UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

EMANUEL MANICA

**Involução da glândula mamária durante o final da lactação e período
seco de cabras Saanen: respostas de sobrevivência celular ao estresse
agudo e relações com a temperatura por infravermelho**

Pirassununga

2018

EMANUEL MANICA

Involução da glândula mamária durante o final da lactação e período seco de cabras Saanen: respostas de sobrevivência celular ao estresse agudo e relações com a temperatura por infravermelho

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM278i Manica, Emanuel
 Involução da glândula mamária durante o final da lactação e período seco de cabras Saanen: respostas de sobrevivência celular ao estresse agudo e rela / Emanuel Manica ; orientador João Alberto Negrão. -- Pirassununga, 2018.
 93 f.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Estresse. 2. Involução mamária. 3. Células epiteliais mamárias. 4. Termografia por Infravermelho. I. Negrão, João Alberto, orient. II. Título.

EMANUEL MANICA

**Involução da glândula mamária durante o final da lactação e período seco de cabras
Saanen: respostas de sobrevivência celular ao estresse agudo e relações com a
temperatura por infravermelho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Data de aprovação: ____/ ____/ ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Adélia Kunzler Schio, Pedro Schio (*In memoriam*), Alzira Locatelli Manica (*In memoriam*) e Emílio Manica (*In memoriam*). A eles que em simples palavras disseram “Para ser feliz a gente precisa sair do lugar, a gente tem que ser o lugar. E no final, terá sua trajetória feliz”. A eles que me ensinaram tanto com tão pouco. A eles que sempre estiveram do meu lado. A eles que foram partindo e deixando uma saudade infinita.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos àqueles que fizeram tudo isso acontecer, meus pais, José e Lucimar e minha irmã Eduarda, meu infinito agradecimento. Vocês sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam o melhor de todos, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não a ser o melhor, mas a fazer o melhor de mim sempre. Obrigado por tudo.

Agradeço a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida em cursar o mestrado.

A todas as cabras que contribuíram para a realização do experimento.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Alberto Negrão, por todos ensinamentos repassados e pela oportunidade de realizar o experimento em seu laboratório.

A Dr^a. Giovana Merighe, por toda paciência e dedicação em me auxiliar no decorrer do mestrado.

A minha melhor amiga Gabriela Marques Marcilli, com quem eu ri, chorei e me diverti. E por você me aguentar nesses 8 anos de amizade. Te amo muito!

Ao melhor quarteto Dri, Gabi, Manu e Mel, vocês foram essenciais, me ouvindo, apoiando e muitas vezes puxando a orelha. Agradeço infinitamente!

A minha amiga Natália Oliveira, que chegou a pouco em minha vida, mas fez-se presente nas horas tristes e alegres. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos do Sul, Sandro, Vandí e Dadi. Vocês que mesmo estando longe, sempre foram presente, ligando ou mandando uma simples mensagem. Vocês são essenciais para mim!

A M.sc Priscila Silva dos Santos, te agradeço por todos ensinamentos, pelos incansáveis dias de manejo juntos e todo trabalho realizado com amor. Obrigado!

Aos colegas e amigos M.sc Henrique Barbosa Hooper e M.sc Aska Ujita, agradeço por toda ajuda e boas risadas. E também pelos melhores *Coffe Time*.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Fisiologia Animal, funcionários e estagiários pelo auxílio durante o experimento e no decorrer das atividades diárias.

Por fim, o meu profundo agradecimento a minha família e amigos que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente. Agradeço.

“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

MANICA, E. **Involução da glândula mamária durante o final da lactação e período seco de cabras Saanen: respostas de sobrevivência celular ao estresse agudo e relações com a temperatura por infravermelho.** 2018. 98 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Durante a vida reprodutiva de uma fêmea a glândula mamária passa por diversas modificações. O período seco é de extrema importância para a renovação celular do tecido mamário para a próxima lactação, ocorrendo, nessa fase, intensa apoptose nas células epiteliais mamárias. Com isso, acredita-se que os glicocorticoides podem inibir a expressão de genes relacionados à síntese de leite e síntese de proteínas do leite durante a involução mamária. Além disso, nas horas seguintes à interrupção de ordenha, as células epiteliais ainda sintetizam leite, a qual gera um acúmulo de leite na glândula mamária, aumento da pressão intramamária e pode causar a abertura do canal do teto, favorecendo a entrada de microrganismos patógenos, aumentando a temperatura superficial do úbere. Foram utilizadas cabras da raça Saanen submetidas ao processo de secagem aos 249 ± 8 dias de lactação. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar o aumento de cortisol plasmático (via administração exógena do hormônio adrenocorticotrófico) sobre a expressão dos genes da via IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR e proteínas do leite (LALBA, CSN2 e LF) no tecido mamário, e a composição das secreções mamárias durante o período inicial da secagem. Observou-se que o aumento do cortisol causou uma diminuição significativa na expressão relativa de IGF-1R. Porém, não apresentou efeito sobre os demais genes PI3K/Akt/mTOR e LALBA, CSN2 e LF. O período de secagem diminuiu significativamente a expressão de LALBA e CSN2 e aumentou a expressão de LF. Além disso, o cortisol aumentou significativamente a infiltração de células imunes e manteve a concentração de lactoferrina mais elevada nas secreções mamárias. Os componentes do leite não foram alterados com a administração de ACTH. No entanto, o período de secagem aumentou significativamente a porcentagem de gordura, lactose, proteína e extrato seco. O segundo estudo teve por objetivo avaliar a temperatura superficial do úbere e ocular através da temperatura por infravermelho e relaciona-las com a contagem de células somáticas durante o período de secagem. Assim, a temperatura superficial do úbere foi significativamente correlacionada com o status de saúde do úbere das cabras Saanen. Por fim, a temperatura por infravermelho detectou as alterações nas temperaturas superficiais e a suas relações com a contagem de células somáticas.

Palavras-chave: Estresse. Expressão gênica. Período de secagem. Proteínas do leite. Termografia.

ABSTRACT

MANICA, E. **Mammary gland involution during late lactation and dry period of Saanen goats: cellular survival responses to acute stress and relations with infrared temperature.** 2018. 98 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

During the reproductive life of a female, the mammary gland undergoes several modifications. The dry period is of extreme importance for the cellular renewal of the mammary tissue for the next lactation, occurring, at this stage, intense apoptosis in the mammary epithelial cells. With this, it is believed that glucocorticoids can inhibit the expression of genes related to milk synthesis and milk protein synthesis during mammary involution. In the hours following the interruption of milking, the epithelial cells still synthesize milk, which generates an accumulation of milk in the mammary gland, increased intramammary pressure and can cause the opening of the roof canal favoring the entry of pathogenic microorganisms and increasing the udder superficial temperature. So, Saanen goats were submitted to the drying process at 249 ± 8 days of lactation. The first study aimed to evaluate the increase of plasma cortisol (via exogenous adrenocorticotrophic hormone administration) on the expression of IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR and milk proteins (LALBA, CSN2 and LF) genes in mammary tissue, and the composition of the mammary secretions during the initial drying period. It was observed that increased cortisol caused a significant decrease in the relative expression of IGF-1R. However, it had no effect on the other PI3K/Akt/mTOR and LALBA, CSN2 and LF genes. The drying period significantly decreased LALBA and CSN2 expression and increased LF expression. In addition, cortisol significantly increased the infiltration of immune cells and maintained the higher concentration of lactoferrin in mammary secretions. Milk components were not altered with ACTH administration. However, the drying period significantly increased the percentage of fat, lactose, protein and dry extract. The second study aimed to evaluate the udder and ocular surface temperature through infrared temperature and correlates them with the somatic cell count during the drying period. Thus, the surface temperature of the udder was significantly correlated with the health status of the udder of the Saanen goats. Finally, the infrared temperature detected changes in surface temperatures and their relationships with somatic cell counts.

Key words: Dry-off period. Gene expression. Milk protein. Stress. Thermography.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1.1 Glândula mamária.....	11
1.1.2 Desenvolvimento da glândula mamária e ciclo lactacional.....	13
1.1.3 Métodos de secagem.....	15
1.1.4 Período seco.....	16
1.1.5 Regressão do tecido mamário em ruminantes	17
1.1.6 Regressão do tecido mamário: apoptose das células epiteliais mamárias	20
1.1.7 Regressão do tecido mamário: alterações na síntese de proteínas do leite.....	21
1.1.8 Receptor de IGF-1 (IGF-IR) e a via de síntese de proteínas do leite	23
1.1.9 Mecanismos de defesa da glândula mamária no período de secagem.....	26
1.1.10 Lactoferrina	28
1.1.11 Estresse e produção de espécies reativas de oxigênio	29
1.1.12 Estresse e fisiologia da glândula mamária.....	30
REFERÊNCIAS	33
2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ACTH SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A SÍNTESE DE LEITE E PROTEÍNAS DO LEITE, E COMPOSIÇÃO DAS SECREÇÕES MAMÁRIAS DURANTE A INVOLUÇÃO MAMÁRIA DE CABRAS SAANEN	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT	46
2.1 INTRODUÇÃO	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.2.1 Animais, dieta, ordenha e manejo de secagem	48
2.2.2 Experimento	49
2.2.3 Coleta e análise das secreções mamárias e sangue.....	49
2.2.4 Análise estatística	51
2.3 RESULTADOS.....	52
2.3.1 Efeito do final da lactação sobre a produção de leite e componentes do leite	52
2.3.2 Efeito da administração de ACTH e placebo durante o período de secagem.....	54
2.3.3 Efeito da administração de ACTH ou placebo sobre os genes do eixo IGF-1R e PI3K/Akt/mTOR durante o período de secagem das cabras	57

2.4 DISCUSSÃO.....	60
2.5 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	65
3. TEMPERATURA POR INFRAVERMELHO COMO FERRAMENTA PARA DETECTAR MUDANÇAS NA TEMPERATURA SUPERFICIAL DO ÚBERE DE CABRAS SAANEN DURANTE O PERÍODO DE SECAGEM.....	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT	71
3.1 INTRODUÇÃO.....	72
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.2.1 Animais, dieta e manejo antes da secagem.....	73
3.2.2 Experimento	73
3.2.3 Composição química, testes bacteriológicos e contagem de células somáticas das secreções mamárias	74
3.2.4 Imagens termográficas.....	75
3.2.5 Agrupamentos.....	77
3.2.6 Análise estatística	77
3.3 RESULTADOS	78
3.4 DISCUSSÃO	88
3.5 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

Durante a vida reprodutiva de uma fêmea a glândula mamária passa por diversas modificações (STEFANON et al., 2002). Estas, por sua vez, são reguladas por diferentes hormônios e estímulos locais (como, ordenha e amamentação) (CAPUCO et al., 2002). Desse modo, a produção leiteira em ruminantes depende do número e da atividade de secreção das células epiteliais mamárias (CAPUCO et al., 2001), sendo que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) tem papel fundamental na proliferação e na diferenciação celular (MURNEY et al., 2015).

No ciclo lactacional, o período de secagem e o período seco são de extrema importância para a renovação celular do tecido mamário para a próxima lactação, ocorrendo, nessa fase, intensa apoptose nas células epiteliais mamárias (BOUTINAUD et al., 2004). Entretanto, as alterações moleculares que dão início ao processo de involução ainda não são bem claras. Porém, nesse período em resposta aos hormônios e fatores de crescimento, diversas vias de sobrevivência nas células são sinalizadas, especialmente aquelas relacionadas ao IGF-1 (SINGH et al., 2015).

Atualmente, postula-se que os glicocorticoides podem inibir a expressão de genes relacionados à síntese de leite e manutenção da lactação. Dessa forma, acredita-se que o cortisol passa interferir na ação do IGF-1 por alterar a expressão de seu receptor (IGF-1R) e diminuir sua atividade nas células epiteliais mamárias (BOMFIM et al., 2018). Assim, o estudo sobre a influência do cortisol sobre o processo de secagem, secreções mamárias e a expressão de genes relacionados com a sobrevivência das células epiteliais mamárias, torna-se uma ferramenta importante para o entendimento da regressão da glândula mamária no período de secagem de cabras leiteiras.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Glândula mamária

A glândula mamária caracteriza-se por ser uma glândula exócrina cutânea modificada, a qual constitui diversas funções fisiológicas, imunológicas e bioquímicas (PANTSCHENKO et al., 2000), tendo como principal função a síntese e secreção de leite (IP; DARCY, 1996).

As cabras possuem duas glândulas mamárias, conjunto denominado úbere, com localização inguinal (Figura 1) (LI et al., 1999). Assim, o tecido mamário é dividido em dois componentes, o parênquima e o estroma. O primeiro refere-se ao tecido que desempenha a função de síntese de leite e o segundo constitui a estrutura de tecido da glândula, fornecendo suporte e nutrientes para que o parênquima desempenhe suas funções (IP; DARCY, 1996; PANTSCHENKO et al., 2000).

Figura 1- Morfologia da glândula mamária, com ênfase nas estruturas internas destacando o alvéolo mamário.

Fonte: Adaptado de YART, L. et al. **Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants**. Animal, v. 8, n. 1, p. 72-85, 2014.

No parênquima, o lóculo é a maior porção relacionada à síntese de leite, a qual constitui o lóculo, já os lóculos são formados pelos alvéolos e células epiteliais mamárias (Figura 1) (LI

et al., 1999; AKERS et al., 2006). Dentro dessa estrutura, dois tipos celulares compreendem o epitélio alveolar mamário: o basal e luminal.

O epitélio basal caracteriza-se por conter células mioepiteliais, que estão alocadas na parte externa dos alvéolos. Já o epitélio luminal forma os ductos e alvéolos secretores, contendo populações celulares especializadas (LI et al., 1999; NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002). Os ductos, por sua vez, estão divididos em primários e secundários, sendo estruturados com epitélio luminal tubular de células epiteliais e por uma matriz descontínua de células mioepiteliais (LI et al., 1999; AKERS et al., 2006; MACIAS; HINCK, 2012).

Quando as células mioepiteliais se contraem sobre os alvéolos mamários, estes ejetam o leite contido no lúmen alveolar que percorre pelos ductos secundários até os ductos primários, assim alcançando os grandes canais e a cisterna da glândula mamária (LI et al., 1999). As cabras leiteiras possuem maior cavidade cisternal (70 a 90% do volume total do úbere) (MARNET; KOMARA, 2008), podendo armazenar quantidades superiores de leite quando comparada a ovelhas, vacas e búfalas leiteiras (BRUCKMAIER et al., 1994; MARNET; KOMARA, 2008; PORCIONATO; NEGRÃO; PAIVA, 2009; SAFAYI et al., 2010). Desse modo, a proporção de leite alveolar é menor em cabras do que em vacas e ovelhas (LI et al., 1999; SAFAYI et al., 2010).

Além disso, a glândula mamária é irrigada por uma rede de vasos e capilares mamários. Os capilares são caracterizados por conter numerosas ramificações que refletem a sua extensão na glândula mamária (PROSSER et al., 1996; DJONOV; ANDRES; ZIEMIECKI, 2001). Durante o desenvolvimento da glândula, o sistema vascular é composto por um plexo capilar, que ligeiramente aumenta sua estrutura (DJONOV; ANDRES; ZIEMIECKI, 2001). Então, na puberdade os capilares expandem-se pelos ductos epiteliais e ramificam-se entre os adipócitos (DJONOV; ANDRES; ZIEMIECKI, 2001). Porém, apenas na gestação ocorre a fase de angiogênese, processo de formação de vasos sanguíneos a partir dos vasos preexistentes (PROSSER et al., 1996). Nessa fase, individualmente, ocorre uma organização da rede capilar sobre os alvéolos mamários (DJONOV; ANDRES; ZIEMIECKI, 2001), dando suporte para o fluxo sanguíneo alcançar as células epiteliais mamárias.

Na lactação, o fluxo sanguíneo na glândula mamária é maior, fornecendo os precursores necessários para a síntese de leite (PROSSER et al., 1996; SVENNERSTEN-SJAUNJA; OLSSON, 2005). Desse modo, os capilares adjacentes às células epiteliais mamárias apresentam maior área de superfície para facilitar as trocas entre o sangue e tecido, a qual é dependente da taxa de fluxo sanguíneo e permeabilidade capilar (PROSSER et al., 1996).

1.1.2 Desenvolvimento da glândula mamária e ciclo lactacional

A glândula mamária tem como função a produção de leite para a prole (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002). Desse modo, caracteriza-se por ser um órgão altamente especializado que pode repetir o seu desenvolvimento e involução diversas vezes na vida do animal através da renovação de suas estruturas alveolares (IP; DARCY, 1996; LI et al., 1999; CAPUCO et al., 2001; STEFANON et al., 2002; SINGH et al., 2015).

Do nascimento até a pré-puberdade, a glândula mamária cresce proporcionalmente como outros tecidos corporais, caracterizado pelo alongamento e alargamento dos canais no tecido mamário recém formado (LI et al., 1999). Na puberdade, juntamente com o início do ciclo estral, as modificações na glândula mamária são mais intensas (LI et al., 1999). Nessa fase, ocorre extensa ramificação dos ductos mamários sob o tecido estromal que correlacionam-se com o nível de estrógeno presente no plasma, fase importante para dar suporte a lactação (CAPUCO et al., 2002; DESSAUGE et al., 2009; YART et al., 2013).

Durante a gestação, o tecido estromal regride e o parenquima predomina a medida que a glândula mamária desenvolve-se (LI et al., 1999). Com isso, há expansão dos brotos alveolares devido a intensa proliferação celular, e assim formam os lóbulos de alvéolos mamários (LI et al., 1999). Os ductos mamários apresentam-se revestidos por uma camada de células epiteliais cuboidais, que por sua vez são circundadas por uma única camada de células mioepiteliais (LI et al., 1999). Entretanto, na lactação, cada alveolo mamário apresenta-se rodeado por uma matriz extracelular revestida de fibroblastos e uma rede de capilares, além de uma cápsula de tecido conjuntivo envolto de cada lóbulo alveolar (LI et al., 1999).

Durante o ciclo lactacional ocorrem variações na produção leiteira, as quais são representadas pela curva de lactação (Figura 2). Em cabras leiteiras, no início da lactação, tem-se um aumento gradual na produção leiteira até atingir um platô na curva de lactação (KNIGHT; PEAKER, 1984; WARESKI et al., 2001; LEON et al., 2012; BRITO et al., 2017), podendo permanecer estável por algumas semanas (WARESKI et al., 2001). Após esse período, há um decréscimo sutil na curva até a secagem (KNIGHT; PEAKER, 1984; WARESKI et al., 2001).

Figura 2 - Curva de lactação de cabras leiteiras.

Fonte: adaptado de BRITO, L. F. et al. **Modelling lactation curves of dairy goats by fitting random regression models using Legendre polynomials or B-splines**. Canadian Journal of Animal Science, v. 98, n. 0, p. 73-83, 2017.

Por anos, acreditou-se que existiam correlações diretas entre o tamanho e peso da glândula mamária com a produção de leite (LINZELL, 1966). Porém, há muito tempo essa ideia foi desconstruída após experimentos demonstrarem que a produção de leite está relacionada com a taxa de proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias (KNIGHT; PEAKER, 1984; PEAKER; BLATCHFORD, 1988; QUARRIE et al., 1995; CAPUCO; AKERS, 1999; WARESKI et al., 2001; BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENT; JAMMES., 2004; SINGH et al., 2008; BOMFIM et al., 2018).

Quando cabras leiteiras estão em lactação concomitante com gestação, o declínio na produção de leite é mais acentuado do que o de cabras que não estão gestando (WILDE; KNIGHT, 1989). Assim, ao analisar a curva de lactação de cabras não gestantes, observa-se maior persistência leiteira (KNIGHT; PEAKER, 1984; WARESKI et al., 2001; CAJA; SALAMA; SUCH, 2006; SAFAYI et al., 2010).

