α -inibina não foi detectada no estudo em questão.

Na espécie bovina, a presença gênica e protéica de folistatina e α -inibina nas fases de desenvolvimento mamário estudadas, indicam que as ativinas podem ser contra-reguladas pelas ações da folistatina e da α -inibina. Essa contra-regulação parece ser importante devido ao fato de que a folistatina tem sua expressão estromal maior na fase não gestacional e o mRNA da cadeia α -inibina é aumentado durante a gestação. Porém, o co-receptor das inibinas, o betaglicano, responsável

por acoplar a subunidade α da inibina, não foi caracterizado no presente trabalho, portanto, a ação da inibina na contra-regulação dos efeitos das ativinas na glândula mamária bovina não é conclusiva.

Juntos, os resultados aqui relatados, demonstram pela primeira vez que as cadeias $\beta A/\beta B$ das ativinas/inibinas, seus receptores ActRIB e ActRIIA, e seus contra-reguladores folistatina e α da inibina são expressos na glândula mamária bovina influenciando de forma determinante seu desenvolvimento gestacional. A expressão gênica e protéica diferenciada dessas proteínas sugere que o sistema ativinas-inibinas-folistatina influencia o estágio de desenvolvimento e diferenciação das células epiteliais mamárias, pois as proteínas em questão apresentavam uma expressão diferenciada durante os diferentes estágios de desenvolvimento mamário gestacional.

Novos estudos deverão esclarecer o papel destas proteínas durante a lactação e involução, não somente sobre os aspectos morfoestruturais das células secretoras do leite, mas também sobre seus aspectos morfofuncionais e secretores.

6. Conclusões

As cadeias da ativina/inibina, $\beta A/\beta B$, seus receptores ActRIB e ActRIIA, a cadeia α -inibina e a proteína ligadora folistatina são expressas na glândula mamária bovina púbere não gestacional e gestacional durante a mamogênese e lactogênese.

A cadeia βA ativina/inibina é mais expressa nas estruturas alveolares e ductais durante a mamogênese.

A cadeia βA ativina/inibina é mais expressa nas células estromais durante a lactogênese.

O receptor ActRIB é mais expresso nas células estromais da glândula mamária bovina não gestacional.

O receptor ActRIB é mais expresso nas estruturas alveolares e ductais durante a mamogênese.

O receptor ActRIIA é mais expresso nas estruturas alveolares e ductais durante a mamogênese.

A folistatina mais expressa nas células estromais da glândula mamária bovina não gestacional.

O mRNA das cadeias β A e β B da ativina/inibina, seus receptores ActRIB e ActRIIA, a cadeia α -inibina e a proteína ligadora folistatina é expresso na glândula mamária bovina púbere não gestacional e gestacional durante a mamogênese e lactogênese.

O mRNA da cadeia α -inibina é mais expresso na glândula mamária bovina gestacional.

O mRNA do receptor ActRIB é mais expresso durante a lactogênese.

7. BIBLIOGRAFIA

ALAN L. SCHNEYER, QIFA WANG, YISRAEL SIDIS, AND PATRICK M. SLUSS. Differential distribution of follistatin isoforms: application of a new FS315-specific immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab*, v.89, n.10, p.5067-75. 2004.

[AKERS, R.M., MCFADDEN, T.B., PURUP, S., VESTERGAARD, M., SEJRSEN, K., CAPUCO, A.V.](#) Local IGF-I axis in peripubertal ruminant mammary development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.5, n.1, p.43-51. 2000.

[AKERS, R.M., ELLIS, S.E., BERRY, S.D.](#) Ovarian and IGF-I axis control of mammary development in prepubertal heifers. *Domest Anim Endocrinol*, v.29, n.2, p.259-67. 2005.

[AKERS, R.M.](#) Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.89, n.4, p.1222-34. 2006.

[ANDERSSON, A.M., MULLER, J., SKAKKEBAEK, N.E.](#) Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *J Clin Endocrinol Metab*, v.83, n.12, p.4451-8. 1998.

[AT-TARAS, E.E., KIM, I.C., BERGER, T., CONLEY, A., ROSER, J.F.](#) Reducing endogenous estrogen during development alters hormone

production by porcine Leydig cells and seminiferous tubules. [**Domest Anim Endocrinol.**](#) v.18; [Epub ahead of print]. 2006.

[ATWOOD, C.S., HOVEY, R.C., GLOVER, J.P., CHEPKO, G., GINSBURG, E., ROBISON, W.G., VONDERHAAR, B.K.](#) Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. **J Endocrinol**, v.167, n.1, p.39-52. 2000.