Alguns autores têm demonstrado que a atividade secretora da célula epitelial mamária aumenta até o pico de lactação, mas não é alterada significativamente durante o avanço da lactação em vacas (CAPUCO et al., 2001) e cabras (WILDE; HENDERSON; KNIGHT et al., 1986; WARESKI et al., 2001; SAFAYI et al., 2010; BOMFIM et al., 2018). Desse modo, o declínio na produção de leite durante a lactação parece estar associado ao número de células epiteliais mamárias (WILDE; KNIGHT, 1989; CAPUCO et al., 2003).

Durante a lactação o número total de células epiteliais mamárias reflete as taxas de proliferação e apoptose (CAPUCO et al., 2001; BOMFIM et al., 2018). Assim, a glândula mamária se desenvolve quando a taxa de proliferação excede a taxa de apoptose e regride quando a taxa de apoptose excede a taxa de proliferação (CAPUCO; AKERS, 1999; WARESKI et al., 2001; BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENT; JAMMES, 2004). Em cabras leiteiras, o número de células epiteliais mamárias ainda aumenta nas primeiras semanas de lactação, podendo ocorrer até a 8ª semana, concomitante com o aumento na produção leiteira (KNIGHT; PEAKER, 1984). Desse modo, a relação entre as taxas de proliferação e apoptose é um fator importante durante a gestação, lactação e involução mamária (ZARZYNSKA; MOTYL, 2008).

Portanto, o desenvolvimento da glândula mamária em uma cabra pode ser caracterizada desde o nascimento até a gestação (mamogênese), nesse período as células contidas na glândula diferenciam-se para iniciar a síntese de leite (lactogênese) e após o parto a produção leiteira é mantida (galactogênese) até a glândula sofrer a involução mamária (LI et al., 1999; PANTSCHENKO et al., 2000).

1.1.3 Métodos de secagem

Com o aumento da capacidade leiteira dos animais nos últimos anos, têm sido estudadas técnicas mais eficazes de secagem. Manejos adotados como a restrição alimentar gradual, utilização de alimentos de baixa qualidade e restrição ou diminuição de água antes e durante a secagem, são considerados importantes para diminuir a produção leiteira (ODENSTEN; CHILLIARD; HOLTENIUS, 2005; OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014). Em cabras, ovelhas e vacas lactantes, alguns animais tendem a diminuir gradativamente a produção leiteira, conhecida como secagem espontânea, a qual é normal em animais que possuem maior tempo de lactação e/ou estejam prenhes (ANNEN et al., 2004; CAJA; SALAMA; SUCH, 2006; COLLIER; ANNEN-DAWSON; PEZESHKI, 2012). Dessa forma, a secagem pode ser realizada por dois métodos comumente utilizados: secagem gradual e secagem abrupta.

1.1.3.1 Secagem gradual

A secagem gradual pode ser compreendida como a diminuição da frequência de ordenha, normalmente passando de duas ordenhas diárias para apenas uma, por um período de dias ou até semanas, que antecede a interrupção completa da ordenha (OLIVER; DODD; NEAVE, 1956; GOTT et al., 2017).

Além da redução da frequência de ordenha, a secagem gradual pode ser acompanhada da diminuição no fornecimento de alimentos no período de dias que antecedem a interrupção total de ordenha. Assim, a combinação da redução de ordenha com o manejo alimentar auxiliará no declínio da síntese de leite pela glândula mamária (OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014). Em casos mais extremos, utiliza-se a redução no fornecimento de água, podendo ser gradual ou uma restrição total por até 24h.

1.1.3.2 Secagem abrupta

Na secagem abrupta, ou também interrupção total de ordenha, não há adaptação da glândula mamária ao processo de secagem (OLIVER; DODD; NEAVE, 1956). Como na secagem gradual, na abrupta também pode-se adotar a restrição alimentar (ODENSTEN; HOLTENIUS; WALLER, 2007; VALIZAHEH; VEIRA; VON KEYSERLINGK, 2008; OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014).

Dentre os manejos alimentares, dois são comumente utilizados: 1) antes da secagem, os animais normalmente sofrem uma restrição alimentar total por 24 horas (OLLIER et al., 2016); ou 2) os animais recebem apenas um alimento volumoso (como, feno) durante o início do período de secagem (OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014). Esse manejo promove um declínio significativo na síntese de leite de até 40% (OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014). A restrição hídrica em casos mais extremos também é utilizada na secagem abrupta, normalmente havendo a restrição alimentar e hídrica por um período de até 24h após a última ordenha.

1.1.4 Período seco

O período seco é considerado desde o momento da interrupção de ordenha/amamentação, até o próximo parto e, assim, início de uma nova lactação (CAPUCO; AKERS, 1999; STEFANON et al., 2002). Esse período é caracterizado por ser um processo fisiológico regulado na glândula mamária de mamíferos (WILDE et al., 1997). Durante essa fase, a glândula mamária sofre uma intensa modificação na sua estrutura alveolar (DE VRIES et al., 2010).

Geralmente em vacas leiteiras, simultaneamente com a lactação, há gestação, de tal forma que quando a secagem ocorre, a estimulação mamogênica e lactogênica da gestação se opõe à interrupção de ordenha e aos estímulos para involução mamária (CAPUCO; AKERS, 1999). Pois, as vacas leiteiras são secas no último trimestre de gestação, as cabras quando em

gestação, o período seco varia desde os primeiros dias até o final do primeiro trimestre de gestação (CAPUCO et al., 2003). Normalmente as ovelhas são prenhes quando o período de lactação já foi encerrado (CAPUCO; AKERS, 1999; CAPUCO et al., 2003).

Estudos já têm comprovado a importância do período seco para bovinos leiteiros, principalmente sobre a produção de leite subsequente (SMITH; WHEELLOCK; DODD, 1966; COPPOCK et al., 1974; BERNIER-DODIER et al., 2011). No entanto, quando se omite esse período em vacas leiteiras, há uma redução de até 20% da capacidade leiteira na próxima lactação (COPPOCK et al., 1974; KNIGHT; WILDE, 1988; SORENSEN E ENEVOLDSEN, 1991).

A ausência do período seco em cabras também possui efeito negativo sobre a produção de leite na lactação subsequente (CAJA; SALAMA; SUCH, 2006), mas em menor intensidade quando comparada às vacas leiteiras (SAFAYI et al., 2010). Pois, a duração do período seco longo (60 dias) ou curto (30 dias) não apresentaram diferenças significativas sobre a produção seguinte de cabras leiteiras (CAJA; SALAMA; SUCH, 2006).

Tem-se postulado que a relação entre produção de leite e o período seco parece estar relacionado com a quantidade de partos da fêmea (BERNIER-DODIER et al., 2011). Vacas primíparas que tiveram período seco curto produziram menor quantidade de leite na lactação seguinte quando comparadas a vacas múltiparas (ANNEN et al., 2004; BERNIER-DODIER et al., 2011). Além disso, normalmente os animais são secos produzindo quantidades consideráveis de leite e o método de secagem utilizado pode influenciar na regressão do tecido mamário, bem como na produção de leite futura.

1.1.5 Regressão do tecido mamário em ruminantes

A interrupção da ordenha gera acúmulo de leite na glândula mamária (WILDE et al., 1997), em razão da contínua síntese de leite pelas células epiteliais mamárias nas horas seguintes à secagem (CAPUCO; AKERS, 1999). Alguns autores afirmam que esse acúmulo de leite desencadeia a regressão do tecido mamário (CAPUCO et al., 2001).

É estabelecido em ratos, que o processo de regressão da glândula mamária pode ser dividido em dois estágios. No primeiro, a síntese de leite é reversível, quando a amamentação é interrompida por até 48 horas (LUND et al., 1996). No segundo, a redução da síntese de leite é irreversível quando a amamentação é interrompida por cerca de 72 horas, sendo esta caracterizada por acentuada apoptose e regressão da glândula mamária para um estado semelhante ao de uma rata virgem (LUND et al., 1996).

Contrariamente aos ratos, nos ruminantes a regressão da glândula mamária parece ser mais lenta e gradual no âmbito celular. Nas primeiras 6 horas após a interrupção de ordenha o tecido mamário mantém-se com grandes áreas alveolares e alvéolos com dimensões uniformes, as células epiteliais mamárias têm atividades secretórias ativas, morfologia cúbica, e estão ligadas ao epitélio mamário em torno do lúmen alveolar (SINGH et al., 2005). Nas horas seguintes, até 12 e 18 horas, a quantidade de leite depositado no lúmen alveolar aumenta (SINGH et al., 2005). A pressão intramamária provocada pelo acúmulo de leite no lúmen alveolar pode reduzir a síntese de leite entre 16 e 18 horas pós-interrupção de ordenha (DAVIS; FARR; STELWAGEN, 1999).

Entretanto, a capacidade em acumular leite diferencia-se entre bovinos leiteiros, os quais possuem capacidade cisternal máxima de armazenamento em 16 horas (DAVIS; FARR; STELWAGEN, 1999). Porém, bovinos leiteiros derivados de raças zebuínas (como, Gir e Girolando) apresentam cavidade cisternal e alveolar menor que raças europeias (como, Holandesa) (PORCIONATO et al., 2009). As cabras leiteiras, no entanto, o leite cisternal compreende até 90% da glândula mamária e, então, uma capacidade de armazenamento de até 24 horas (MARNET; KOMARA et al., 2008).

Ao término das primeiras 24 horas pós-interrupção da ordenha, alguns alvéolos mamários estão completamente ingurgitados de leite, apresentando pequenos vacúolos na porção apical das células epiteliais mamárias, porém ainda são insignificantes às características de regressão do tecido (HOLST; HURLEY; NELSON, 1987; HURLEY, 1989). No entanto, outros alvéolos mamários apresentam-se regredidos, com a superfície luminal rompida (SINGH et al., 2005), e uma diminuição na comunicação entre as células epiteliais mamárias e o epitélio mamário (STELWAGEN et al., 1997; SINGH et al., 2005). Essa desintegração celular parece relacionar-se com a insuficiência da atividade das proteínas de adesão celular, também chamadas de integrinas (como, $\beta 1$, $\alpha 6$ e $\alpha 5$), as quais estão localizadas na membrana celular e são significativamente diminuídas nessa fase (MCMAHON et al., 2004; SINGH et al., 2005). A diminuição na expressão das integrinas correlaciona-se com a distensão dos alvéolos mamários (SINGH et al., 2005).

Dentre os mecanismos ligados a comunicação das células, as junções *tight* possuem papel fundamental para a manutenção da diferença de potencial entre o epitélio mamário e as células epiteliais mamárias (Figura 3) (STELWAGEN; SINGN, 2014). Durante as primeiras horas do processo de secagem há um aumento na expressão dos genes relacionados as junções *tight*, como uma tentativa de fortalecer a adesão entre as células e conservar a integridade do tecido mamário, porém o processo de regressão se opõe e a expressão é reduzida (MARKOV

et al., 2012; STELWAGEN; SINGH, 2014). A partir de 36 horas as características de regressão são mais evidentes, pois observa-se uma heterogeneidade no tecido mamário, com áreas onde os alvéolos estão mais regredidos e outras ainda com características de lactantes (CAPUCO; AKERS, 1999; SINGH et al., 2005). Nessa fase, a abertura de espaços entre as células epiteliais mamárias permite a passagem de carboidratos e proteínas do leite para o sangue e vice-versa (Figura 3) (BEN CHEDLY et al., 2009).

Figura 3 - Alvéolo mamário com as células epiteliais mamárias e fatores que podem iniciar o processo de apoptose na secagem.

Fonte: adaptado de GREEN, K. A.; STREULI, C. H. **Apoptosis regulation in the mammary gland**. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 61, n. 15, p. 1867-1883, 2004. ISSN 1420-682X.

A distensão e, conseqüentemente a segregação das células epiteliais mamárias aumentam a troca de constituintes entre o lúmen alveolar e o sangue. Dentre esses, a lactose é sintetizada e secretada pelas células epiteliais mamárias até 96 horas após a interrupção da ordenha, assim sua concentração tende a diminuir no leite (BEN CHEDLY et al., 2009). Contudo, no plasma sanguíneo há um aumento da concentração de lactose (STELWAGEN et al., 1994; 1997; BEN CHEDLY et al., 2009; BOUTINAUD et al., 2017). Outra característica de regressão do tecido mamário é o aumento da concentração de Na^{2+} e declínio de K^{+} no leite, os quais são importantes marcadores da ruptura das junções *tight* e das células epiteliais mamárias (BOUTINAUD et al., 2017). Essa diferença de concentração correlaciona-se

concomitante com o aumento da lactose no plasma sanguíneo (STELWAGEN et al., 1997; BEM CHEDLY et al., 2009; OLLIER et al., 2014; BOUTINAUD et al., 2017).

Por fim, cerca de 72 a 192 horas de interrupção de ordenha o tecido mamário é marcado por conter alvéolos rompidos, quantidades maiores de vacúolos nas células e áreas extensas de tecido estromal entre os alvéolos mamários (SINGH et al., 2005). Além disso, observa-se uma migração de células imunes no tecido mamário (SINH et al., 2005; 2016), a qual é caracterizada pelo aumento na contagem de células somáticas nas secreções mamárias (OLLIER et al., 2014; BOUTINAUD et al., 2016).

1.1.6 Regressão do tecido mamário: apoptose das células epiteliais mamárias

No período de secagem o acúmulo de fatores apoptóticos presentes no lúmen alveolar desencadeiam o processo de regressão do tecido mamário através da apoptose das células epiteliais mamárias (Figura 3). Desse modo, a apoptose pode ocorrer por duas vias, determinadas como extrínseca e intrínseca: a via extrínseca caracteriza-se por ser ativada por receptores de morte localizados na membrana celular e seus ligantes extracelulares, sinalizada por um processo infeccioso (OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011). A via intrínseca, ou também via mitocondrial é sinalizada por fatores de estresse intracelulares, não sendo acionada por processo infeccioso (PORTT et al., 2011).

A involução da glândula mamária é caracterizada por ser um processo fisiologicamente natural, que ocorre após um período lactacional. Assim, as proteínas intracelulares e pró-apoptóticas da via intrínseca são sinalizadas durante o final da lactação e secagem, especialmente aquelas relacionadas à família Bcl-2 (FLINT et al., 2005; OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011). Dentre essas, a proteína Bax (pró-apoptótica) tem sido estudada por possuir um papel fundamental na involução do tecido mamário (COLITTI; STEFANON; WILDE, 1999; SINGH et al., 2005; STEIN; SALOMONIS; GUSTERSON, 2007). A Bax atua na mitocôndria, formando poros na membrana mitocondrial que induzem a liberação do citocromo C, o qual conduzirá a sinalização e ativação da cascata de caspases para promover a apoptose (FLINT et al., 2005; PORTT et al., 2011). Porém, a membrana mitocondrial também possui proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2, a qual pode inibir a ação da Bax (PORTT et al., 2011), mantendo um equilíbrio entre ambas proteínas.

Estudos tem demonstrado que ao final da lactação a expressão da Bax aumenta gradativamente até o período seco (WARESKY et al., 2001). Durante as primeiras horas de secagem seus níveis são significativamente maiores e chegam ao máximo em 192 horas

(SINGH et al., 2005; BEN CHEDLY et al., 2009; BOUTINAUD et al., 2017). Enquanto que os níveis de Bcl-2 parecem não ser alterados até 36 horas (BEN CHEDLY et al., 2009). Contudo, outras proteínas anti-apoptóticas (como, Bcl-x_{long} e Bag-1) são pouco expressas ao longo das primeiras 192 horas (SINGH et al., 2005).

Além disso, outras proteínas também estão envolvidas no processo da apoptose das células epiteliais mamárias, tais como a STAT5 e STAT3 (CLARKSON et al., 2006). Essas proteínas têm como função principal a proliferação das células epiteliais mamárias durante o ciclo lactacional, no entanto, quando a secagem ocorre, o comportamento dessas é alterado. A proteína STAT5 é caracterizada por emitir sinais de sobrevivência, enquanto que a STAT3 possui sinais pró-apoptóticos (SINGH et al., 2016; 2017). Desse modo, durante o início do processo de regressão do tecido mamário os níveis de expressão da proteína STAT5 tendem a diminuir e, ao contrário, a STAT3 aumentar (SINGH et al., 2016). Por outro lado, o declínio na expressão de proteínas do leite (como, α _{S1}-caseína e α -lactalbumina) tem sido associado com a diminuição da proteína STAT5 no tecido mamário bovino (SINGH et al., 2017). Portanto, maiores taxas de apoptose das células epiteliais mamárias e, consequentemente maior característica de involução do tecido mamário foram observados quando houve altos níveis de expressão gênica para STAT3 e baixa expressão de proteínas do leite (SINGH et al., 2017).

1.1.7 Regressão do tecido mamário: alterações na síntese de proteínas do leite

A sinalização para a síntese de proteínas do leite durante o ciclo lactacional depende de um complexo hormonal envolvendo a prolactina, glicocorticoides, insulina, GH, IGF-1 e fatores lactogênicos (GOODMAN et al., 1983; FLINT; KNIGHT, 1997; ACCORSI et al., 2002). Desse modo, as principais proteínas do leite de ruminantes são a β -caseína, α _{S1}-caseína, α _{S2}-caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina (LALBA) (MARTIN et al., 2002; SIGL; MEYER; WIEDEMANN, 2010; SHI et al., 2015).

Durante o início da regressão do tecido mamário as alterações morfológicas e as mudanças a nível molecular incluem os sinais de sobrevivência e o declínio na síntese de proteínas do leite pelas células epiteliais mamárias (WILDE et al., 1997; SINGH et al., 2008; 2017). Portanto, desde o momento da interrupção da ordenha até 18 horas após, os níveis de expressão das proteínas do leite tendem a aumentar devido à contínua atividade das células epiteliais mamárias (SINGH et al., 2017). No entanto, após 24 horas, há uma redução na expressão da LALBA, β -lactoglobulina e α _{S1}-caseína (WILDE et al., 1997; SINGH et al., 2008;

2017), enquanto que as proteínas κ - e β - caseína são menos expressas após 36 horas (SINGH et al., 2008).

Dentre as proteínas do leite, a LALBA é uma proteína chave da lactação, pois está intimamente ligada à produção de leite, participando da via de síntese da lactose através do complexo enzimático β -1,4-galactosiltransferase, o qual catalisa a formação da lactose a partir de uma molécula de glicose e galactose (LIN et al., 2016). Além disso, através do seu papel osmótico, a lactose auxilia na regulação do volume de leite e a atividade secretória das células epiteliais mamárias (SHI et al., 2015; RILEY et al., 2008a). Durante a lactação a LALBA está relacionada com a integridade do lúmen alveolar, podendo assim iniciar o processo de involução do tecido mamário (RILEY et al., 2008a; SINGH et al., 2017).

Recentemente, as variações estruturais dos alvéolos mamários foram correlacionadas com o nível de expressão da proteína LALBA (SINGH et al., 2017). Cerca de 36 horas de interrupção de ordenha, as vacas que apresentaram baixa expressão de LALBA tiveram morfologia de involução (SINGH et al., 2017). Enquanto que, em 72 horas após a interrupção de ordenha, o tecido mamário daquelas que apresentaram maior expressão de LALBA possuíram uma morfologia homogênea, caracterizada por conter grandes áreas uniformes, alvéolos íntegros, células epiteliais mamárias cuboidais e pouca presença de tecido estromal (SINGH et al., 2017). No entanto, as características relacionadas com a baixa presença de LALBA no tecido mamário parecem serem mais acentuadas em 72 horas, onde um fenótipo de não lactante é visualizado (alvéolos rompidos, grandes quantidades de vesículas dentro das células epiteliais mamárias e no lúmen alveolar, extensas áreas de tecido estromal entre os alvéolos e a infiltração de leucócitos dentro do lúmen alveolar) (SINGH et al., 2017). Todavia, as características de regressão dos alvéolos mamários são consistentes com a diminuição de outras proteínas, como a β -caseína, κ -caseína, α_{S1} -caseína e β -lactoglobulina (SINGH et al., 2008; 2017).

Além disso, quando os alvéolos mamários estão em processo de regressão, esses, apresentam menor expressão de proteínas e nenhum acúmulo de leite no lúmen alveolar, enquanto que aqueles que possuem maiores marcações moleculares para proteínas e maior acúmulo de leite mantém características de lactante (SINGH et al., 2017). Estudos têm demonstrado um perfil heterogêneo na expressão das proteínas do leite durante o período de secagem de ruminantes, essas diferenças podem ocorrer entre os animais e, mesmo, dentro do próprio animal (WILDE et al., 1997, SINGH et al., 2017).

Portanto, individualmente, cada animal possui um perfil para a atividade de sobrevivência e apoptose das células epiteliais mamárias (SINGH et al., 2016; 2017). Durante

o início do processo de secagem, as células epiteliais mamárias diminuem sua capacidade de sintetizar as proteínas do leite e aumentam a síntese de proteínas relacionadas com as respostas protetivas e imunomoduladoras (SINGH et al., 2008). Como o aumento significativo na expressão da proteína lactoferrina no tecido mamário, discutido no item 1.1.10 (SINGH et al., 2008; 2017).

1.1.8 Receptor de IGF-1 (IGF-IR) e a via de síntese de proteínas do leite

Durante o percurso da lactação as células epiteliais mamárias mantêm as atividades de sintetizar e secretar grandes quantidade de carboidratos, proteínas e lipídios, sendo regulados pela interação entre os hormônios prolactina, insulina, cortisol e IGF-1 (BOLANDER et al., 1981; PROSSER et al., 1990; ACCORSI et al., 2002; PAULOIN; CHANAT, 2012).

Na glândula mamária a síntese de proteínas e a produção de leite pelas células epiteliais mamárias podem ser estimuladas através do IGF-1R (PROSSER et al., 1990; COHICK, 1998; SAKAMOTO et al., 2007; MURNEY et al., 2015; SINGH et al., 2015). Quando sinalizado, o IGF-1R ativa diversas vias metabólicas, dentre essas, a síntese de proteínas do leite (KULIK et al., 1997; PERUZZI et al., 1999; ACCORSI et al., 2002; MARSHMAN; STREULI, 2002; MURNEY et al., 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que há um aumento significativo na expressão de IGF-1R sobre diversos tipos de células cancerígenas (DENDULURI et al., 2015), o qual desencadeia uma cascata de eventos que iniciam através da sinalização do substrato receptor de insulina (IRS-1) e, conseqüentemente a fosforilação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ proteína quinase B (Akt)/ proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Figura 4) (PERUZZI et al., 1999; DENDULURI et al., 2015; MURNEY et al., 2015; LI et al., 2017).

Figura 4 – Via de regulação do eixo IGF-1/IGF-1R e metabolismo celular.

Fonte: adaptado de DENDULURI et al. **Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance**. Genes Dis. v.2 n.1. p.13–25, 2015.

Dentro da fisiologia da lactação a via IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR tem sido relacionada com a frequência de ordenha em vacas, a qual pode estimular a proliferação das células epiteliais mamárias no início da lactação (MURNEY et al., 2015). Porém, raros estudos têm abordado a ação desses marcadores moleculares sobre o processo de involução da glândula mamária.

Dentre as proteínas sinalizadas, a PI3K desempenha diversas funções intracelulares, as quais são mediadas pelos seus receptores, incluindo: crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade, metabolismo e inibição da apoptose celular (WYMAN; ZVELEBIL; LAFFARGUE, 2003). Assim, quando estimulada (por fatores de crescimento, IGF-1 e IGF-1R), a PI3K desloca-se do citosol para a membrana celular (PAULOIN; CHANAT, 2012; HASSAN et al., 2013), ocorrendo a ativação dos receptores tirosina quinase, os quais facilitam o seu recrutamento para a membrana celular (BAXTER; NEOH; TEVENDALE, 2007). A partir disso, a PI3K age desencadeando uma cascata de eventos, que resulta na fosforilação do seu principal alvo, a Akt, aumentando o metabolismo da glicose e síntese de proteínas do leite (Figura 4) (SAKAMOTO et al., 2007; PAULOIN; CHANAT, 2012).

A Akt é caracterizada por possuir três isoformas Akt 1-3 que são codificadas por genes independentes, porém possuem características de ações similares, no entanto, dentre elas a Akt1 tem sido largamente estudada no tecido mamário (BOXER et al., 2006; ZHANG et al., 2018). Assim, a sinalização da Akt1 ocorre de maneira dependente da PI3K (induzida por fatores de crescimento), onde a subunidade catalítica (PIP3) da PI3K fosforila a Akt1 (Figura 4) (SCHERTFEGER; RICHERT; ANDERSON, 2001; LIN et al., 2016).

Nas células epiteliais mamárias, a Akt1 auxilia na regulação da síntese de leite e de proteínas do leite (SAKAMOTO et al., 2007; LI et al., 2017). Seu mecanismo de ação está em estimular o transporte de glicose através da proteína transportadora de glicose 1 (GLUT1) e, consequentemente aumentar a captação de glicose pelas células epiteliais mamárias (BOXER et al., 2006; LIN et al., 2016). Desse modo, quando a glicose é transportada para o meio intracelular na célula epitelial mamária, essa é convertida em ATP ou lactose (LIN et al., 2016). Recente estudo *in vitro* a partir de células epiteliais mamárias bovinas, demonstrou que o silenciamento do gene Akt causou uma diminuição drástica na expressão das proteínas ligadas à síntese de lactose (LIN et al., 2016). Ainda, a Akt1 participa da síntese de lipídios nas células epiteliais mamárias aumentando a suplementação de carbono para a síntese *de novo*, assim, a ausência da Akt1 pode causar a desregulação na β -oxidação, através do bloqueio do catabolismo dos ácidos graxos (BOXER et al., 2006; ZHANG et al., 2018).

Além disso, a Akt1 ativa a enzima mTOR (Figura 4), uma serina/treonina quinase pertencente à família da PI3K que também está diretamente envolvida na síntese proteica nas células epiteliais mamárias, em resposta à fatores nutricionais e endócrinos (BURGOS; DAI; CANT et al., 2010; LI et al., 2017). A mTOR possui dois complexos proteicos denominados mTOR 1 e 2, ou também mTORC1 e mTORC2 (ZHANG et al., 2018). Desse modo, a Akt1 pode sinalizar a mTORC1 por via de dois mecanismos: diretamente pela fosforilação da mTORC1 em Ser²⁴⁴⁸ ou indiretamente através da fosforilação do complexo TSC2 (complexo tuberina), ambos regulam a atividade da mTOR (HASSAN et al., 2013).

Portanto, a mTOR fosforilada e ativada irá regular a síntese de proteínas do leite (Figura 4) (ZHANG et al., 2018). Estudos recentes têm demonstrado que o silenciamento da mTOR causou diminuição na expressão de transportador específico de aminoácidos (LAT1) e de β -caseína (LIN et al., 2018). Além disso, o baixo suprimento de nutrientes nas células epiteliais mamárias pode ocasionar a não sinalização de mTOR, comprometendo a síntese de proteínas do leite (ZHANG et al., 2018), bem como diminuindo a viabilidade celular (APPUHAMY et al., 2014).

Em estudo, vacas leiteiras que foram submetidas a secagem abrupta no pico de lactação apresentaram um aumento significativo na expressão de IGF-1. Assim, a proteína Akt permaneceu estável em até 192 horas após a interrupção de ordenha, como um fator de resistência das células epiteliais mamárias aos fatores apoptóticos (SINGH et al., 2016). No entanto, houve diminuição na expressão das proteínas β -caseína, α_{S1} -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina (SINGH et al., 2008) e aumento daquelas relacionadas a fatores imunológicos, como a lactoferrina (SINGH et al., 2017). Resultados *in vitro* para os genes relacionados a via PI3K/Akt/mTOR, demonstraram que esses são mais expressos durante o pico de lactação em relação ao período seco (LI et al., 2017). Porém, ainda é desconhecida a regulação desses genes durante o período de regressão do tecido mamário.

1.1.9 Mecanismos de defesa da glândula mamária no período de secagem

No decorrer da lactação, os animais são expostos a patógenos que podem provocar infecções intramamárias (ALBENZIO et al., 2016). Situações relacionadas ao manejo de ordenha, frequência de ordenhas e o manejo de secagem são fatores críticos para o desenvolvimento de infecções intramamárias (SMOLENSKI et al., 2015).

A principal via de entrada de microrganismos na glândula mamária é o canal do teto, anatomicamente, o teto possui um lúmen interno composto de camadas queratinizadas que formam uma barreira física contra os microrganismos, além de conter uma cisterna longitudinal, ao longo do teto, em forma de anéis (Figura 5) (GRUET et al., 2001). Desse modo, a camada de queratina, ou também tampão de queratina, circula todo o canal do teto e possui atividade antimicrobiana. Assim, é essencialmente formada de ácidos graxos e proteínas de queratina, agindo como um bloqueador entre meio interno e externo (SMOLENSKI et al., 2015).

Figura 5 - Anatomia do teto de uma cabra, com destaque aos mecanismos de ação contra agentes patógenos.

Fonte: adaptado de TYAGI, R. P. S e SINGH, J. (1995). **Ruminant surgery**. CBS Pub.

Durante o manejo da secagem, especificamente na última ordenha, são utilizados antibióticos específicos que auxiliam na proteção da glândula mamária, esses podem ser administrados na forma de injetáveis ou por infusão intramamária (GRUET et al., 2001). Porém, o leite que se acumula no úbere durante as horas seguintes à interrupção de ordenha, torna-se um meio rico em nutrientes para o desenvolvimento de microrganismos, podendo facilitar o aparecimento de infecções, como a mastite (SMOLENSKI et al., 2015).

Os principais patógenos responsáveis pelas mastites são divididos em contagiosos e ambientais. O primeiro grupo tem como destaque os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*; enquanto o segundo grupo, as Enterobacteriaceae (como *Escherichia coli*), *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (ZHAO; LACASSE, 2005).

Em consequência da presença de microrganismos nas glândulas mamárias e do processo infeccioso, há um aumento da CCS no leite, devido à ação direta das células imunes na glândula (ALBENZIO et al., 2016). Dessa forma, o sistema imunológico é desafiado para controlar os patógenos e o mecanismo de ação inclui fatores imunológicos e celulares que agem em conjunto para eliminar o processo infeccioso (ALBENZIO et al., 2016). Tais fatores imunológicos e celulares estão relacionados com a infiltração de leucócitos a partir do sangue para a glândula mamária, que ocorrem em resposta às citocinas pro-inflamatórias e tem como função aumentar a atividade fagocitária sobre os patógenos (ALBENZIO et al., 2016). Portanto, o processo

inflamatório resulta em maior fluxo sanguíneo na glândula mamária e infiltração de macrófagos e linfócitos nos alvéolos (GRUET et al., 2001), muitas vezes aumentando a temperatura local (BORTOLAMI et al., 2015).

Durante o ciclo lactacional há mudanças na proporção de células imunes agindo na glândula mamária, assim um aumento expressivo é visualizado ao final da lactação, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (LEITNER et al., 2012). No entanto, durante a involução mamária os macrófagos são as células mais numerosas sobre as células epiteliais apoptóticas (LEITNER et al., 2012). Portanto, o período seco é um dos estágios do ciclo de lactação mais vulnerável para as infecções intramamárias, podendo ocorrer devido ao estresse que o animal sofre nessa fase, ocasionado pela restrição alimentar e desconforto pelo acúmulo de leite no úbere nos primeiros dias da secagem (OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014).

Atualmente os testes para monitoramento de mastites, especialmente as subclínicas, utilizam a técnica de CCS e cultivos bacterianos. Assim, concentrações mais elevadas de CCS são indicadores de infecções intramamárias clínicas e subclínicas (BERGONIER et al., 2003). Outra forma para identificar mastites, que tem mostrado resultados satisfatórios, é a utilização da imagem de termografia por infravermelho da glândula mamária (MARTINS et al., 2013; ALEJANDRO et al., 2014; METZENER et al., 2014). Essa técnica se destaca por não ser invasiva e mensurar as alterações de temperatura corporal com boa acurácia (METZNER et al., 2014; MCMANUS et al., 2016).

Estudos têm demonstrado correlação entre a CCS de ovelhas, cabras e vacas leiteiras com mastite subclínica e temperaturas elevadas do úbere por meio da termografia (MARTINS et al., 2013; ALEJANDRO et al., 2014; METZENER et al., 2014). Entretanto, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com a mensuração de temperatura da glândula mamária por termografia em cabras leiteiras (ALEJANDRO et al., 2014), além disso não encontramos na literatura trabalhos que correlacionam a variação de temperatura por termografia e processo de secagem.

1.1.10 Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína presente no colostro, leite e secreções mamárias durante o período seco, a qual tem como principal função capturar o ferro (MOLENAAR et al., 1996), reduzindo sua disponibilidade para o metabolismo dos microrganismos, dessa forma auxiliando na defesa da glândula mamária (CHEN et al., 2004). Assim, níveis mais elevados de lactoferrina são encontrados durante um processo de inflamação e durante o período de secagem (CHEN et al., 2004; HISS; MEYER; SAUERWEIN, 2008). Sua concentração pode variar de 1

a 2 mg/mL nas secreções mamárias pré-parto, 0,1 mg/mL no leite e chegando em 20 a 50 mg/mL durante o período de regressão da glândula mamária (dados referentes a bovinos) (MOLENAAR et al., 1996; BAUMRUCKER; ERONDU, 2000).

No entanto, a regulação da lactoferrina no tecido mamário difere de outras proteínas do leite (SCHANBACHER; GOODMAN; TALHOUK, 1993; SINGH et al., 2008). Primeiro, a síntese de lactoferrina parece ser independente de hormônios lactogênicos como a prolactina, cortisol e insulina (RILEY et al., 2008b). E segundo, há uma relação inversa entre a expressão de lactoferrina e caseínas; quando a lactoferrina aumenta, a expressão de caseínas diminuiu (SCHANBACHER; GOODMAN; TALHOUK, 1993; SINGH et al., 2008; 2017).

Com isso, estudos *in vitro* têm demonstrado que a lactoferrina tem influência sobre a expressão das caseínas e a viabilidade celular (RILEY et al., 2008b). Através da adição exógena de lactoferrina, em cultura de células epiteliais mamárias bovina, houve uma redução em até 80% da expressão de β - e κ -caseína e da proliferação celular. O mecanismo pelo qual a síntese de lactoferrina é regulada nas células epiteliais mamárias ainda é desconhecido, porém, estudos prévios tem sugerido que as mudanças ocorridas na estrutura do citoesqueleto da célula podem influenciar a sua expressão (SCHANBACHER; GOODMAN; TALHOUK, 1993; CLOSE et al., 1997).

Além disso, postula-se que há uma relação entre CCS e as concentrações de lactoferrina no leite (HISS; MEYER; SAUERWEIN, 2008). Assim, o aumento na CCS no final da lactação coincidem com o aumento da concentração de lactoferrina em vacas (MOLENAAR et al., 1996), cabras (HISS; MEYER; SAUERWEIN, 2008) e búfalas (GIACINTI et al., 2013).

Quando a secagem é realizada, a concentração de lactoferrina no leite é gradativamente elevada em 15 dias (BOUTINAUD et al., 2017), assim como a sua expressão gênica (BIET et al., 2016). Algumas alterações moleculares são visualizadas quando a expressão de lactoferrina é aumentada no tecido mamário, tais como, os alvéolos mamários apresentam um fenótipo de não lactante e a lactoferrina é expressa nos alvéolos que não possuem expressão de α -lactalbumina e α_{S1} -caseína (MOLENAAR; DAVIS; WILKINS, 1992; WILDE et al., 1997; SINGH et al., 2017).

1.1.11 Estresse e produção de espécies reativas de oxigênio

A apoptose celular pode ser induzida por estímulos intra e extracelular durante os processos fisiológicos normais ou patofisiológicos (PORTT et al., 2011). Dentre esses, incluem diferentes formas de estresses físico-químicos por exemplo: temperatura (GARRIDO et al.,

2001), alimentação (OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014; TAO et al., 2014), oxidação (SU et al., 2002), fatores de crescimento (SINGH et al., 2005), ativação do sistema imunológico (SU et al., 2002), bem como, agentes danificadores do DNA e compostos formando radicais livres (POUROVA et al., 2010; PORTT et al., 2011).

Assim, na mitocôndria, os estímulos podem influenciar a produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species* - ROS) e esses, podem ter distintas respostas nas células (PORTT et al., 2011). Portanto, o termo ROS refere-se a um número de diferentes moléculas, incluindo: ânions superperóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais livres de hidroxila (OH), óxido nítrico (NO), bem como novas espécies de ROS (NO e O_2^-) podem ser formadas (ONNO $^-$) (POUROVA et al., 2010).

Dentre os fatores relacionados à apoptose das células epiteliais mamárias, acredita-se que o estresse pode aumentar a oxidação celular, aumentando a produção de ROS e assim, alterando a taxa de apoptose (SU et al., 2002). O aumento da liberação de glicocorticoides pode acelerar a taxa metabólica causando desequilíbrio entre as taxas de redução e oxidação celular (BJELAKOVIĆ et al., 2010). Porém, o mecanismo pelo qual a apoptose é induzida pelos glicocorticoides nas células epiteliais mamárias ainda é desconhecido, contudo, sabe-se que em outros tipos celulares há maior produção de ROS pelo complexo III no ciclo da ubiquinona, e promovendo a diversas formas de estresses oxidativo (que são ocasionados pelo bloqueio das funções das enzimas antioxidantes) (SU et al., 2002; BJELAKOVIĆ et al., 2010).

Durante o período de involução mamária há uma massiva infiltração de células imunes da corrente sanguínea para a glândula mamária. Dentre essas, os neutrófilos são recrutados em maior proporção e migram para o tecido mamário em resposta às citocinas (SU et al., 2002). Durante o processo de fagocitose, o oxigênio local é consumido, resultando na formação de ânions superperóxidos e outras ROS (SU et al., 2002). Portanto, a influência das ROS sobre os processos fisiológicos parece estar relacionada com a habilidade em modificar a atividade das proteínas pró-apoptóticas na mitocôndria, ou seja, o estresse pode promover uma falha nos mecanismos de defesa dos antioxidantes (PORTT et al., 2011).

1.1.12 Estresse e fisiologia da glândula mamária

Diversos fatores podem induzir ao estresse nos animais, como: clima (GUVED et al., 2005), instalações (FRIEND; DELLMEIER; GBUR, 1985; OLMOS et al., 2009), alimentação (MARSICO et al., 2009; OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014), transporte (CANAES et al., 2009), ordenha (NEGRÃO et al., 2004), desmame (NEGRÃO et al., 2008) e

Fonte: adaptado de Engelking, L. **Fisiologia endócrina e metabólica em medicina veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2010. 152 páginas.

Na glândula mamária, o cortisol é fundamental para o desenvolvimento lobuloalveolar durante a gestação (MEHTA et al., 1980). Durante a lactação, os glicocorticoides são requeridos para formar e manter as funções das junções *tight*, conservando a integridade do alvéolo mamário (STELWAGEN et al., 1998). Além disso, o cortisol trabalha de modo sinérgico com outros hormônios da lactação (como, insulina e prolactina), participando principalmente da síntese de proteínas e lipídios do leite (SKARDA et al., 1982; PAULOIN; CHANAT, 2012).

No entanto, as altas concentrações de glicocorticoides plasmático podem ser prejudiciais para o desenvolvimento e atividades da glândula mamária, respondendo principalmente à diminuição na produção de leite em vacas (SHAMAY et al., 2000; OLLIER et al., 2016; PONCHON et al., 2017) e ovelhas (CAROPRESE et al., 2009). Essa queda na produção de leite parece estar associada com a diminuição na síntese de lactose pelas células epiteliais mamárias, a qual foi relacionada também com a redução na concentração de prolactina no leite (PONCHON et al., 2017). Tal como, a concentração plasmática de IGF-1 também parece diminuir após a aplicação de glicocorticoides (PONCHON et al., 2017), assim, reduzindo a síntese de leite e a sobrevivência celular.