BERNARD, D.J., CHAPMAN, S.C., WOODRUFF, T.K. Mechanisms of inhibin signal transduction. **Recent Prog Horm Res**, v.56, p.417-50. 2001.

[BILEZIKJIAN, L.M., BLOUNT, A.L., LEAL, A.M., DONALDSON, C.J., FISCHER, W.H., VALE, W.W.](#) Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. [**Mol Cell Endocrinol.**](#) v.15, n.1,p.29-36. 2004.

[BURDETTE, J.E., JERUSS, J.S., KURLEY, S.J., LEE, E.J., WOODRUFF, T.K.](#) Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. **Cancer Res**, v.65, n.17, p.7968-75. 2005.

[BURDETTE, J.E., WOODRUFF, T.K.](#) Activin and estrogen crosstalk regulates transcriptional and cell cycle control in human breast cancer cells. **Endocr Relat Cancer** Epub ahead of print. 2007.

BUSSMANN, U.A., LANUZA, G.M., BUSSMANN, L.E. Activin and follistatin in rat mammary gland. **Mol Cell Endocrinol.** v.30, n.221, p.9-19. 2004.

[CAPUCO, A. V.](#), [ELLIS, S.](#), [WOOD, D. L.](#), [AKERS, R. M.](#), [GARRETT, W.](#)

Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves. ***Tissue Cell***, v.34, n.3, p.143-54. 2002.

[CAPUCO, A. V.](#), [ELLIS, S.](#) Bovine mammary progenitor cells: Current concepts and future directions. ***J Mammary Gland Biol Neoplasia***, v.10, n.1, p.5-15. 2005.

CHOMCZYNSKI, P. SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. ***Analyt Bioch***, v.162, n.1, p.156-9. 1987.

[CUNHA, G.R.](#), [COOKE, P.S.](#), [KURITA, T.](#) Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. ***Arch Histol Cytol***, v.67, n.5, p.417-34. 2004.

[DERYNCK, R.](#), [ZHANG, Y.](#), [FENG, X. H.](#) Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. ***Cell***, v.11, n.6, p.737-40. 1998.

DI LORETO, C., REIS, F.M., CATALDI, P., ZUIANI, C., LUISI, S., BELTRAMI, C.A., PETRAGLIA, F. Human mammary gland and breast carcinoma contain immunoreactive inhibin/activin subunits: evidence for a secretion into cystic fluid. ***Eur J Endocrinol***, v.141, n.2, p.190-4. 1999.

[DJONOV, V.](#), [ANDRES, A.C.](#), [ZIEMIECKI, A.](#) Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland.

Microsc Res Tech, v.15, n.52, p.182-9. 2001.

ELLIS, S.E. *Mechanisms controlling ductal morphogenesis in the ruminant mammary gland*. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University (Tese de Doutorado) 101 p. 1998.

[FLINT, D.J.](#), [KNIGHT, C.H.](#) Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. ***J Mammary Gland Biol Neoplasia***, v.2, n.1, p.41-8. 1997.

[FORSYTH, I.A.](#) The insulin-like growth factor and epidermal growth factor families in mammary cell growth in ruminants: action and interaction with hormones. ***J Dairy Sci***, v.79, n.6, p.1085-96. 1996.

[FRASOR, J.](#), [DANES, J.M.](#), [KOMM, B.](#), [CHANG, K.C.](#), [LYTTLE, C.R.](#), [KATZENELLENBOGEN, B.S.](#) Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. ***Endocrinology***. v.144, n.10, p.4562-74. 2003.

[GADDY-KURTEN, D.](#), [TSUCHIDA, K.](#), [VALE, W.](#) Activins and the receptor serine kinase superfamily. ***Recent Prog Horm Res***, v.50, p.109-29. 1995.

GIBSON, U.E., HEIDI, C.A., WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. ***Genome Res***, v.6, n.10, p.995-1001. 1996.

[GU, Y., SRIVASTAVA, R.K., CLARKE, D.L., LINZER, D.I., GIBORI, G.](#) The decidual prolactin receptor and its regulation by decidua-derived factors. ***Endocrinology***. v.137, n.11, p.4878-85. 1996.

HARRISON, C. A., GRAY, P.C., VALE, W. W., ROBERTSON, M. D. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. ***Trends Endocrinol Metab***, v.16, n.2, p.73-8. 2005.