Entretanto, em cabras leiteiras o cortisol parece agir de modo diferente do que observado em vacas e ovelhas. A indução de estresse agudo via administração de ACTH não alteram os níveis plasmáticos de IGF-1 e, também não diminuí a produção de leite (BOMFIM et al., 2018). Além disso, o cultivo (*in vitro*) das células epiteliais mamárias de cabras leiteiras submetidas a suplementação crescente de cortisol (até 1000 µg/mL) parece não alterar as taxas entre sobrevivência e apoptose celular, inclusive, o acréscimo de cortisol aumentou significativamente a expressão de GHR e IGF-1R, sobrepondo os sinais apoptóticos desencadeados pelo cortisol (BOMFIM et al., 2018). Ao contrário, quando as células epiteliais mamárias foram cultivadas durante o final da lactação, o cortisol diminuiu significativamente a expressão de IGF-1R e aumentou a expressão de BAX, mas não alterou as taxas de proliferação e apoptose das células (BOMFIM, 2016).

O cortisol parece não apresentar efeitos negativos sobre a glândula mamária de cabras leiteiras durante a lactação, mas, pode modular a ação de genes relacionados com a proliferação e apoptose das células epiteliais mamárias (BOMFIM et al., 2018). Com isso, postulamos que o estresse agudo via aplicação exógena de ACTH durante o período de secagem de cabras Saanen, com lactação estendida, reduzirá a expressão gênica de IGF-1R, comprometendo a sinalização da via PI3K/Akt/mTOR e consequentemente aumentando a apoptose das células epiteliais mamárias, acelerando assim o processo de regressão do tecido mamário.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI, P. A. et al. **Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow.** Journal of Dairy Science, v. 85, n. 3, p. 507-513, 2002.
- AKERS, R. M.; CAPUCO, A. V.; KEYS, J. E. **Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers.** Livestock Science, v. 105, n. 1-3, p. 44-49, 2006.
- ALBENZIO, M. et al. **Effect of stage of lactation on the immune competence of goat mammary gland.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 5, p. 3889-3895, 2016.
- ALEJANDRO, M. et al. **Infrared thermography as a tool to determine teat tissue changes caused by machine milking in Murciano-Granadina goats.** Livestock Science, v. 160, p. 178-185, 2014.
- ANNEN, E. L. et al. **Effect of modified dry period lengths and bovine somatotropin on yield and composition of milk from dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 87, n. 11, p. 3746-3761, 2004.
- APPUHAMY, J. et al. **Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells.** Journal of dairy science, v. 97, n. 1, p. 419-429, 2014.
- BAUMRUCKER, C. R.; ERONDU, N. E. **Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2000.
- BAXTER, F. O.; NEOH, K.; TEVENDALE, M. C. **The beginning of the end: death signaling in early involution.** Journal of mammary gland biology and neoplasia, v. 12, n. 1, p. 3-13, 2007.
- BJELAKOVIĆ, G. et al. **Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis.** Amino acids, v. 39, n. 1, p. 29-43, 2010.
- BEN CHEDLY, H. et al. **Cell junction disruption after 36 h milk accumulation was associated with changes in mammary secretory tissue activity and dynamics in lactating dairy goats.** Journal of Physiology and Pharmacology, v. 60, p. 105-111, 2009.
- BERGONIER, D. et al. **Mastitis of dairy small ruminants.** Veterinary Research, v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.
- BERNIER-DODIER, P. et al. **Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 94, n. 10, p. 4922-4936, 2011.
- BIET, J. et al. **Primary cilia distribution and orientation during involution of the bovine mammary gland.** Journal of dairy science, v. 99, n. 5, p. 3966-3978, 2016.

BOLANDER, F. F. et al. **Insulin is essential for accumulation of casein mRNA in mouse mammary epithelial cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 78, n. 9, p. 5682-5684, 1981.

BOMFIM, G. F. **Produção de leite em cabras Sannen: relações entre estresse, IGF-1 e apoptose.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal/São Paulo. 78 p. 2016.

BOMFIM, G. F. et al. **Effect of acute stressors, adrenocorticotrophic hormone administration, and cortisol release on milk yield, the expression of key genes, proliferation, and apoptosis in goat mammary epithelial cells.** Journal of dairy science, v. 101, n. 7, p. 6486-6496, 2018.

BORTOLAMI, A. et al. **Evaluation of the udder health status in subclinical mastitis affected dairy cows through bacteriological culture, somatic cell count and thermographic imaging.** Polish Journal of Veterinary Sciences, v. 18, n. 4, p. 799-805, 2015.

BOUTINAUD, M. **A quantitative RT-PCR study of the mRNA expression profile of the IGF axis during mammary gland development.** Journal of Molecular Endocrinology, v. 33, n. 1, p. 195-207, 2004.

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

BOUTINAUD, M. et al. **Cabergoline inhibits prolactin secretion and accelerates involution in dairy cows after dry-off.** Journal of dairy science, v. 99, n. 7, p. 5707-5718, 2016.

BOUTINAUD, M. et al. **Inhibiting prolactin by cabergoline accelerates mammary gland remodeling during the early dry period in dairy cows.** Journal of dairy science, v. 100, n. 12, p. 9787-9798, 2017.

BOXER, R. B. et al. **Isoform-specific requirement for Akt1 in the developmental regulation of cellular metabolism during lactation.** Cell Metabolism, v. 4, n. 6, p. 475-490, 2006.

BRITO, L. F. et al. **Modelling lactation curves of dairy goats by fitting random regression models using Legendre polynomials or B-splines.** Canadian Journal of Animal Science, v. 98, n. 0, p. 73-83, 2017.

BRUCKMAIER, R. M. et al. **Machine milking of dairy goats during lactation - udder anatomy, milking characteristics, and blood-concentrations of oxytocin and prolactin.** Journal of Dairy Research, v. 61, n. 4, p. 457-466, 1994.

BURGOS, S. A.; CANT, J. P. **IGF-1 stimulates protein synthesis by enhanced signaling through mTORC1 in bovine mammary epithelial cells.** Domestic Animal Endocrinology, v. 38, n. 4, p. 211-221, 2010.

BURGOS, S. A.; DAI, M.; CANT, J. P. **Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 1, p. 153-161, 2010.

CAJA, G.; SALAMA, A. A. K.; SUCH, X. **Omitting the dry-off period negatively affects colostrum and milk yield in dairy goats.** Journal of Dairy Science, v. 89, n. 11, p. 4220-4228, 2006.

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

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. **Mammary involution in dairy animals.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 4, n. 2, p. 137-144, 1999.

CAPUCO, A. V. et al. **Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST.** Journal of Dairy Science, v. 84, n. 10, p. 2177-2187, 2001.

CAPUCO, A. V. et al. **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. 143-154, 2002.

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

CAROPRESE, M. et al. **Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes.** Journal of dairy research, v. 76, n. 1, p. 66-73, 2009.

CHEN, P. W.; CHEN, W. C; MAO, F. C. **Increase of lactoferrin concentration in mastitic goat milk.** Journal of Veterinary Medical Science, v. 66, n. 4, p. 345-350, 2004.

CLARKSON, R. W. et al. **The genes induced by signal transducer and activators of transcription (STAT) 3 and STAT5 in mammary epithelial cells define the roles of these STATs in mammary development.** Molecular Endocrinology, v. 20, n. 3, p. 675-685, 2006.

CLOSE, M. J. et al. **Lactoferrin expression in mammary epithelial cells is mediated by changes in cell shape and actin cytoskeleton.** Journal of cell science, v. 110, n. 22, p. 2861-2871, 1997.

COHICK, W. S. **Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation.** Journal of Dairy Science, v. 81, n. 6, p. 1769-1777, 1998.

COLITTI, M.; STEFANON, B.; WILDE, C. J. **Apoptotic Cell Death, bax and bcl-2 Expression During Sheep Mammary Gland Involution.** Anatomia, histologia, embryologia, v. 28, n. 4, p. 257-264, 1999.

COLLIER, R. J.; ANNEN-DAWSON, E. L.; PEZESHKI, A. **Effects of continuous lactation and short dry periods on mammary function and animal health.** *Animal*, v. 6, n. 3, p. 403-414, 2012.

COPPOCK, C. E. et al. **Effect of dry period length on holstein milk-production and selected disorders at parturition.** *Journal of Dairy Science*, v. 57, n. 6, p. 712-718, 1974.

DAVIS, S. R.; FARR, V. C.; STELWAGEN, K. **Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review.** *Livestock production science*, v. 59, n. 1, p. 77-94, 1999.

DENDULURI, Sahitya K. et al. **Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance.** *Genes & diseases*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2015.

DESSAUGE, F. et al. **Effects of ovariectomy in prepubertal goats.** *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 60, p. 127-133, 2009.

DJONOV, V.; ANDRES, A. C.; ZIEMIECKI, A. **Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland.** *Microscopy research and technique*, v. 52, n. 2, p. 182-189, 2001.

ENGELKING, L. **Fisiologia endócrina e metabólica em Medicina Veterinária.** 2 ed. São Paulo: Roca, 2010. 152 páginas

FLINT, D. J.; KNIGHT, C. H. **Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 2, n. 1, p. 41-48, 1997.

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

FRIEND, T.H.; DELLMEIER, G.R.; GBUR, E.E. **Comparison of four methods of calf confinement.** I. Physiology. *Journal Animal Science*, v. 60, n. 1, p. 095 –101, 1985

GARRIDO, C. et al. **Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death.** *Biochemical and biophysical research communications*, v. 286, n. 3, p. 433, 2001.

GIACINTI, G. et al. **Lactoferrin concentration in buffalo milk.** *Italian Journal of Animal Science*, v. 12, n. 1, p. 5, 2013.

GOODMAN, G. T. et al. **Hormonal regulation of α -lactalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured in vitro.** *Endocrinology*, v. 112, n. 4, p. 1324-1330, 1983.

GOTT, P. N. et al. **Effect of gradual or abrupt cessation of milking at dry off on milk yield and somatic cell score in the subsequent lactation.** *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 3, p. 2080-2089, 2017.

GREEN, K. A.; STREULI, C. H. **Apoptosis regulation in the mammary gland.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 61, n. 15, p. 1867-1883, 2004.

GRUET, P. et al. **Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.

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

HADSELL, D. L.; BONNETTE, S. G. **IGF and insulin action in the mammary gland: Lessons from transgenic and knockout models.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 5, n. 1, p. 19-30, 2000.

HASSAN, B. et al. **Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway.** Surgical Oncology Clinics, v. 22, n. 4, p. 641-664, 2013.

HERVE, L. **Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants.** Journal of dairy science, v. 99, n. 1, p. 854-863, 2016.

HISS, S.; MEYER, T.; SAUERWEIN, H. **Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation.** Small ruminant research, v. 80, n. 1, p. 87-90, 2008.

HOLST, B. D.; HURLEY, W. L.; NELSON, D. R. **Involution of the bovine mammary gland histological and ultrastructural-changes.** Journal of Dairy Science, v. 70, n. 5, p. 935-944, 1987.

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

HURLEY, W. L. **Mammary-gland function during involution.** Journal of Dairy Science, v. 72, n. 6, p. 1637-1646, 1989.

IP, M. M.; DARCY, K. M. **Three-Dimensional Mammary Primary Culture Model Systems.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 1, n. 1, p. 91-110, 1996.

KLEINBERG, D. L. **Role of IGF-I in normal mammary development.** Breast Cancer Research and Treatment, v. 47, n. 3, p. 201-208, 1998.

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

KNIGHT, C. H.; WILDE, C. J. **Milk-production in concurrently pregnant and lactating goats mated out of season.** Journal of Dairy Research, v. 55, n. 4, p. 487-493, 1988.

KULIK, G.; KLIPPEL, A.; WEBER, M. J. **Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt.** Molecular and Cellular Biology, v. 17, n. 3, p. 1595-1606, 1997.

LEITNER, G. et al. **Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of**

leukocytes into milk: comparison among cows, goats and sheep. Veterinary immunology and immunopathology, v. 147, n. 3-4, p. 202-210, 2012.

LEON, J. M. et al. **Characterization of the lactation curve in Murciano-Granadina dairy goats.** Small Ruminant Research, v. 107, n. 2-3, p. 76-84, 2012.

LI, H. H. et al. **MEN1/Menin regulates milk protein synthesis through mTOR signaling in mammary epithelial cells.** Scientific Reports, v. 7, 2017.

LI, P. et al. **Identification of cell types in the developing goat mammary gland.** Histochemical Journal, v. 31, n. 6, p. 379-393, 1999.

LIN, Y. et al. **Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow.** BMC veterinary research, v. 12, n. 1, p. 81, 2016.

LINZELL, J. L. **Measurement of udder volume in live goats as an index of mammary growth and function.** Journal of Dairy Science, v. 49, n. 3, p. 307-311, 1966.

LUND, L. R. et al. **Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: Proteinase-independent and -dependent pathways.** Development, v. 122, n. 1, p. 181-193, 1996.

MACIAS, H.; HINCK, L. **Mammary gland development.** Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology, v. 1, n. 4, p. 533-557, 2012.

MARKOV, A. G. et al. **Altered expression of tight junction proteins in mammary epithelium after discontinued suckling in mice.** Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, v. 463, n. 2, p. 391-398, 2012.

MARNET, P. G.; KOMARA, M. **Management systems with extended milking intervals in ruminants: Regulation of production and quality of milk.** Journal of Animal Science, v. 86, n. 13, p. 47-56, 2008.

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

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

MARTINS, R. F. S. et al. **Mastitis detection in sheep by infrared thermography.** Research in Veterinary Science, v. 94, n. 3, p. 722-724, 2013.

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

MCMAHON, M.; GERICH, J.; RIZZA, R. **Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism.** Diabetes/Metabolism Research and Reviews, v. 4, n. 1, p. 17-30, 1988.

MCMAHON, C. D. et al. **Decreased expression of β 1-integrin and focal adhesion kinase in epithelial cells may initiate involution of mammary glands.** Journal of cellular physiology, v. 200, n. 2, p. 318-325, 2004.

MCMANUS, C. et al. **Infrared thermography in animal production: An overview.** Computers and Electronics in Agriculture, v. 123, p. 10-16, 2016.

MEHTA, N. M. et al. **Hormonal modulation of the casein gene expression in a mammosynthesis-lactogenesis culture model of the whole mammary gland of the mouse.** Journal of Biological Chemistry, v. 255, n. 10, p. 4430-4434, 1980.

METZNER, M. et al. **Infrared thermography of the udder surface of dairy cattle: Characteristics, methods, and correlation with rectal temperature.** The Veterinary Journal, v. 199, n. 1, p. 57-62, 2014.

MOLENAAR, A. J.; DAVIS, S. R.; WILKINS, R. J. **Expression of alpha-lactalbumin, alpha-s1-casein, and lactoferrin genes is heterogeneous in sheep and cattle mammary tissue.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 40, n. 5, p. 611-618, 1992.

MOLENAAR, A. J.; KUYSS, Y. M.; DAVIS, S. R.; WILKINS, R. J.; MEAD, P. E.; TWEEDIE, J. W. **Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland.** Journal of dairy science, v. 79, n.7, p. 1198-1208, 1996.

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

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

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

NEGRÃO, J. A. PORCIONATO, M. A. F. ; PASSILLE, A. M. ; RUSHEN, J. **Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking.** Journal of Dairy Science, 87: 1713-1718, 2004.

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

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of small ruminant: sheep, goats, cervids and New World camelids.** Washington, D.C., 262 p., 2006.

NEWTON, R. **Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?.** Thorax, v. 55, n. 7, p. 603-613, 2000.

ODENSTEN, M. O.; CHILLIARD, Y.; HOLTENIUS, K. **Effects of two different feeding strategies during dry-off on metabolism in high-yielding dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 88, n. 6, p. 2072-2082, 2005.

ODENSTEN, M. O.; HOLTENIUS, K.; WALLER, K. P. **Effects of two different feeding strategies during dry-off on certain health aspects of dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 90, n. 2, p. 898-907, 2007.

OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. **Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis.** Molecular and cellular biochemistry, v. 351, n. 1-2, p. 41-58, 2011.

OLIVER, J.; DODD, F. H.; NEAVE, F. K. **Udder infections in the dry period .3. The method of drying-off cows at the end of lactation.** Journal of Dairy Research, v. 23, n. 2, p. 197-203, 1956.

OLLIER, S. et al. **Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or a glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 12, p. 9949-9961, 2016.

OLLIER, S.; ZHAO, X.; LACASSE, P. **Effects of feed restriction and prolactin-release inhibition at drying off on metabolism and mammary gland involution in cows.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 8, p. 4942-4954, 2014.

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

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

PAULOIN, A.; CHANAT, E. **Prolactin and epidermal growth factor stimulate adipophilin synthesis in HC11 mouse mammary epithelial cells via the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway.** Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, v. 1823, n. 5, p. 987-996, 2012.

PEAKER, M.; BLATCHFORD, D. R. **Distribution of milk in the goat mammary-gland and its relation to the rate and control of milk secretion.** Journal of Dairy Research, v. 55, n. 1, p. 41-48, 1988.

PERUZZI, Francesca et al. **Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis.** Molecular and cellular biology, v. 19, n. 10, p. 7203-7215, 1999.

PONCHON, B. et al. **Relationship between glucocorticoids and prolactin during mammary gland stimulation in dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 100, n. 2, p. 1521-1534, 2017.

PORCIONATO, M. A. F.; NEGRÃO, J. A.; PAIVA, F. A. **Morfometria e distribuição de leite alveolar e cisternal na glândula mamária de vacas Holandesa e Girolanda.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 2, 287-292, 2009.

PORTT, L et al. **Anti-apoptosis and cell survival: a review.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1813, n. 1, p. 238-259, 2011.

POUROVA, J. et al. **Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes.** Acta physiologica, v. 198, n. 1, p. 15-35, 2010.

PROSSER, C. G. et al. **Increase in milk secretion and mammary blood-flow by intraarterial infusion of insulin-like growth factor-i into the mammary-gland of the goat.** Journal of Endocrinology, v. 126, n. 3, p. 437-443, 1990.

PROSSER, C. G. et al. **Regulation of blood flow in the mammary microvasculature¹.** Journal of Dairy Science, v. 79, n. 7, p. 1184-1197, 1996.

QUARRIE, L. H.; ADDEY, C. V. P.; WILDE, C. J. **Local control of mammary apoptosis by milk stasis.** Intercellular Signalling in the Mammary Gland, p. 95-96, 1995.

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

RILEY, L. G. **Lactoferrin decreases primary bovine mammary epithelial cell viability and casein expression.** Journal of dairy research, v.75, n. 2, p. 135-141, 2008b.

SAFAYI, S. et al. **Continuous lactation effects on mammary remodeling during late gestation and lactation in dairy goats.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 1, p. 203-217, 2010.

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

SCHANBACHER, F. L.; GOODMAN, R. E.; TALHOUK, R. S. **Bovine Mammary Lactoferrin: Implications from Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Sequence and Regulation Contrary to Other Milk Proteins¹.** Journal of dairy science, v. 76, n. 12, p. 3812-3831, 1993.

SCHWERTFEGER, K. L.; RICHERT, M. M.; ANDERSON, S. M. **Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice.** Molecular endocrinology, v. 15, n. 6, p. 867-881, 2001.

SCOTT, Philip R. **Sheep medicine.** CRC Press, 2015.

SHI, H. et al. **Genes regulating lipid and protein metabolism are highly expressed in mammary gland of lactating dairy goats.** Functional & integrative genomics, v. 15, n. 3, p. 309-321, 2015.

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

SINGH, K. et al. **Milk accumulation decreases expression of genes involved in cell-extracellular matrix communication and is associated with induction of apoptosis in the bovine mammary gland.** Livestock Production Science, v. 98, n. 1-2, p. 67-78, 2005.

SINGH, K. et al. **cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland.** Journal of Dairy Science, v. 91, n. 6, p. 2236-2246, 2008.

SINGH, K. et al. **The effect of milking reinitiation following extended nonmilking periods on lactation in primiparous dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 98, n. 11, p. 7666-7674, 2015.

SINGH, K. et al. **Cell survival signaling in the bovine mammary gland during the transition from lactation to involution.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 9, p. 7523-7543, 2016.