[HELDIN, C. H., MIYAZONO, K., TEN DIJKE, P.](#) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. ***Nature***. v.4, n.6659, p.465-71. 1997.

HILL., J.J., DAVIES, M.V., PEARSON, A.A., WANG, J.H., HEWICK, R.M., WOLFMAN, N.M., QIU, Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. ***J Biol Chem***, v.277, n.43, p.40735-41. 2002.

[HIRAI S, MATSUMOTO H, MORIYA NH, KAWACHI H, YANO H.](#) Follistatin rescues the inhibitory effect of activin A on the differentiation of bovine preadipocyte. ***Domest Anim Endocrinol***. v.23, Epub ahead of print. 2006.

[HIRAI, S., MATSUMOTO, H., HINO, N., KAWACHI, H., MATSUI, T., YANO, H.](#) Regulation of myostatin activity and muscle growth. ***Domest Anim Endocrinol***. v.32, n.1, p.1-14. 2007.

[HOVEY, R. C., MCFADDEN, T. B., AKERS, R. M.](#) Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species

comparison. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.4, n.1, p.53-68.
1999.

[HOVEY, R.C., TROTT, J.F., GINSBURG, E., GOLDHAR, A., SASAKI, M.M., FOUNTAIN, S.J., SUNDARARAJAN, K., VONDERHAAR, B.K.](#),
Transcriptional and spatiotemporal regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland. **Dev Dyn**, v.222, n.2, p.192-205. 2001.

[HOVEY, R.C., DAVEY, H.W., VONDERHAAR, B.K., MACKENZIE, D.D., MCFADDEN, T.B.](#) Paracrine action of keratinocyte growth factor (KGF) during ruminant mammogenesis. **Mol Cell Endocrinol**, v.5, n.1, p.47-56. 2001b.

[HOVEY, R.C.](#), TROTT, J.F., VONDERHAAR, B.K. Establishing a framework for the functional mammary gland: From endocrinology to morphology. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.7, n.1, p.17-38. 2002.

[HOVEY, R.C.](#), [TROTT, J.F.](#) Morphogenesis of mammary gland development. **Adv Exp Med Biol**, v.554, p.219-28. 2004.

HOWARD, B.A., GUSTERSON, B.A. Human breast development. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.10, n.1, p.5-15. 2000.

INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J; WHITE, T.J. PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, San Diego, 482p. 1990.

[JERUSS, J.S., SANTIAGO, J.Y., WOODRUFF, T.K.](#) Localization of activin and inhibin subunits, receptors and SMADs in the mouse mammary gland. ***Mol Cell Endocrinol***, v.30, n.1, p.185-96. 2003.

[JERUSS, J.S., STURGIS, C.D., RADEMAKER, A.W., WOODRUFF, T.K.](#) Down-regulation of activin, activin receptors and smads in high-grade breast cancer. ***Cancer Res***, v.63, n.13, p.3738-90. 2003b.

[JI, S., LOSINSKI, R.L., CORNELIUS, S.G., FRANK, G.R., WILLIS, G.M., GERRARD, D.E., DEPREUX, F.F., SPURLOCK, M.E.](#) Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. ***Am J Physiol***. V.275, n.2, p.1265-73. 1998.

KNABEL, M., KÖLLE, S., SINOWATZ, F. Expression of growth hormone receptor in the bovine mammary gland during prenatal development. ***Anat Embryol***, v.198, n.2, p.163-9. 1998.

[KOMATSU, Y., SCOTT, G., NAGY, A., KAARTINEN, V., MISHINA, Y.](#) BMP type I receptor ALK2 is essential for proper patterning at late gastrulation during mouse embryogenesis. ***Dev Dyn***, v.236, n.2, p.512-7. 2007.

[LACERTE, A., LEE, E.H., REYNAUD, R., CANAFF, L., DE GUISE, C., DEVOST, D., ALI, S., HENDY, G.N., LEBRUN, J.J.](#) Activin inhibits pituitary prolactin expression and cell growth through Smads, Pit-1 and menin.
Mol Endocrinol. v.18, n.6, p.1558-69. 2004.

[LAMOTE, I.](#), [MEYER, E.](#), [MASSART-LEEN, A.M.](#), [BURVENICH, C.](#) Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *[Steroids](#)*, v.69, n.3, p.145-59. 2004.

LARSON, L.B. Lactation. Iowa: **The Iowa State University Press/AMES**. 1985. 275p.