SINGH, K. et al. **Temporal and spatial heterogeneity in milk and immune-related gene expression during mammary gland involution in dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 100, n. 9, p. 7669-7685, 2017.

SINGLETON, J. R.; BAKER, B. L.; THORBURN, A. **Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis.** Endocrinology, v. 141, n. 8, p. 2945-2950, 2000.

SINHA, Y. N.; TUCKER, H. A. **Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during estrous cycle.** Journal of Dairy Science, v. 52, n. 4, p. 507-512, 1969.

SIONOV, R. V. et al. **Glucocorticoid-Induced Apoptosis: Revisited: A Novel Role for Glucocorticoid Receptor Translocation to the Mitochondria.** Cell Cycle, v. 5, n. 10, p. 1017-1026, 2006.

SHAMAY, A. et al. **Effect of dexamethasone on milk yield and composition in dairy cows.** In: *Annales de zootechnie*. EDP Sciences, v. 49, n. 4, p. 343-352, 2000.

ŠKARDA, J. et al. **Effects of insulin, cortisol and prolactin on lipid, protein and casein syntheses in goat mammary tissue in organ culture.** Reproduction Nutrition Développement, v. 22, n. 2, p. 379-386, 1982.

SMITH, A.; WHEELOCK, J. V.; DODD, F. H. **Effect of milking throughout pregnancy on milk yield in succeeding lactation.** Journal of Dairy Science, v. 49, n. 7, p. 895-896, 1966.

SMOLENSKI, G. A. et al. **Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining.** Veterinary Research, v. 46, 2015.

SORENSEN, J. T.; ENEVOLDSEN, C. **Effect of dry period length on milk-production in subsequent lactation.** Journal of Dairy Science, v. 74, n. 4, p. 1277-1283, 1991.

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

STEIN, T.; SALOMONIS, N.; GUSTERSON, B. A. **Mammary gland involution as a multi-step process.** Journal of mammary gland biology and neoplasia, v. 12, n. 1, p. 25-35, 2007.

STELWAGEN, K. et al. **Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats.** Journal of Dairy Science, v. 77, n. 2, p. 426-432, 1994.

STELWAGEN, K. et al. **Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium.** Journal of Endocrinology, v. 159, n. 1, p. 173-178, 1998.

STELWAGEN, K. et al. **Immune components of bovine colostrum and milk.** Journal of Animal Science, v. 87, n. 13, p. 3-9, 2009.

STELWAGEN, K. et al. **Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components.** American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, v. 273, n. 1, p. R379-R386, 1997.

STELWAGEN, K.; SINGH, K. **The role of tight junctions in mammary gland function.** Journal of mammary gland biology and neoplasia, v. 19, n. 1, p. 131-138, 2014.

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

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

TAO, S. et al. **Maternal heat stress during the dry period alters postnatal whole-body insulin response of calves.** Journal of dairy science, v. 97, n. 2, p. 897-901, 2014.

TYAGI, R. P. S. et al. **Ruminant surgery.** CBS Pub., 1995.

VALIZAHEH, R.; VEIRA, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. **Behavioural responses by dairy cows provided two hays of contrasting quality at dry-off.** Applied Animal Behaviour Science, v. 109, n. 2-4, p. 190-200, 2008.

VANDERKOLK, J. H. **The bovine pituitary-adrenocortical axis and milk-yield.** Veterinary Quarterly, v. 12, n. 2, p. 114-120, 1990.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. **Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation.** Endocrinology, v. 152, n. 12, p. 4838-4845, 2011.

VRIES, L. D. et al. **Characterization of mammary stromal remodeling during the dry period.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 6, p. 2433-2443, 2010.

WARESKI, P. et al. **Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat.** Small Ruminant Research, v. 40, n. 3, p. 279-289, 2001.

WILDE, C. J.; HENDERSON, A. J.; KNIGHT, C. H. **Metabolic adaptations in goat mammary tissue during pregnancy and lactation.** Journal of Reproduction and Fertility, v. 76, n. 1, p. 289-298, 1986.

WILDE, C. J.; KNIGHT, C. H. **Metabolic adaptations in mammary-gland during the declining phase of lactation.** Journal of Dairy Science, v. 72, n. 6, p. 1679-1692, 1989.

WILDE, C. J. et al. **Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution.** Experimental Physiology, v. 82, n. 5, p. 943-953, 1997.

WYMANN, M. P.; ZVELEBIL, M.; LAFFARGUE, M. **Phosphoinositide 3-kinase signalling—which way to target?** Trends in Pharmacological Sciences, v. 24, n. 7, p. 366-376, 2003

YANG, X. et al. **The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth.** Journal of Animal Science, v. 86, n. suppl_14, p. E36-E50, 2008.

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

ZHANG, T. et al. **Akt Serine/Threonine Kinase 1 Regulates De Novo Fatty Acid Synthesis through mTOR/SREBP1 Axis in Dairy Goat Mammary Epithelial Cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 66, n. 5, p. 1197-1205, 2018

ZHAO, X.; LACASSE, P. **Mammary tissue damage during mastitis: causes and controls.** Journal of Animal Science, v. 83, p. 2-2, 2005.

2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ACTH SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A SÍNTESE DE LEITE E PROTEÍNAS DO LEITE, E COMPOSIÇÃO DAS SECREÇÕES MAMÁRIAS DURANTE A INVOLUÇÃO MAMÁRIA DE CABRAS SAANEN

RESUMO

O período seco é essencial para a renovação das estruturas celulares e alveolares do tecido mamário, melhorando a produtividade leiteira da próxima lactação. No entanto, o período de secagem é um fator estressante ao animal. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da alta concentração de cortisol sobre a expressão de genes relacionados a síntese de leite e síntese proteica como, receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1R), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), β -caseína (CSN2), α -lactalbumina (LALBA) e lactoferrina (LF), e analisar a qualidade química e microbiológica das secreções mamárias durante o período de secagem em cabras. Para esse estudo, foram utilizadas 30 cabras Saanen aos 259 ± 8 dias em lactação, submetidas a secagem abrupta. Assim, foi administrado via exógena o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ($n = 15$) e uma solução placebo ($n = 15$) nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 após a secagem. Nesse estudo, a liberação de cortisol aumentou significativamente após a administração de ACTH, o qual foi comparado ao tratamento placebo. Assim, a administração de ACTH diminuiu significativamente a expressão de IGF-1R no tecido mamário das cabras. No entanto, não surgiu efeito significativo nos demais genes. Ainda, observamos que o período de secagem causou diminuição significativa nos genes Akt, mTOR, CSN2 e LALBA. E aumentou significativamente a LF e PI3K. Além disso, a contagem de células somáticas (CCS) e concentração de lactoferrina nas secreções mamárias foram significativamente maiores no tratamento ACTH. Porém, os tratamentos ACTH ou placebo e o período secagem não alteraram a qualidade química das secreções mamárias, mas causou uma redução na qualidade microbiológica após a secagem. Além disso, as cabras Saanen apresentaram baixa taxa de reabsorção dos componentes do leite durante o início do período de secagem. Por fim, mais estudos precisam ser realizados para entender os mecanismos de ação do cortisol e como que regulam a involução mamária em cabras.

Palavras-chave: células epiteliais mamárias, cortisol, secagem, sobrevivência celular.

EFFECTS OF ACTH ADMINISTRATION ON THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO THE SYNTHESIS OF MILK AND MILK PROTEINS, AND COMPOSITION OF MAMMARY SECRETIONS DURING THE MAMMARY INVOLUTION OF CABRAS SAANEN

ABSTRACT

The dry period is essential for the renewal of the cellular and alveolar structures of the mammary tissue, improving the dairy productivity of the next lactation. However, the drying period is a stressful factor to the animal. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of high cortisol concentration on the expression of genes related to milk synthesis and protein synthesis, such as receptor insulin-like growth factor type 1 (IGF-1R), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), mammalian rapamycin target protein (mTOR), β -casein (CSN2), α -lactalbumin (LALBA) and lactoferrin (LF), and to analyze the chemical and microbiological quality mammary secretions during the dry-off period in goats. In this study, 30 Saanen goats were used at 259 ± 8 days in lactation, subjected to abrupt dry-off. Thus, adrenocorticotrophic hormone (ACTH; $n = 15$) and placebo solution ($n = 15$) were administered exogenously on days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30 and 60 after dry-off. In that study, cortisol release increased significantly after administration of ACTH, which was compared to the placebo treatment. Thus, ACTH administration significantly decreased IGF-1R expression in the mammary tissue of goats. However, there was no significant effect on the other genes. In addition, we observed that the dry-off period caused a significant decrease in Akt, mTOR, CSN2 and LALBA genes. A significantly increased LF and PI3K. In addition, the somatic cell count (CCS) and concentration of lactoferrin in the mammary secretions were significantly higher in the ACTH treatment. However, the ACTH or placebo treatments and the dry-off period did not alter the chemical quality of the mammary secretions, but caused a reduction in microbiological quality after dry-off. Furthermore, Saanen goats showed a low rate of reabsorption of the milk components during the beginning of the dry-off period. Finally, more studies need to be performed to understand the mechanisms of action of cortisol and how they regulate mammary involution in goats.

Key words: Cell survival. Cortisol. Dry-off. Mammary epithelial cells.

2.1 INTRODUÇÃO

A glândula mamária tem como função a síntese de leite para a prole (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002), caracterizando-se por ser um órgão altamente especializado repetindo o seu desenvolvimento e involução diversas vezes na vida da fêmea através da renovação de suas estruturas alveolares (IP; DARCY, 1996; LI et al., 1999; CAPUCO et al., 2001; STEFANON et al., 2002; SINGH et al., 2015). Com isso, o período seco é essencial para os animais leiteiros, garantindo a renovação das células epiteliais mamárias e, consequentemente melhorando a produção de leite na próxima lactação (STEFANON et al., 2002). No entanto, nas horas seguintes à secagem há um acúmulo de leite na glândula mamária e alguns autores sugerem que o aumento do volume no úbere e a pressão intramamária desencadeiam o processo de involução (HURLEY, 1989; WILDE et al., 1999). Assim, as alterações na morfologia e funcionamento do tecido mamário podem ser instantâneas, como a diminuição na síntese dos componentes do leite, enquanto outras são mais progressivas, como a redução na atividade secretória das células epiteliais mamárias, apoptose, infiltração de leucócitos para remover os componentes do leite e detritos celulares (HURLEY, 1989; OLIVER; SORDILLO, 1989; WILDE et al., 1999; SINGH et al., 2008). Além disso, as alterações moleculares no tecido mamário também são observadas, incluindo o declínio na expressão de genes relacionados a síntese de proteínas do leite (HURLEY, 1989; SAFAYI et al., 2010; SINGH et al., 2017) e de sobrevivência das células epiteliais mamárias (SINHG et al., 2016). Essas características são seguidas do aumento nas respostas protetivas ao estresse oxidativo e infecções intramamárias (SU et al., 2002) e consequentemente, maior síntese dos fatores imunomoduladores, como a lactoferrina (MOLENAAR et al., 1996; SINGH et al., 2017).

Neste contexto, o estresse e o aumento da liberação de glicocorticoides são associados com a queda na síntese de leite (CAROPRESE et al., 2010; PONCHON et al., 2017) e a diminuição da expressão de genes relacionados aos fatores de sobrevivência nas células epiteliais mamárias (BOMFIM et al., 2018). Além disso, a alta concentração de glicocorticoides geralmente diminui as respostas imunes (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008). No entanto, o efeito do estresse sobre a regressão do tecido mamário das cabras e a sua influência sobre a sobrevivência das células epiteliais mamárias ainda não estão bem estabelecidas.

Em fato, altas concentrações de glicocorticoides plasmático podem ser prejudiciais para o desenvolvimento e atividades fisiológicas da glândula mamária (SHAMAY et al., 2000; PONCHON et al., 2017). No entanto, em estudo recente foi demonstrado que o cortisol pode

estimular a sinalização de genes relacionados a sobrevivência celular (como, IGF-1R) e, assim bloquear vias de apoptose nas células epiteliais mamárias (BOMFIM et al., 2018). Desse modo, uma das vias de sobrevivência nas células epiteliais mamárias estimulada pelo IGF-1R é a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ proteína quinase B (Akt)/ proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (PERUZZI et al., 1999; BURGOS; CANT et al., 2010; MURNEY et al., 2015; LI et al., 2017). Essa via está inteiramente relacionada com a síntese de leite e proteínas do leite (SAKAMOTO et al., 2007; MURNEY et al., 2015). Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração exógena de ACTH sobre a expressão gênica da via IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR, composição e qualidade das secreções mamárias durante o período de secagem das cabras Saanen.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado e protocolado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP). O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal, no Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP em Pirassununga, São Paulo, Brasil (na latitude 21° 57' 02" S, longitude 47° 27' 50" W). O clima predominante é subtropical, com temperatura média de 23°C e umidade de 73% e estação de chuva é entre os meses de novembro e março (com média anual variando de 1.300 a 2.000 mm). Esse estudo foi conduzindo entre os meses de março a maio.

2.2.1 Animais, dieta, ordenha e manejo de secagem

Antes do experimento, todas as cabras permaneceram semiconfinadas em baias coletivas parcialmente cobertas com acesso livre a comedouros, bebedouros e sal mineral. A alimentação foi composta por 60% de volumoso e 40% de concentrado conforme as exigências nutricionais ao longo da lactação (NRC, 2006). Após o parto, a ordenha foi realizada diariamente, uma vez ao dia, durante todo período de lactação. A máquina de ordenha foi regulada para manter um nível de vácuo de 48 KPa e taxa de pulsação de 120 ciclos/minuto. A rotina da ordenha seguiu o protocolo: os animais foram conduzidos para a sala de ordenha, então, os tetos foram higienizados com pré-dipping, secados e realizou-se o teste da caneca do fundo preto. Após, as teteiras foram acopladas, e ao final da ordenha as teteiras foram retiradas. Em seguida, os tetos foram imersos em uma solução de iodo (pós-dipping), foi registrada a

produção de leite e, então, a saída dos animais da sala de ordenha para os piquetes com pastagem. Portanto, o manejo alimentar das cabras antes da secagem seguiu da restrição total ao fornecimento de silagem e concentrado 3 dias antes da data de secagem e 15 dias após a secagem. Nesse período os animais permaneceram em piquetes de pastagem contendo grama tifton de boa qualidade e quantidade, das 8 às 16h, com acesso livre à sombra e água. Após, as cabras eram conduzidas para as baias coletivas onde dispunham de acesso livre ao sal mineral e água.

2.2.2 Experimento

Foram utilizadas 30 cabras da raça Saanen, lactantes e não gestantes, as quais foram divididas em dois grupos homogêneos, em peso vivo, escore corporal, número de partos e produção de leite. Assim, no final da lactação (dias -15, -6 e -1) a produção de leite foi registrada individualmente e foram coletadas amostras de leite para as análises da composição e qualidade.

Desse modo, as cabras foram submetidas à secagem abrupta aos 259 ± 8 dias de lactação (dia -1). Todas as cabras receberam um antibiótico intramamário (Mastifin® Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil). Assim, os animais foram divididos nos tratamentos (1) ACTH (administrado via endógena de 0,3 UI/Kg PV/animal) e (2) placebo (solução fisiológica). Os tratamentos ACTH e placebo foram administrados nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 após a secagem através da punção da veia jugular.

2.2.3 Coleta e análise das secreções mamárias e sangue

Nos dias -15, -6, -1, 3, 6, 9, 12 e 15 do período de secagem foram coletadas amostras de leite, no turno da manhã, para análise da composição e qualidade. A porcentagem de gordura, lactose, proteína e extrato seco foram determinadas por equipamento infravermelho (Milkoscope Expert Automatic). A CCS foi determinada por microscopia objetiva de imersão. Além da contagem total de células somáticas, foram contadas 100 células de cada animal para a contagem de células diferencial. Além disso, foram analisadas as concentrações de lactoferrina nas secreções mamárias através do kit Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para as análises microbiológicas utilizou-se três meios de cultivo para Contagem Total de Bactérias

(*Plate Count Agar*), contagem de Estafilococos (*Baird Parker Agar*) e contagem de Enterobactérias (*MacConkey Agar*). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 do período de secagem, foram coletadas as amostras de sangue a partir da punção da veia jugular em 60 minutos após a administração de ACTH e placebo. Imediatamente após a colheita as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm, 4°C por 17 minutos e o plasma armazenado a -20°C até a análise de cortisol. O cortisol foi determinado por ensaio imunoenzimático usando kit comercial (Monobind, Lake Forest, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Nos dias 0, 15, 30 e 60 do período de secagem, foram realizadas biópsias no tecido mamário de 8 cabras (4 animais de cada tratamento). As biópsias foram conduzidas em 60 min após a administração de ACTH e placebo. Inicialmente realizou-se a tricotomia com assepsia da pele e bloqueio anestésico. Após, uma incisão de cerca de 3 a 4 mm foi realizada na pele e em seguida inseriu-se a agulha de biópsia para a coleta de um fragmento do tecido mamário.

A expressão gênica do tecido mamário foi realizado através da extração do RNA com kit de extração de RNA PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido da síntese de cDNA por RT, onde o RNA total da amostra foi reverso-transcrito em um volume final de 20 µL, empregando-se a enzima GoScript Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). Resumidamente, o protocolo iniciou-se com a incubação do RNA com 0,5 µg de oligonucleotídio oligo-dT por 5 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação tampão 1x buffer 3,0 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidor de RNases e 1,0 µL da enzima transcriptase reversa. A reação foi conduzida a 42°C durante 60 minutos, seguindo por 15 minutos a 70°C e resfriamento a 4°C. A partir do cDNA foi realizada a análise em RT-PCR dos genes alvos usando os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de *primers* dos genes estudados.

Gene		Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Fragmento (pb)
IGF-1R	Direto	5'-TGGAGTGCTGTATGCCTCTGT-3'	XM_005694951	178
	Reverso	5'-GGTCTCGGGCTCATCCTT-3'		
PI3K	Direto	5'-TCAACCATGACTGTGTGCCA-3'	XM_018047551	234
	Reverso	5'-CCATCAGCATCAAATTGGGCA-3'		
AKT	Direto	5'-CCTGCCCTTCTACAACCAGG-3'	NM_001285750	328
	Reverso	5'-GTCTTGGTCAGGTGGCGTAA-3'		
mTOR	Direto	5'-CGTCTCGCTTGTACTTTGGG-3'	NM_001285748	243
	Reverso	5'-GCTGCTTGGAGATTCGTCTG-3'		
CSN2	Direto	5'-ACAGCCTCCCACAAAACATC-3'	EF558564	206
	Reverso	5'-AGGAAGGTGCAGCTTTTCAA-3'		
LALBA	Direto	5'-ACCAGTGGTTATGACACACAAGC-3'	NM_001285635	233
	Reverso	5'-AGTGCTTTATGGGCCAACCAGT-3'		
LF	Direto	5'-GACCTCTGCCTTGAATGTATC-3'	DQ522303	338
	Reverso	5'-ATCTAGCCACAGCTCCCTGGAG-3'		
GAPDH	Direto	5'-GGTGATGCTGGTGTCTGAG-3'	AJ431207	181
	Reverso	5'-TGACAATCTTGAGGGTGTG-3'		

Os genes foram IGF-1R: Receptor de IGF-1; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; AKT: proteína quinase B; mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos; CSN2: β -caseína; LALBA: α -lactalbumina; LF: lactoferrina; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Cada gene estudado foi amplificado em uma reação separada e em duplicata. A cada 20 μ L de reação havia, 1,0 μ L de cDNA, 0,4 μ L de uma mistura da sequência de oligonucleotídeos, 0,4 μ L dos genes analisados, 8,2 μ L de água livre de RNA e 10 μ L de SYBR Green Mix (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). A expressão gênica dos genes estudados foi normalizada ao de GAPDH como calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Assim, as amostras foram submetidas a PCR-RT e subsequente análise dos fragmentos amplificados.