[LEWIS, K.A.](#), [GRAY, P.C.](#), [BLOUNT, A.L.](#), [MACCONELL, L.A.](#), [WIATER, E.](#), [BILEZIKJIAN, L.M.](#), [VALE, W.](#) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. ***Nature***, v.23, n.6776, p.411-4. 2000.

[LEE, S.J.](#), [MCPHERRON, A.C.](#) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *[Proc Natl Acad Sci](#)*. V.98, n.16, p.9306-11. 2001.

[LI, R.W.](#), [MEYER, M.J.](#), [VAN TASSELL, C.P.](#), [SONSTEGARD, T.S.](#), [CONNOR, E.E.](#), [VAN AMBURGH, M.E.](#), [BOISCLAIR, Y.R.](#), [CAPUCO, A.V.](#) Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat. ***Physiol Genomics***, v.3, n.1, p.42-53. 2006.

[LIN, S.J.](#), [LERCH, T.F.](#), [COOK, R.W.](#), [JARDETZKY, T.S.](#), [WOODRUFF, T.K.](#) The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *[Reproduction](#)*, v.132, n.2, p.179-90. 2006.

[LIU, Q.Y.](#), [NIRANJAN, B.](#), [GOMES, P.](#), [GOMM, J.J.](#), [DAVIES, D.](#), [COOMBES, R.C.](#), [BULUWELA, L.](#) Inhibitory effects of activin on the

growth and morphogenesis of primary and transformed mammary epithelial cells. **Cancer Res**, v.1, n.5, p.1155-63. 1996.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8. 2001.

[LOLLIVIER, V.](#), [MARNET, P.G.](#), [DELPAL, S.](#), [RAINTEAU, D.](#), [ACHARD, C.](#), [RABOT, A.](#), [OLLIVIER-BOUSQUET, M.](#) Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. **J Physiol**, v.570, n.1, p.125-40. 2006..

[MARCHETTI, C.](#), [HAMDANE, M.](#), [MITCHELL, V.](#), [MAYO, K.](#), [DEVISME, L.](#), [RIGOT, J.M.](#), [BEAUVILLAIN, J.C.](#), [HERMAND, E.](#), [DEFOSSEZ, A.](#) Immunolocalization of inhibin and activin alpha and betaB subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. **Biol Reprod**. V.68, n.1, p.230-5. 2003.

[MASSAGUE, J.](#), [BLAIN, S.W.](#), [LO, R.S.](#) TGF- β signaling in growth control, cancer and heritable disorders. **Cell**, v.13, n.2, p.295-309. 2000.

[MATHEWS, L.S.](#), [VALE, W.W.](#), Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. **Cell**, v.14, n.6, p.973-82. 1991.

[MATZUK, M.M.](#), [KUMAR, T.R.](#), [VASSALLI, A.](#), [BICKENBACH, J.R.](#), [ROOP, D.R.](#), [JAENISCH, R.](#), [BRADLEY, A.](#) Functional analysis of activins during mammalian development. **Nature**, v.23, n.6520, p.354-6. 1995.

[NELSON, C.M.](#), [VANDUIJN, M.M.](#), [INMAN, J.L.](#), [FLETCHER, D.A.](#),
[BISSELL, M.J.](#) Tissue geometry determines sites of mammary
branching morphogenesis in organotypic cultures. **Science**, v.13,
n.5797, p.298-300. 2006.

[NEVILLE, M.C.](#), [MCFADDEN, T.B.](#), [FORSYTH, I.](#) Hormonal regulation of
mammary differentiation and milk secretion. ***J Mammary Gland Biol
Neoplasia***, v.7, n.1, p.49-66. 2002.

OLLIVIER-BOUSQUET, M., DEVINOY, E. Physiology of lactation: Old
questions, new approaches. ***Livestock Production Science***, v.98,
n.1, p.163-73. 2005.

[PLATH, A.](#), [EINSPANIER, R.](#), [PETERS, F.](#), [SINOWATZ, F.](#), [SCHAMS, D.](#)
Expression of transforming growth factors alpha and beta-1
messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages
of development and lactation. ***J Endocrinol***, v.155, n.3, p.501-11.
1997.

[PHILLIPS, D.J.](#) Activins, inhibins and follistatins in the large domestic
species. ***Domest Anim Endocrinol***, v.28, n.1, p.1-16. 2005.

[PURUP, S.](#), [SEJRSEN, K.](#), [FOLDAGER, J.](#), [AKERS, R.M.](#) Effect of
exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal
mammary growth, serum hormones and acute in-vitro proliferative
response of mammary explants from Holstein heifers. ***J Endocrinol***,
v.139, n.1, p.19-26. 1993.