2.2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS, 2008). A normalidade dos dados foi confirmada usando o teste Shapiro-Wilk. Assim, a liberação de cortisol foi submetida a análise de variância pelo procedimento MIXED do SAS: no modelo, foi considerado como efeito fixo o tratamento e período, e o efeito animal foi considerado aleatório.

Os componentes das secreções mamárias, CCS total, CCS diferencial e concentração de lactoferrina foram submetidos a análise de variância pelo procedimento MIXED do SAS: no

modelo, foi considerado como efeito fixo o tratamento e período, e o efeito de animal foi considerado aleatório.

A expressão gênica foi submetida a análise de variância pelo procedimento GLM do SAS, o qual separou o tratamento, período e animais como causa de variação: no modelo, o tratamento foi considerado fixo e os animais foram considerados como aleatórios.

Nas tabelas e figuras os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Assim, onde houve efeito significativo, as médias foram comparadas usando o teste de Fisher. Foi definido como significativo $p \leq 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efeito do final da lactação sobre a produção de leite e componentes do leite

A produção de leite das cabras Saanen diminuiu significativamente no final da lactação (Figura 1). Na 35ª semana de lactação as cabras foram submetidas a restrição no consumo de silagem e concentrado por três dias antes da data de secagem. Nesse período as cabras permaneceram apenas em pastagem de grama tifton de boa qualidade.

Figura 1. Curva de lactação de cabras Saanen durante o ciclo lactacional¹.

¹ Curva de lactação corrigida para teor de gordura.

Contudo, na última semana de lactação os teores de gordura, lactose, proteína e extrato seco aumentaram significativamente (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da administração de ACTH ou placebo sobre os componentes do leite de cabras Saanen durante o período final de lactação (n = 30) e período de secagem (n = 15)¹.

Componente ²	Final da lactação (dias)			Dias após a secagem									
	247	253	259	3		6		9		12		15	
				ACTH	Placebo	ACTH	Placebo	ACTH	Placebo	ACTH	Placebo	ACTH	Placebo
Gordura (%)	2,84±0,07 ^b	3,05± 0,08 ^b	3,58±0,14 ^a	2,89±0,24 ^a	3,00±0,28 ^a	3,30 ± 0,45 ^a	3,51 ± 0,22 ^a	3,86±0,50 ^a	3,88±0,44 ^a	4,24±0,56 ^a	3,66±0,36 ^a	3,55±0,45 ^a	3,67±0,44 ^a
Lactose (%)	4,22±0,03 ^b	4,26±0,03 ^b	4,39±0,05 ^a	4,38±0,08 ^a	4,48±0,09 ^a	4,34±0,18 ^a	4,59±0,18 ^a	4,57±0,27 ^a	4,74±0,27 ^a	4,82±0,28 ^a	4,59±0,28 ^a	4,63±0,25 ^a	4,63±0,25 ^a
Proteína (%)	3,11±0,02 ^b	3,14±0,02 ^{ab}	3,22±0,02 ^a	3,22±0,05 ^a	3,29±0,05 ^a	3,19±0,12 ^a	3,36±0,12 ^a	3,34±0,17 ^a	3,46±0,17 ^a	3,51±0,18 ^a	3,36±0,18 ^a	3,38±0,17 ^a	3,38±0,17 ^a
Extrato seco (%)	7,69±0,06 ^b	7,75±0,06 ^{ab}	7,98±0,09 ^a	7,98±0,16 ^a	8,16±0,09 ^a	7,89±0,38 ^a	8,36±0,17 ^a	8,32±0,58 ^a	8,63±0,32 ^a	8,77±0,61 ^a	8,37±0,33 ^a	8,15±0,33 ^a	8,75±0,54 ^a

¹Os dados estão apresentados como média ± erro padrão.²Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

2.3.2 Efeito da administração de ACTH e placebo durante o período de secagem.

Não houve efeito da administração de ACTH e placebo, ou mesmo interação significativa entre os tratamentos e o período de secagem sobre o teor de gordura, lactose, proteína e extrato seco no leite (Tabela 2).

No entanto, a concentração de ACTH utilizada nesse estudo foi suficiente para promover o aumento do cortisol plasmático em 60 min após sua administração nas cabras Saanen. Assim, as cabras que receberam a solução placebo mantiveram a concentração de cortisol significativamente menor em relação às cabras ACTH (Figura 2). No entanto, ambos tratamentos apresentaram concentrações mais elevadas de cortisol que os níveis basais.

Figura 2. Concentração de cortisol após a administração de ACTH e placebo em cabras Saanen.

Concentração de cortisol plasmático (ng/mL) nas cabras Saanen após a administração de ACTH ou placebo (n = 15) durante o período de secagem. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Nos dias 30 e 60 após a secagem, a administração de ACTH também aumentou significativamente a concentração de cortisol plasmático (Figura 3). Enquanto que o tratamento placebo manteve o cortisol plasmático em níveis similares aos basais.

Figura 3. Efeito da administração de ACTH e placebo sobre a liberação de cortisol (ng/mL) durante os dias 30 e 60 do período de secagem de cabras Saanen (n = 15).

Concentração de cortisol plasmático (ng/mL) nas cabras Saanen após a administração de ACTH ou placebo (n = 15) durante o período de secagem. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Observamos efeito da administração de ACTH sobre a CCS (Figura 4). O valor da CCS foi significativamente maior no tratamento com ACTH em relação ao placebo. Também, observamos um aumento gradual na CCS ao longo dos dias de secagem para ambos tratamentos, ACTH e placebo (Figura 4). Além disso, a concentração de lactoferrina nas secreções mamárias foi significativamente maior no tratamento ACTH em relação ao tratamento placebo (Figura 4). No entanto, a concentração de lactoferrina permaneceu inalterada ao longo dos dias de secagem no grupo ACTH, enquanto que no grupo placebo apresentou uma queda significativa nos primeiros 3 dias de secagem, retornando após à níveis similares ao tratamento ACTH (Figura 4).

Figura 4. Efeito do administração de ACTH ou placebo sobre a CCS e concentração de lactoferrina nas secreções mamárias das cabras Saanen durante o período de secagem (n= 15).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

A proporção das células imunes na CCS diferencial estão apresentadas na Figura 5. Após a secagem das cabras, observamos o efeito da administração de ACTH e placebo sobre a porcentagem de basófilos nas secreções mamárias, as cabras ACTH apresentaram maior quantidade de basófilos em relação as cabras placebo. Os basófilos parecem ser recrutados durante os primeiros 3 dias do período de secagem, mantem-se estáveis até o 9° dia e, voltam a aumentar no 12° dia de secagem. Além disso, observamos um aumento progressivo no percentual de basófilos e eosinófilos durante o início do período de secagem das cabras. Para as demais células imunes, não observamos o efeito da administração de ATCH ou placebo. A partir do 12° dia de secagem observamos um aumento significativo na porcentagem de macrófagos e diminuição dos linfócitos. Contudo, os neutrófilos e os linfócitos foram as células imunes predominantes ao longo do processo de secagem das cabras Saanen.

Figura 5. Efeito do administração de ACTH ou placebo sobre as células somáticas diferencial para eosinófilos, basófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos e concentração de lactoferrina nas secreções mamárias das cabras Saanen durante o período de secagem (n= 15).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

2.3.3 Efeito da administração de ACTH ou placebo sobre os genes do eixo IGF-1R e PI3K/Akt/mTOR durante o período de secagem das cabras

Observamos que a administração de ACTH ou placebo apresentaram efeito significativo sobre a expressão de IGF-1R. Desse modo, a administração de ACTH reduziu significativamente a expressão de IGF-1R no tecido mamário das cabras (Figura 6). O IGF-1R é conhecido por estimular a via de síntese de proteínas do leite. No entanto, a administração de ACTH ou placebo não apresentaram efeitos significativos sobre as expressões relativas das enzimas PI3K, Akt e mTOR. Observamos efeito dos dias de secagem para esses genes. Assim,

a expressão relativa da PI3K apresentou uma leve diminuição após a secagem, e seguiu de um aumento significativo após os 30 dias do período de secagem. Ao contrário, observamos que as expressões das enzimas Akt e mTOR diminuíram significativamente durante nos primeiros 15 dias do período de secagem, e permaneceram em níveis estáveis ao longo dos 60 dias do período de secagem.

Figura 6. Efeito da administração de ACTH ou placebo sobre a expressão relativa dos genes relacionados a síntese de leite e síntese de proteínas do leite no tecido mamário de cabras Saanen durante o período de secagem¹.

¹Os genes são: receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1R), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt) e proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Em relação a expressão relativa das proteínas do leite no tecido mamário das cabras, LALBA e CSN2, não houve efeito da administração de ACTH e placebo (Figura 7). Contudo, ambas apresentaram seus níveis mais elevados no dia zero da secagem e após, aos 15 dias de secagem, reduziram drasticamente a níveis próximos de zero. Por outro lado, a expressão relativa de lactoferrina também não apresentou efeito da administração de ACTH ou placebo

(Figura 7), no entanto, observamos um aumento significativo durante os primeiros 15 dias da secagem em ambos tratamentos, ACTH e placebo. Contudo, após os 15 dias de secagem, houve uma redução significativa na expressão de lactoferrina.

Figura 7. Efeito da administração de ACTH ou placebo sobre a expressão relativa das proteínas do leite no tecido mamário de cabras Saanen durante o período de secagem¹.

¹Os genes são: β -caseína (CSN2), α -lactalbumina (LALBA) e lactoferrina (LF). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

As cabras desse estudo diminuíram significativamente a produção de leite durante o final da lactação. Com a intenção de estudar os efeitos do período seco nas cabras leiteiras, usamos como modelo o período seco de vacas leiteiras de 60 dias (CAPUCO et al., 2001). Poucos estudos foram conduzidos com o período seco de cabras leiteiras (FOWLER; KNIGHT; FOSTER, 1991; SALAMA et al., 2005; CAJA et al., 2006; SAFAYI et al., 2010). Esses estudos argumentam que as cabras possuem maior persistência leiteira quando comparadas a vacas e ovelhas, porém, esses experimentos foram conduzidos em secagem unilateral das glândulas mamárias, enquanto nosso estudo com a secagem total. Desse modo, o efeito local sobre a glândula mamária seca pode sofrer interferência sistêmica dos hormônios da lactação e não responder de forma eficiente à secagem. Além disso, as cabras desses experimentos estavam gestando e no final da lactação.

Em nosso estudo, a liberação de cortisol após 60 min da administração de ACTH foi similar a estudos prévios (FULKERSON; JAMIESON, 1982; GAIATO et al., 2012; BOMFIM et al., 2018). De modo geral, em resposta ao eixo HHA o estresse pode ser dividido em agudo ou crônico (MORMÈDE et al., 2007). O estresse agudo, ou também pontual, é estabelecido quando há um pico de cortisol durante um manejo estressante de curta duração sobre o animal, e após 4 a 6 horas o cortisol retorna ao nível basal (MOEMÈDE et al., 2007; CANAES et al., 2009; BOMFIM et al., 2018). Esse tipo de estresse está relacionado à manejos rotineiros nas fazendas, como: ordenha, casqueamento, vacinação, vermifugação, transporte e entre outros (NEGRÃO, 2008; CAROPRESE et al., 2010; BOMFIM et al., 2018). Por outro lado, o estresse crônico é estabelecido pela longa exposição do animal ao meio estressante, resultando em alta concentração de cortisol e consequentemente resulta em efeitos negativos sobre a homeostasia (MOEMÈDE et al., 2007; BROWN; VOSLOO, 2017).

Consequentemente, o período de secagem é apontado como um fator estressante dentro da produção leiteira (ZOBEL et al., 2015). Em nosso estudo, as cabras foram submetidas a secagem abrupta, com manejo de restrição ao consumo de silagem e concentrado, para promover o declínio na síntese de leite, o qual manteve-se por 15 dias após a secagem. Além disso, o acúmulo de leite no úbere, nas horas seguintes à secagem, pode causar desconforto ao animal (ZOBEL et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que o manejo de secagem aumentou os níveis de cortisol plasmático nas cabras controle, quando comparado aos níveis basais (BOMFIM et al., 2018; HOOPER et al., 2018). No entanto, esse estresse pode ser

classificado em agudo, pois aos 60 dias do período seco as cabras do tratamento controle apresentaram valor considerado como basal para caprinos.

A administração de ACTH ou placebo não demonstraram efeitos sobre os componentes do leite das cabras Saanen durante o período de secagem. Dentre os componentes do leite, a síntese de lactose é regulada pela expressão gênica de LALBA, uma coenzima responsável pelo passo final na via de síntese (BOUTINAUD et al., 2008). Contudo, a administração de ACTH ou placebo não alteraram a expressão gênica de LALBA, porém o período de secagem promoveu uma diminuição drástica na sua expressão relativa aos 15 dias após a interrupção de ordenha. Além disso, inexplicavelmente, a diminuição da expressão de LALBA não causou efeito sobre a concentração de lactose nas secreções mamárias, durante o início do período de secagem. Do mesmo modo, a queda na expressão de CSN2 e LALBA também não alterou o teor de proteínas nas secreções mamárias. Ainda, estudos prévios demonstraram uma relação direta entre a diminuição da expressão gênica de LALBA e CSN2 com a concentração de proteína no leite das cabras Saanen em 36 horas de interrupção de ordenha (BEN CHEDLY et al., 2009). No entanto, a diminuição na síntese de leite nas horas seguintes a secagem pode concentrar micelas de caseínas e gotículas de gordura nas secreções mamárias, causando um aumento no conteúdo de proteína e gordura durante o início do período seco (DAVIS; FARR; STELWAGEN, 1999; BEN CHEDLY et al., 2013).

Em nosso estudo, o período de secagem promoveu um extensivo aumento da CCS nas secreções mamárias das cabras. Além disso, as cabras que receberam a administração de ACTH apresentaram CCS significativamente maior em relação às cabras controle. Portanto, a dosagem de ACTH utilizada em nosso estudo estimulou a liberação de cortisol pelo eixo HHA e consequentemente aumentou a resposta de infiltração de células imunes do sangue para a glândula mamária, como observado por outros autores em ovelhas (CAROPRESE et al., 2010) e vacas (OLLIER et al., 2016). Outros estudos relacionaram o efeito da alta concentração de glicocorticoides com a diminuição na síntese de leite e também com o aumento da CCS no leite (CAROPRESE et al., 2010; PONCHON et al., 2017). No entanto, essas alterações parecem não serem visualizadas quando a administração de ACTH é pontual (BOMFIM et al., 2018).

Durante o processo de involução mamária a CCS auxilia na remoção das células epiteliais mamárias apoptóticas e degradando os constituintes do leite (OLIVER; SORDILLO, 1989; ATABAI et al., 2007; LANCTÔT et al., 2017). Desse modo, nesse estudo, a administração de ACTH ou placebo não alteraram o perfil de neutrófilos, linfócitos e macrófagos durante a secagem. No entanto, os neutrófilos representaram a maior porcentagem de células imunes (> 50%) nas secreções mamárias, seguido pelos linfócitos (> 25%) e

monócitos (4 - 6%). Em nosso estudo, a porcentagem de neutrófilos e linfócitos foi maior do que observado por outros autores em cabras (BAGNICKA et al., 2011; LEITNER et al., 2012). Contudo, esses estudos foram conduzidos durante o período de lactação das cabras.

Em resposta ao processo de involução mamária, observamos que os eosinófilos e basófilos aumentaram significativamente durante os primeiros 9 dias de secagem das cabras, enquanto que os macrófagos diminuíram nesse período. No entanto, o tratamento com ACTH manteve a porcentagem de basófilos mais alta em relação ao tratamento controle. Assim, a maior concentração de cortisol plasmático melhorou a infiltração de basófilos nas secreções mamárias, durante o início da involução mamárias das cabras Saanen. Portanto, a ação dos leucócitos foi mediada, principalmente, pela presença inicial de neutrófilos e linfócitos, aumento dos eosinófilos e basófilos, e por último o aumento de monócitos aos 15 dias de secagem. Alguns autores demonstraram que os macrófagos foram as células imunes predominantes nas secreções mamárias de ovelhas (TATARCZUCH et al., 2002) e vacas (LEITNER et al., 2012) durante o período de secagem. Contudo, ainda há controvérsias em relação a presença de cada célula imune na glândula mamária durante o período de secagem das cabras (BAGNICKA et al., 2011).

Além disso, outros autores demonstraram relações diretas entre o aumento da CCS e a concentração de lactoferrina no leite de vacas (MOLENAAR et al., 1996; BOUTINAUD et al., 2016) e cabras (HISS; MEYER; SAUERWEIN et al., 2008). Contudo, essa relação não foi encontrada em nosso estudo, nem mesmo o aumento na concentração de lactoferrina durante o período de secagem das cabras. No entanto, a concentração de lactoferrina permaneceu superior nas cabras que receberam a administração de ACTH em comparação às cabras controle. De modo geral, a lactoferrina age como um fator imunomodulador e protetivo às infecções intramamárias durante o início do período de secagem, principalmente em capturar o ferro e deixa-lo indisponível para o metabolismo celular de bactérias patogênicas (MOLENAAR et al., 1996; SILANIKOVE et al., 2013; LANCTÔT et al., 2017). Ainda, estudos prévios observaram que a lactoferrina também pode desencadear a apoptose das células epiteliais mamárias (RILEY et al., 2008; SINGH et al., 2017).

Com base nisso, realizamos a expressão gênica da lactoferrina no tecido mamário das cabras e observamos que a administração de ACTH ou placebo não alteraram a sua expressão. Porém, o período de secagem promoveu um aumento significativo na expressão de lactoferrina aos 15 dias. Em seguida, houve uma diminuição significativa na sua expressão aos 30 e 60 dias do período de secagem, retornando aos níveis similares do dia 0. Com isso, sugerimos que durante o período inicial da secagem das cabras, o qual foi caracterizado pelo maior acúmulo

de leite, distensão do úbere e da susceptibilidade às infecções intramamárias, provocou a sinalização e expressão da lactoferrina. Porém, quando o volume das secreções mamárias diminuiu, observamos também uma redução da sua expressão. Além disso, observamos uma relação inversa entre a expressão de lactoferrina com as proteínas do leite durante o início da secagem. Assim, a expressão de LALBA e CSN2 foi significativamente diminuída quando a expressão de lactoferrina foi aumentada, como observado em vacas leiteiras por outros autores (RILEY et al., 2008; SINGH et al., 2017). Durante a involução mamária, a queda na síntese de leite e da expressão de genes relacionados a síntese de proteínas do leite é associada com a diminuição nos fatores de sobrevivência nas células epiteliais mamárias (SINGH et al., 2017).

Os glicocorticoides são comumente conhecidos por apresentarem efeitos negativos na glândula mamária (SHAMAY et al., 2000; PONCHON et al., 2017). Em nosso estudo, observamos um efeito significativo da administração de ACTH e placebo sobre a expressão relativa de IGF-1R no tecido mamário das cabras durante o período de secagem. Inicialmente postulávamos de que a alta concentração de cortisol plasmático poderia diminuir a expressão relativa de IGF-1R, essa hipótese foi confirmada. A longa exposição das cabras experimentais ao cortisol causou a supressão do IGF-1R no tecido mamário em relação as cabras controle. Com isso, a redução dos sinais de sobrevivência podem conduzir ao aumento da apoptose e portanto, acelerar o processo de regressão do tecido mamário das cabras. Além disso, o cortisol pode utilizar diversas vias metabólicas para modular a apoptose nas células epiteliais mamárias (BOMFIM et al., 2018) e em outras células (FENG; FAMUYIDE; BHATT, 2013). No entanto, ainda não se conhece como o cortisol modula a apoptose nas células epiteliais mamárias durante a involução do tecido mamário. Em estudo recente, observamos que a longa exposição das células epiteliais mamárias ao cortisol, *in vitro*, aumentou a expressão de IGF1-R no pico de lactação de cabras Saanen, mas também induziu a clivagem de proteínas pro-apoptóticas (BOMFIM et al., 2018).