- REIS, F.M., COBELLIS, L., TAMEIRAO, L.C., ANANIA, G., LUISI, S., SILVA, I.S., GIOFFRE, W., DI BLASIO, A.M., PETRAGLIA, F. Serum and tissue expression of activin A in postmenopausal women with breast cancer. **J Clin Endócrino Metab**, v.87, n.5, p.2277-82. 2002.
- REIS, F.M., LUISI, S., CARNEIRO, M.M., COBELLIS, L., FEDERICO, M., CAMARGOS, A.F., PETRAGLIA, F. Activin, inhibin and the human breast. **Mol Cell Endocrinol**, v.15, n.1, p.77-82. 2004.
- REXROAD, J., CASIDA, L.E., TYLER, E.J. Crown-rump length of fetuses in purebred Holstein-Friesian cows. **J Dairy Sci**, v.57, n.3, p.346-47. 1974.
- ROBINSON, G.W., HENNIGHAUSEN, L. Inhibins and activins regulate mammary epithelial cell differentiation through mesenchymal epithelial interactions. **Development**, v.124, n.14, p.2701-8. 1997.
- [SAITO, S.](#), [SIDIS, Y.](#), [MUKHERJEE, A.](#), [XIA, Y.](#), [SCHNEYER, A.](#) Differential biosynthesis and intracellular transport of follistatin isoforms and follistatin-like-3. **Endocrinology**, v.146, n.12, p.5052-62. 2005.
- SIDIS, Y., TORTORIELLO, D. V., HOLMES, W. E., PAN, Y., KEUTMANN, H. T., SCHNEYER, A. L. Follistatin-related protein and follistatin differentially neutralize endogenous *vs.* exogenous activin. **Endocrinology**, v.143, n.5, p.1613-24. 2002..
- [SILBERSTEIN, G. B.](#) Postnatal mammary gland morphogenesis. **Microsc Res Tech**, v.15, n.2, p.155-62. 2001.

- SVENNERSTEN-SJAUNJA, K., OLSSON, K. Endocrinology of milk production. ***Domest Anim Endocrinol***, v.29, n.2, p.241-58. 2005.
- [SHEFFIELD, L.G.](#) Organization and growth of mammary epithelia in the mammary gland fat pad. ***J Dairy Sci***, v.71, n.10, p.2855-74. 1987.
- STERNLICHT, M. D. key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. ***Breast Cancer Res***, v.8, n.1, p.201. 2005.
- [SUCHYTA, S.P., SIPKOVSKY, S., HALGREN, R.G., KRUSKA, R., ELFTMAN, M., WEBER-NIELSEN, M., VANDEHAAR, M.J., XIAO, L., TEMPELMAN, R.J., COUSSENS, P.M.](#) Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray enhanced for mammary-specific transcripts. ***Physiol Genomics***, v.16, n.1, p.8-18. 2003.
- [TESSIER, C., PRIGENT-TESSIER, A., BAO, L., TELLERIA, C.M., FERGUSON-GOTTSCHALL, S., GIBORI, G.B., GU, Y., BOWEN-SHAUVER, J.M., HORSEMAN, N.D., GIBORI, G.](#) Decidual activin: its role in the apoptotic process and its regulation by prolactin. ***Biol Reprod***. V.68, n.5, p.1687-94. 2003.
- TUCKER, H.A. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. ***J Dairy Sci***, v.83, n.4, p.874-84. 2000.
- VALE, W., RIVIER, C., HSUEH, A., CAMPEN, C., MEUNIER, H., BICSAK, T. Chemical and biochemical characterization of the inhibin family of protein hormones. ***Rec Prog Horm Res***, v.44, p.1-34. 1988.

- [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, n.2, p.716-20. 2007.
- [WELT, C., SIDIS, Y., KEUTMANN, H., SCHNEYER, A.](#) Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. **Exp Biol Med**, v.227, n.9, p.724-52. 2002.
- [WISEMAN, B.S., WERB, Z.](#) Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science**. V.296, n.5570, p.1046-9. 2002.
- [YUAN, J.S., REED, A., CHEN, F., STEWART, C.N. JR.](#) Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**. V.22, n.7, p.7-85. 2006.
- [ZARZYNSKA, J., GAJEWSKA, M., MOTYL, T.](#) Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. **J Dairy Res**, v.72, n.1, p.39-48. 2005.