Contudo, a administração de ACTH não apresentou efeito sobre a expressão dos genes relacionados à sobrevivência celular e síntese de proteínas do leite PI3K, Akt e mTOR. Porém, observamos um efeito do período de secagem sobre esses genes. Com isso, a expressão relativa da PI3K apresentou uma diminuição, não significativa, no início do período de secagem. No entanto, foi marcada por um aumento significativo a partir dos 30 dias do período seco, em ambos tratamentos ACTH ou placebo. A PI3K é uma enzima presente na membrana das células epiteliais mamárias, sendo envolvida em diversas vias de sobrevivência celular, bloqueando promotores da apoptose (ZHANG et al., 2018). A partir disso, podemos sugerir três situações: 1) a PI3K sinalizou sobrevivência celular e assim, a glândula mamária das cabras não sofreu

intensa apoptose durante o início da secagem e manteve suas atividades metabólicas reduzidas; 2) a PI3K sinalizou apoptose e assim, as células epiteliais mamárias poderiam estar apresentando maior morte celular; e 3) a PI3K poderia estar iniciando uma remodelação do tecido mamário, principalmente do tecido estromal, onde a PI3K não interfere na via de síntese de proteínas do leite.

No entanto, as enzimas Akt e mTOR foram marcadas por uma significativa diminuição nas suas expressões aos 15 dias do período de secagem. Assim, essa redução na expressão de Akt/mTOR indicou que as células epiteliais mamárias das cabras reduziram suas atividades de síntese de leite e proteínas do leite, as quais foram marcadas principalmente pela queda de LALBA e CSN2 durante o período de secagem. Outros autores não observaram essa redução na expressão relativa de Akt durante os primeiros 8 dias de involução mamária em vacas leiteiras (SINGH et al., 2016). Além disso, a sinalização da via Akt/mTOR pode indicar as taxas de proliferação ou apoptose nas células epiteliais mamárias (MURNEY et al., 2015; SINGH et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Quando induzidas ao processo de secagem, as células epiteliais mamárias podem entrar em um estado quiescente (SINGH et al., 2016; 2017) e assim, não desencadear apoptose durante os primeiros 60 dias do período seco. Esse estado de quiescência permite que as células epiteliais mamárias sobrevivam por um longo período, porém com suas atividade metabólicas reduzidas, podendo retornar às atividades quando estimuladas (ex.: ordenha) (MURNEY et al., 2015; SINGH et al., 2015). Em fato, nossos dados podem explicar, em parte, a persistência leiteira observada anteriormente em cabras (CAJA et al., 2006; SAFAYI et al., 2010). Pois, observamos que as enzimas Akt/mTOR mantiveram suas expressões ao longo dos 15, 30 e 60 dias após a interrupção de ordenha, o que pode levar-nos a considerar que as células epiteliais mamárias das cabras não sofrem extensiva apoptose quando comparada à vacas leiteiras, mas que reduzem suas atividades metabólicas (FOWLER; KNIGHT; FOSTER, 1991; SALAMA et al., 2005; CAJA et al., 2006; SAFAYI et al., 2010; LI et al., 2017).

2.5 CONCLUSÃO

O aumento do cortisol plasmático via administração de ACTH reduziu significativamente a expressão gênica de IGF-1R no tecido mamário das cabras durante o período de secagem. No entanto, não apresentou efeito sobre via PI3K/Akt/mTOR, a qual é responsável pela síntese de leite e proteínas do leite nas células epiteliais mamárias. Contudo, o cortisol melhorou a infiltração de células imunes nas secreções mamárias durante o período

de secagem das cabras Saanen. Nesse estudo, as cabras Saanen apresentaram baixa taxa de reabsorção dos componentes do leite durante o período de secagem quando comparadas a vacas leiteiras e as cabras de alta produção podem não exibirem uma involução completa da glândula mamária. Por fim, mais estudos são necessários para entender como que o cortisol pode modular os mecanismos de involução mamária nas cabras.

REFERÊNCIAS

ATABAI, K.; SHEPPARD, D.; WERB, Z. **Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution.** Journal of mammary gland biology and neoplasia, v. 12, n. 1, p. 37-45, 2007.

BAGNICKA, E. et al. **Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk.** Small Ruminant Research, v. 100, n. 1, p. 72-77, 2011.

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

BEN CHEDLY, H. et al. **The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats.** Animal, v. 7, n. 1, p. 124-133, 2013.

BOMFIM, G. F. et al. **Effect of acute stressors, adrenocorticotrophic hormone administration, and cortisol release on milk yield, the expression of key genes, proliferation, and apoptosis in goat mammary epithelial cells.** Journal of dairy science, v. 101, n. 7, p. 6486-6496, 2018.

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

BOUTINAUD, M. et al. **Cabergoline inhibits prolactin secretion and accelerates involution in dairy cows after dry-off.** Journal of dairy science, v. 99, n. 7, p. 5707-5718, 2016

BROWN, E. J.; VOSLOO, A. **The involvement of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in stress physiology and its significance in the assessment of animal welfare in cattle.** Onderstepoort Journal of Veterinary Research, v. 84, n. 1, p. 1-9, 2017.

BURGOS, S. A.; CANT, J. P. **IGF-1 stimulates protein synthesis by enhanced signaling through mTORC1 in bovine mammary epithelial cells.** Domestic Animal Endocrinology, v. 38, n. 4, p. 211-221, 2010.

CAJA, G.; SALAMA, A. A. K.; SUCH, X. **Omitting the dry-off period negatively affects colostrum and milk yield in dairy goats.** Journal of Dairy Science, v. 89, n. 11, p. 4220-4228, 2006.

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

CAPUCO, A. V. et al. **Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST.** Journal of Dairy Science, v. 84, n. 10, p. 2177-2187, 2001.

CAROPRESE, M. et al. **Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes.** Journal of dairy research, v. 76, n. 1, p. 66-73, 2009.

CAROPRESE, M. et al. **Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune profile, and production performance of dairy ewes.** Journal of dairy science, v. 93, n. 6, p. 2395-2403, 2010.

DAVIS, S. R.; FARR, V. C.; STELWAGEN, K. **Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review.** Livestock production science, v. 59, n. 1, p. 77-94, 1999.

FENG, Y.; FAMUYIDE, M.; BHATT, A. J. **Dexamethasone decreases insulin-like growth factor-I and-II via a glucocorticoid receptor dependent mechanism in developing rat brain.** Neuroendocrinology Letters, v. 34, n. 7, 2013.

FOWLER, P. A.; KNIGHT, C. H.; FOSTER, M. A. **Omitting the dry period between lactations does not reduce subsequent milk production in goats.** Journal of dairy research, v. 58, n. 1, p. 13-19, 1991.

FULKERSON, W. J.; JAMIESON, P. A. **Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic acth or imposition of various stressor agents.** Australian Journal of Biological Sciences, v. 35, n. 2, p. 215-222, 1982.

GAIATO, A. P. R. **Somatic cell count and milk production of Saanen goats stressed via application of ACTH.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 41, n. 5, p. 1236-1242, 2012.

HISS, S.; MEYER, T.; SAUERWEIN, H. **Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation.** Small ruminant research, v. 80, n. 1, p. 87-90, 2008.

HURLEY, W. L. **Mammary-gland function during involution.** Journal of Dairy Science, v. 72, n. 6, p. 1637-1646, 1989.

IP, M. M.; DARCY, K. M. **Three-Dimensional Mammary Primary Culture Model Systems.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 1, n. 1, p. 91-110, 1996.

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

LANCTÔT, S. et al. **Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution.** Journal of dairy science, v. 100, n. 3, p. 2269-2281, 2017.

LEITNER, G. et al. **Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: comparison among cows, goats and sheep.** Veterinary immunology and immunopathology, v. 147, n. 3-4, p. 202-210, 2012.

LI, H. H. et al. **MEN1/Menin regulates milk protein synthesis through mTOR signaling in mammary epithelial cells.** Scientific Reports, v. 7, 2017.

LI, P. et al. **Identification of cell types in the developing goat mammary gland.** Histochemical Journal, v. 31, n. 6, p. 379-393, 1999.

MOLENAAR, A. J. **Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland.** Journal of Dairy Science, v. 79, n. 7, p. 1198-1208, 1996.

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

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

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

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

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of small ruminant: sheep, goats, cervids and New World camelids.** Washington, D.C., 262 p., 2006.

OLIVER, S. P.; SORDILLO, L. M. **Approaches to the manipulation of mammary involution.** Journal of Dairy Science, v. 72, n. 6, p. 1647-1664, 1989.

OLLIER, S.; ZHAO, X.; LACASSE, P. **Effects of feed restriction and prolactin-release inhibition at drying off on metabolism and mammary gland involution in cows.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 8, p. 4942-4954, 2014.

OLLIER, S. et al. **Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or a glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 12, p. 9949-9961, 2016.

PERUZZI, F. et al. **Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis.** Molecular and cellular biology, v. 19, n. 10, p. 7203-7215, 1999.

- PONCHON, B. et al. **Relationship between glucocorticoids and prolactin during mammary gland stimulation in dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 100, n. 2, p. 1521-1534, 2017.
- RILEY, L. G. **Lactoferrin decreases primary bovine mammary epithelial cell viability and casein expression.** Journal of dairy research, v.75, n. 2, p. 135-141, 2008.
- SAFAYI, S. et al. **Continuous lactation effects on mammary remodeling during late gestation and lactation in dairy goats.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 1, p. 203-217, 2010.
- SAKAMOTO, K. et al. **Growth hormone suppresses the expression of IGFBP-5, and promotes the IGF-I-induced phosphorylation of Akt in bovine mammary epithelial cells.** Domestic Animal Endocrinology, v. 32, n. 4, p. 260-272, 2007.
- SALAMA, A. A. K. et al. **Effect of pregnancy and extended lactation on milk production in dairy goats milked once daily.** Journal of dairy science, v. 88, n. 11, p. 3894-3904, 2005.
- SAS Institute. **SAS/STAT; user's guide, version 9.2.** SAS Inst., Inc. Cary, 2008.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. **Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method.** Nature protocols, v. 3, n. 6, p. 1101, 2008.
- SHAMAY, A. et al. **Effect of dexamethasone on milk yield and composition in dairy cows. In: Annales de zootechnie.** EDP Sciences, v. 49, n. 4, p. 343-352, 2000.
- SILANIKOVE, N. et al. **Early mammary gland metabolic and immune responses during natural-like and forceful drying-off in high-yielding dairy cows.** Journal of dairy science, v. 96, n. 10, p. 6400-6411, 2013.
- SINGH, K. et al. **cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland.** Journal of Dairy Science, v. 91, n. 6, p. 2236-2246, 2008.
- SINGH, K. et al. **The effect of milking reinitiation following extended nonmilking periods on lactation in primiparous dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 98, n. 11, p. 7666-7674, 2015.
- SINGH, K. et al. **Cell survival signaling in the bovine mammary gland during the transition from lactation to involution.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 9, p. 7523-7543, 2016.
- SINGH, K. et al. **Temporal and spatial heterogeneity in milk and immune-related gene expression during mammary gland involution in dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 100, n. 9, p. 7669-7685, 2017.
- STEFANON, B. et al. **Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals.** Journal of Dairy Research, v. 69, n. 1, p. 37-52, 2002.
- STELWAGEN, K. et al. **Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats.** Journal of Dairy Science, v. 77, n. 2, p. 426-432, 1994.

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

TATARCZUCH, L. et al. **Phagocytic capacity of leucocytes in sheep mammary secretions following weaning.** Journal of anatomy, v. 201, n. 5, p. 351-361, 2002.

WILDE, J.; KNIGHT, H; FLINT, J. **Control of Milk Secretion and Apoptosis During Mammary Involution.** Journal of mammary gland biology and neoplasia, v. 4, n. 2, p. 129-136, 1999.

ZHANG, T. et al. **Akt Serine/Threonine Kinase 1 Regulates De Novo Fatty Acid Synthesis through mTOR/SREBP1 Axis in Dairy Goat Mammary Epithelial Cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 66, n. 5, p. 1197-1205, 2018

ZOBEL, G. et al. **Invited review: Cessation of lactation: Effects on animal welfare.** Journal of dairy science, v. 98, n. 12, p. 8263-8277, 2015.

ZOBEL, G. et al. **Gradual cessation of milking reduces milk leakage and motivation to be milked in dairy cows at dry-off.** Journal of Dairy Science, v. 96, n. 8, p. 5064-5071, 2013.

3. TEMPERATURA POR INFRAVERMELHO COMO FERRAMENTA PARA DETECTAR MUDANÇAS NA TEMPERATURA SUPERFICIAL DO ÚBERE DE CABRAS SAANEN DURANTE O PERÍODO DE SECAGEM.

RESUMO

O risco de adquirir novas infecções intramamárias aumenta durante o início do período seco, devido ao acúmulo de leite na glândula mamária, aumento da pressão intramamária, que pode ocasionar a abertura do canal do teto e favorecer a entrada de microrganismos patógenos. A termografia por infravermelho (TIV) tem demonstrado resultados satisfatórios nas alterações das temperaturas superficiais, em resposta a contaminações intramamárias. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi determinar a temperaturas superficial do úbere e ocular através da TIV e relaciona-las com a contagem de células somáticas e células imunes durante o início do período de secagem de cabras Saanen. Assim, nesse estudo foram utilizadas 30 cabras Saanen, agrupadas em cabras saudáveis (teste bacteriológico negativo) e cabras contaminadas (teste bacteriológico positivo com > 5 UFC/mL). Assim, os dados foram colhidos no dia 0 (24 horas após a interrupção de ordenha) e no dia 15 após a secagem. O período de secagem nas cabras Saanen promoveu uma diminuição significativa na temperatura média e máxima do úbere, bem como na temperatura ocular e retal. Assim, as temperaturas por TIV demonstraram, claramente, as diferenças conforme o status de saúde do úbere das cabras Saanen. As cabras saudáveis apresentaram a menor temperatura superficial, enquanto que aquelas contaminadas apresentaram as temperaturas mais elevadas. A CCS total foi correlacionada negativamente com a TIV do úbere. E, a maior presença de células imunes foi observada nas cabras contaminadas. Por fim, a TIV demonstrou ser uma boa ferramenta para detectar as mudanças nas temperaturas superficiais do úbere e ocular das cabras Saanen. No entanto, mais estudos são necessários para aperfeiçoar a técnica e torna-la acessível em fazendas.

Palavras-chave: bacteriologia. CCS. Involução mamária. TIV.

USING THE INFRARED TEMPERATURE AS A TOOL TO DETECT INFECTIOUS PROCESSES IN THE MAMMARY GLAND OF SAANEN GOATS DURING THE BEGINNING OF THE DRYING PERIOD.

ABSTRACT

The risk of acquiring new intramammary infections increases during the beginning of the dry period due to the accumulation of milk in the udder, intramammary increased pressure, which may cause the opening of the teat canal and favor the entry of pathogenic microorganisms. Infrared thermography (IRT) has shown satisfactory results in changes in surface temperatures in response to intramammary contaminations. In this context, the aim of this study was to determine the surface temperatures of the udder and eye through the TIV and relates them to count somatic cells and immune cells during early drying period Saanen goats. Thus, in this study we used 30 Saanen goats grouped in 1) healthy goats (negative bacteriological test) and 2) goats infected (positive bacteriological test > 5 CFU / mL). Thus, the data were collected on day 0 (24 hours after the interruption of milking) and on day 15 after drying. The drying period in the Saanen goats promoted a significant decrease in mean and maximum udder temperature, as well as ocular and rectal temperatures. Thus, temperatures by IRT clearly demonstrated the differences according to the udder health status of the Saanen goats. The healthy goat's presented the lowest surface temperature, while those contaminated showed the highest temperatures. Total CCS was negatively correlated with udder IRT. The greater presence of immune cells was observed in the contaminated goats. Finally, IRT proved to be a good tool for detecting changes in the surface temperatures of the udder and eyepiece of Saanen goats. However, more studies are needed to perfect the technique and make it accessible on farms.

Key words: Bacteriology. IRT. Mammary involution. SCC.

3.1 INTRODUÇÃO

O período seco é essencial para a remodelação do tecido mamário, garantindo a renovação das células epiteliais mamária para a próxima lactação (CAPUCO e AKERS et al., 1999). Assim, a involução mamária é marcada especialmente pela diminuição na síntese de leite, intensa apoptose das células epiteliais mamárias (SINGH et al., 2008) e consecutiva remodelação do tecido mamário (VRIES et al., 2010).

Nas horas seguintes à interrupção da ordenha ainda há síntese de leite pelas células epiteliais mamárias, a qual causa um acúmulo de leite na glândula mamária, aumento da pressão intramamária e pode causar a abertura do canal do teto, favorecendo a entrada de microrganismos patógenos (OLIVER; SORDILLO, 1989). Na glândula mamária esses microrganismos encontram ambiente com temperatura e nutrientes apropriados para o seu desenvolvimento (ALBEZIO et al., 2016). Assim, o risco de adquirir novas infecções intramamárias aumenta durante os primeiros dias do período de secagem (LEITNER et al., 2012). Além disso, o período de secagem é caracterizado pelo aumento na contagem de células somáticas (CCS) (OLLIER; ZHAO; LACASSE, 2014). Sendo esse aumento da CCS relacionado a extensa infiltração de leucócitos do sangue para os alvéolos mamários e pela maior taxa de apoptose das células epiteliais mamárias (SINGH et al., 2005). Porém, o maior número de CCS nas secreções mamárias também pode indicar contaminações bacterianas intramamárias (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; LEITNER et al., 2012).

As contaminações bacterianas podem alterar a temperatura superficial do úbere, causando, em caso de mastite crônica, febre (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; MARTINS et al., 2013; METZENER et al., 2014). Além dos problemas causado aos animais, as mastites têm um impacto econômico negativo na produção leiteira. No entanto, o custo financeiro e o tempo de crescimento de bactérias específicas são algumas limitações encontradas na detecção de mastites. Assim, vêm buscando-se por técnicas e métodos mais rápidos e precisos na identificação de mastites. Entre elas, a termografia por infravermelho (TIV) tem demonstrado resultados satisfatórios em detectar as mudanças nas temperaturas superficiais em animais de produção, principalmente por não ser invasiva e possuir boa acurácia (MARTINS et al., 2013; MCMANUS et al., 2016; SALLES et al., 2016; MARTELLO et al., 2016).

A TIV tem sido utilizada para correlacionar as mudanças ocorridas na temperatura superficial da glândula mamária durante os processos inflamatórios (POLAT et al., 2010; ALEJANDRO et al., 2014; METZENER et al., 2014; SALLES et al., 2016). Pois, as condições térmicas em tecidos e órgãos são influenciadas por flutuações na taxa de suprimento sanguíneo,

o que permite a observação de atividades dentro de regiões de interesse (MATZNER et al., 2014). Além disso, a TIV da área ocular apresenta uma alta correlação com a temperatura superficial do úbere e temperatura retal (METZENER et al., 2014, HOOPER et al., 2018). Até o momento, nenhum trabalho foi conduzido durante o período de secagem em cabras leiteiras (CARUOLO; JARMAN; DICKEY, 1990; ALEJANDRO et al., 2014). Assim, o objetivo desse estudo foi analisar a TIV como um método para estimar a temperatura superficial do úbere das cabras durante o período de secagem, correlacionando-a com a CCS e leucócitos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado e protocolado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP). O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal, no Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP em Pirassununga, São Paulo, Brasil (na latitude 21° 57' 02" S, longitude 47° 27' 50" W). O clima predominante é subtropical, com temperatura média anual de 23°C e umidade média de 73%, a estação chuvosa é predominante nos meses de novembro à março (com média anual variando de 1.300 a 2.000 mm). Esse estudo foi conduzido no mês de março.

3.2.1 Animais, dieta e manejo antes da secagem

Antes do experimento, todas as cabras permaneceram semiconfinadas em baias coletivas parcialmente cobertas com acesso livre a comedouros, bebedouros e sal mineral. A alimentação foi composta por 60% de volumoso e 40% de concentrado conforme as exigências nutricionais ao longo da lactação (NRC, 2006). Após o parto a ordenha foi realizada diariamente, uma vez ao dia, sendo a máquina de ordenha regulada para manter um nível de vácuo de 48 KPa e taxa de pulsação de 120 ciclos/min.

3.2.2 Experimento

Para o experimento utilizou-se 30 cabras da raça Saanen, lactantes e não gestantes. As quais foram submetidas à secagem abrupta aos 259 ± 8 dias de lactação. Assim, na última ordenha, as cabras receberam um antibiótico intramamário (Mastifin® Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) como medida preventiva às infecções intramamárias.

Durante o experimento, o manejo alimentar das cabras seguiu da restrição ao fornecimento de silagem e concentrado 3 dias antes da data de secagem e permaneceu durante os 15 dias após a secagem. Nesse período os animais permaneceram em piquetes de pastagem contendo grama tifton de boa qualidade e quantidade, das 8 às 16h, com acesso livre à sombra e água. Após, as cabras eram conduzidas para as baias coletivas onde tinham acesso livre ao sal mineral e água.

Após a secagem, no dia 0 (24 horas após a interrupção da ordenha) e no dia 15, às 7h da manhã foram realizadas as coletas das secreções mamárias, temperatura retal e imagens termográficas do úbere e ocular. Assim, as cabras permaneceram em posição ortostática para a realização das imagens termográficas. A amostragem seguiu a seguinte ordem: (1) cuidadosamente cada cabra foi contida para a captura da imagem termográfica; (2) as imagens termográficas do úbere foram realizadas a cerca de 1m de distância da porção caudal, abrangendo todo ligamento suspensório e medial do úbere; (3) as imagens ocular foram realizadas do olho direito da cabra com cerca de 0,5m de distância do globo ocular; (4) medição da temperatura retal, com termômetro digital; (5) a cabra retornava cuidadosamente para a baia coletiva. Em seguida, as cabras experimentais foram conduzidas até a sala de ordenha. Na linha de ordenha (12 animais, por vez), foram coletadas amostras das secreções mamárias para análises da composição química, contagem de células somáticas (CCS) e testes bacteriológicos.

Para a execução do experimento, os manejadores foram treinados anteriormente para conduzir as cabras. E, todo manejo foi conduzido na sombra e com livre acesso a água.

3.2.3 Composição, testes bacteriológicos e contagem de células somáticas das secreções mamárias

As amostras das secreções mamárias foram obtidas através do seguinte procedimento: assepsia dos tetos com solução pré-dipping; secagem com papel toalha; assepsia com álcool 70%; secagem com papel toalha e descarte dos primeiros três jatos. Inicialmente, para os testes bacteriológicos foram coletados 10mL das secreções mamárias em tubos estéreis e 50mL para a composição química e CCS. As amostras das secreções mamárias foram rapidamente processadas após a colheita. Então, o percentual de gordura, lactose, proteína e extrato seco foram determinadas por equipamento infravermelho (*Milkoscope Expert Automatic*). Além disso, foram analisadas as concentrações de lactoferrina (LF) nas secreções mamárias através do kit *Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set* (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Para a análise dos testes bacteriológicos, 100µL das secreções mamárias foram semeadas pelo método de esfregaço com alça de *Drigalski* em três meios de cultura bacteriana; Contagem Total de Bactérias (*Plate Count Agar*, PCA), contagem de Estafilococos (*Baird Parker Agar*, BP) e contagem de Enterobactérias (*McConkey Agar*). Após, as amostras foram incubadas aerobiamente à temperatura de 37°C por 48 horas. Então, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das culturas através de um contador de colônias manual (*Phoenix Luterco CP-608*, Araraquara, SP, Brasil).

Para a análise de CCS, 10µL das secreções mamárias foram esfregadas em lâminas silanizadas sobre uma área de 1cm² (em duplicata) e secadas em temperatura ambiente. Posteriormente foram submetidas ao fixador de *Carnoy's*; hidratadas com álcool etílico e água destilada; coradas com Verde de metila e pironina Y (PYMG) e novamente imersas em álcool e água. Para a contagem, utilizou-se microscópio óptico com objetiva de imersão. Assim, foram contados 100 campos de cada esfregaço e o resultado foi determinado pela fórmula:

$$\text{Nº de células/mL} = \frac{\text{Total de células em 100 campos} \times \text{Fator microscópio}}{100}$$

O percentual de leucócitos nas secreções mamárias foi realizado através da contagem de 100 células imunes na lâmina silanizada em microscópio óptico com objetiva de imersão. As quais foram diferenciadas em basófilos, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos.

3.2.4 Imagens termográficas

Para a realização das imagens termográficas utilizou-se uma câmera termográfica Testo® 875-2i (Milbourne, Victoria, AU), com sensibilidade térmica de < 50mK a + 30 °C; emissividade de 0,98 com acurácia de ± 2 °C; 33 Hz de frequência; detector de 320 x 240 píxeles; temperatura média de medição de -30 °C a 500 °C. As imagens termograficas foram analisadas no *software* Testo IRSof 4.4 (Milbourne, Victoria, AU) e as variáveis climáticas de temperatura ambiental e umidade relativa (Tabela 1) foram ajustadas no IRSof.

Tabela 1. Variáveis climáticas no dia 0 e 15 ajustadas para a análise das imagens termográficas do úbere e ocular das cabras experimentais¹.

Variável climática	D 0			D 15		
	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín
Temperatura ambiental	24,9 ± 0,3	27,7	21,7	21,0 ± 0,3	24,1	17,2
Temperatura máxima	24,9 ± 0,3	21,9	27,7	21,0 ± 0,3	24,1	17,2
Temperatura mínima	24,7 ± 0,3	27,4	21,7	20,8 ± 0,3	23,9	17,0
Umidade relativa ²	67,5 ± 2,07	77,0	36,0	72,7 ± 0,8	78,0	64,0
ITU	73,6 ± 0,6	78,1	66,6	68,0 ± 0,6	71,9	62,0

¹A termografia foi realizada entre às 7 e 9h da manhã.

²Valores expressos em %.

No *software* IRSoft, foi utilizada uma foto do úbere e uma foto ocular. Assim, para determinar as temperaturas máximas e médias das imagens termográficas realizou-se um retângulo no úbere das cabras (Figura 1) (HOOPER et al., 2018); para as imagens oculares, uma área circular foi traçada abrangendo toda área ocular do olho direito das cabras (Figura 2), nessa foto apenas a temperatura máxima foi determinada através do comando *hot spot* do IRSoft.

Além disso, as imagens que apresentaram alguma alteração (como, urina) foram descartadas das análises. Todas imagens termográficas foram realizadas por uma única pessoa, a qual foi treinada anteriormente para essa atividade.

Figura 1. Definição geométrica para a análise da imagem por termografia do úbere das cabras Saanen.

Figura 2. Definição circular para a análise da imagem por termografia superficial do olho direito das cabras Saanen.

3.2.5 Agrupamentos

Para analisar os dados, as cabras foram divididas em dois grupos conforme os resultados dos testes bacteriológicos, assim: 1) grupo de cabras saudáveis, quando o teste bacteriológico foi negativo (< 5 UFC/mL), e 2) grupo de cabras contaminadas, quando o teste bacteriológico foi positivo (> 5 UFC/mL).

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS, 2008). Assim, a normalidade dos dados foi confirmada usando o teste *Shapiro-Wilk*. Após, os resultados das

temperaturas do úbere, temperatura ocular, temperatura retal e componentes do leite foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS. No modelo foi considerado como efeito fixo o grupo (saudável ou contaminada); e como efeito aleatório, os animais.

A relação entre as temperatura do úbere, ocular e retal, componentes do leite, CCS total, CCS diferencial foram estimadas pela correlação de Pearson através do procedimento CORR do SAS. Para as variáveis CCS total e temperatura média e máxima do úbere foi realizado a análise de regressão linear simples através do procedimento REG do SAS.

Nas tabelas os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão e as figuras são apresentadas com o modelo e o R^2 . Assim, quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas usando o teste de Fisher. Foi definido como significativo $p \leq 0,05$.

3.3 RESULTADOS

Quando as cabras experimentais foram categorizadas em dois grupos, saudáveis e contaminadas, essas caracterizavam em 51,6% como saudáveis (< 5 UFC/mL) e 48,3% como contaminadas (≥ 5 UFC/mL). Não houve nenhum crescimento bacteriano em meio *McConkey Agar*. Durante o estudo nenhuma cabra apresentou sintomas clínicos de mastites ou alterações físicas das secreções mamárias que poderiam indicar a presença de mastite crônica.

Portanto, observamos um efeito significativo do dia após a secagem na temperatura por infravermelho ocular (TO) e temperatura retal (TR) (Figura 3 e 4). Assim, o dia 0 apresentou as temperaturas mais elevadas em ambos grupos (saudáveis e contaminadas) em relação ao dia 15 após a secagem. No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo de cabras saudáveis e contaminadas para TO e TR.

Figura 3. Temperatura média ocular realizada por TIV (n = 30).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Figura 3. Temperatura média retal realizada com termômetro digital (n = 30).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Uma correlação alta e significativa ($r = 0,77$; $p < 0,0001$) foi observada entre a TO e TR durante o início período de secagem das cabras Saanen (Figura 4).

Figura 4. Relação entre a temperatura retal e a temperatura ocular por TIV durante o período de secagem das cabras Saanen (n = 30).

A temperatura por infravermelho do úbere (TU) foi demonstrada em temperaturas médias e máximas (Figura 5 e 6). A temperatura mínima foi excluída do estudo devido à grande variabilidade dos dados. Então, os dias após a secagem promoveram uma diminuição significativa de 4,7 °C ($p < 0,0001$) na temperatura média do úbere (Figura 5), seguindo o mesmo padrão da TO e TR.

Figura 5. Temperatura média por TIV do úbere das cabras Saanen durante o início do processo de secagem (n = 30).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

A temperatura máxima por infravermelho do úbere (TMU) das cabras Saanen seguiu a TU (Figura 6). Desse modo, houve uma diferença significativa para os dias após a secagem, onde o dia 0 apresentou a maior temperatura máxima, e o dia 15 uma redução de 3,3 °C ($p < 0,0001$) (Figura 6).

Figura 6. Temperatura máxima por TIV do úbere das cabras Saanen durante o início do processo de secagem (n = 30).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Para a CCS total observamos que houve diferença significativa ($p < 0,01$). O maior valor foi observado nas cabras contaminadas, em relação às cabras saudáveis (Figura 7). Nesse estudo, valores superiores a 1.000.000 células/mL na CCS total foram esperados, devido à interrupção de ordenha e consequentemente maior apoptose das células epiteliais mamárias.

Figura 7. Contagem de células somáticas total (células/mL) das secreções mamárias dos grupos de cabras saudáveis e contaminadas (n = 30).

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão ($p \leq 0,05$).

A maior CCS total nas cabras contaminadas também refletiu no aumento da CCS diferencial (infiltração de células imunes). Assim, observamos diferença significativa entre os grupos de cabras saudáveis e contaminadas (Tabela 2). O grupo de cabras contaminadas apresentou maior número de eosinófilos e linfócitos. E, ao contrário, houve uma diminuição significativa de neutrófilos, em relação às cabras saudáveis (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de células imunes em relação ao grupo de cabras saudável e contaminada durante o período inicial da secagem.

CCS diferencial (%)	Grupo		<i>p</i>
	Saudável	Contaminada	
Basófilos	2,21 ± 0,22	2,26 ± 0,18	0,84
Eosinófilos	4,75 ± 0,23	5,48 ± 0,20	0,01
Linfócitos	28,24 ± 0,71	30,34 ± 0,61	0,02
Macrófagos	6,08 ± 0,28	5,74 ± 0,24	0,34
Neutrófilos	57,74 ± 0,57	55,56 ± 0,48	0,004

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão ($p \leq 0,05$).

Em relação a TU e TMU e os grupos de cabras saudáveis e contaminadas, a TU apresentou aumento de 1,7 °C ($p < 0,001$) no grupo contaminado (Figura 8). Do mesmo modo, a TMU foi 1,4 °C maior no grupo de cabras contaminadas (Figura 9).

Figura 8. Temperatura média por infravermelho do úbere conforme a classificação das cabras em saudável e contaminadas (n = 30).

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão ($p \leq 0,05$).

Figura 9. Temperatura máxima por infravermelho do úbere conforme a classificação das cabras em saudável e contaminadas (n = 30).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

A composição das secreções mamárias durante o período inicial da secagem das cabras Saanen está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Componentes do leite de acordo com a classificação das cabras em saudáveis e contaminadas durante o período inicial da secagem.

Item	Grupo		<i>p</i>
	Saudável	Contaminada	
Lactoferrina (ng/mL)	1,70 $\pm$ 0,13	2,09 $\pm$ 0,12	0,03
Gordura (%)	3,74 $\pm$ 0,11	3,12 $\pm$ 0,09	< 0,0001
Proteína (%)	3,21 $\pm$ 0,04	3,29 $\pm$ 0,04	0,23
Lactose (%)	4,37 $\pm$ 0,07	4,49 $\pm$ 0,06	0,22
Extrato seco (%)	8,35 $\pm$ 0,18	8,13 $\pm$ 0,16	0,37

*Produção de leite média durante a lactação.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($p \leq 0,05$).

Observamos que a porcentagem de gordura foi significativamente maior nas cabras saudáveis. E, os demais componentes proteína, lactose e extrato seco não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo de cabras saudáveis e contaminadas. O grupo de

cabras contaminadas teve a maior concentração de lactoferrina (23% mais alta), em relação ao grupo de cabras saudáveis.

Analisando as correlações de Pearson entre as variáveis da TIV (Tabela 4), observamos que as mais altas correlações foram visualizadas entre a TU/TMU com a TO e TR. As correlações mais baixas ($r = -0,01$ a $-0,25$) foram observadas entre a TIV e os componentes das secreções mamárias. Correlações negativas e significativas ocorreram entre a TIV e eosinófilos e basófilos. Ao contrário, houve correlação positiva ($p < 0,0001$) com linfócitos.

As correlações entre a CCS total e CCS diferencial apresentaram variações durante o início do período de secagem das cabras Saanen (Tabela 4). A correlação mais alta e positiva foi observada entre a CCS total e eosinófilos e basófilos ($r = 0,51$; $p < 0,0001$). Para as células diferenciais, a mais alta correlação e negativa foi visualizada entre neutrófilos e linfócitos ($r = -0,79$; $p < 0,0001$), seguido de eosinófilos e linfócitos ($r = -0,47$; $p < 0,0001$), e correlação positiva entre eosinófilos e basófilos ($r = 0,46$; $p < 0,0001$).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis de temperaturas médias e das secreções mamárias durante o início do período de secagem das cabras Saanen (n = 30).

Item	TO	TR	TU	TMU	GORD	PROT	LACT	EXTSEC	LF	CCS	EOS	BAS	NEUT	LINF	MAC
TO	1,00	0,76 <,0001	0,80 <,0001	0,82 <,0001	-0,08 0,38	-0,25 0,008	-0,25 0,007	-0,16 0,09	0,06 0,54	-0,51 <,0001	-0,50 <,0001	-0,52 <,0001	-0,11 0,28	0,45 <,0001	-0,15 0,13
TR		1,00	0,71 <,0001	0,76 <,0001	-0,01 0,91	-0,12 0,19	-0,12 0,19	-0,13 0,17	0,08 0,38	-0,41 <,0001	-0,49 <,0001	-0,52 <,0001	-0,05 0,62	0,39 <,0001	-0,11 0,22
TU			1,00	0,98 <,0001	-0,02 0,79	-0,19 0,04	-0,19 0,04	-0,17 0,07	0,07 0,48	-0,60 <,0001	-0,52 <,0001	-0,60 <,0001	-0,09 0,32	0,48 <,0001	-0,19 0,05
TMU				1,00	-0,02 0,78	-0,19 0,03	-0,20 0,02	-0,13 0,14	0,09 0,32	-0,57 <,0001	-0,55 <,0001	-0,62 <,0001	-0,10 0,27	0,49 <,0001	-0,14 0,12
GORD					1,00	0,69 <,0001	0,69 <,0001	0,21 0,02	-0,09 0,35	0,13 0,17	0,04 0,66	0,15 0,10	-0,07 0,43	0,02 0,86	0,01 0,89
PROT						1,00	1,00 <,0001	0,32 0,00	0,02 0,81	0,41 <,0001	0,32 0,00	0,30 0,00	-0,12 0,21	-0,06 0,52	-0,08 0,40
LACT							1,00	0,31 0,00	0,02 0,81	0,41 <,0001	0,33 0,00	0,30 0,00	-0,12 0,21	-0,06 0,51	-0,08 0,40
EXTSEC								1,00	-0,12 0,19	0,45 <,0001	0,16 0,08	0,22 0,02	-0,11 0,24	-0,07 0,45	0,21 0,02
LF									1,00	-0,09 0,33	-0,15 0,12	-0,01 0,89	-0,18 0,05	0,20 0,04	-0,09 0,37
CCS										1,00	0,51 <,0001	0,51 <,0001	-0,05 0,60	-0,33 0,001	0,19 0,04
EOS											1,00	0,46 <,0001	-0,03 0,75	-0,47 <,0001	0,08 0,40
BAS												1,00	-0,13 0,15	-0,31 0,00	0,02 0,85
NEUT													1,00	-0,79 <,0001	-0,12 0,18
LINF														1,00	-0,22 0,02
MAC															1,00

Legenda: temperatura ocular (TO); temperatura retal (TR); temperatura úbere (TU); cortisol (CORT); produção de leite (PL); gordura (GORD); proteína (PROT); lactose (LACT); extrato seco (EXTSEC); lactoferrina (LF); contagem de células somáticas (CCS); eosinófilos (EOS); basófilos (BAS); neutrófilos (NEUT); linfócitos (LINF); macrófagos (MAC).

Figura 9. Regressão linear entre a temperatura média do úbere e a CCS total nas secreções mamárias das cabras Saanen.

Figura 10. Regressão linear entre a temperatura máxima do úbere e a CCS total nas secreções mamárias das cabras Saanen.

3.4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, a TR, TO, TU e TMU foram significativamente maiores no dia 0 após a secagem. A TR é um bom indicativo para estimar as alterações fisiológicas nas cabras (RIBEIRO et al., 2016). A maior TR no dia 0 pode estar associada às mudanças no manejo do período seco das cabras e alterando os comportamentos rotineiros, como a interrupção da ordenha e a restrição alimentar parcial. No entanto, a TR apresentou valores normais para caprinos em ambos dias 0 e 15 após a secagem (RIBEIRO et al., 2016). A TO seguiu o mesmo padrão observado para TR, além disso apresentou uma correlação alta e significativa com a TR ($r = 0,76$), sendo uma ótima mensuração para estimar a temperatura corporal (MARTELLO et al., 2016; HOOPER et al., 2018). É importante considerar que as coletas de temperaturas das cabras foram realizadas no período da manhã, quando o ITU apresentava condições adequadas para as cabras e portanto sem estresse térmico. Outros autores observaram alterações na TO em resposta ao estresse agudo, onde o maior fluxo sanguíneo relacionou-se com a atividade simpática do estresse (STEWART et al., 2008).

A saúde da glândula mamária aos animais leiteiros tem grande importância para a produção leiteira, especialmente durante o período seco. Nesse estudo, a TU e TMU apresentaram correlação alta com a TR ($r = 0,71$ e $0,76$) e TO ($r = 0,80$ e $0,82$), respectivamente. A maior TU e TMU também foi observada no dia 0 ($35,6$ e $36,4$ °C) em relação ao dia 15 ($30,9$ e $33,1$ °C). A maior temperatura superficial da pele do úbere está relacionada com a atividade secretória da glândula mamária nas horas seguintes após a secagem, consequentemente maior fluxo sanguíneo subjacente e metabolismo do tecido (POLAT et al., 2010). A redução na TU e TMU aos 15 dias após a secagem pode ser associada com a diminuição do metabolismo das células epiteliais mamárias, marcado especialmente pela desregulação na síntese de leite, proteínas do leite, aumento na infiltração de células imunes, e maior apoptose (BAGNICKA et al., 2011; BEN CHEDLY et al., 2013). Em fato, a TIV tem sido uma ótima ferramenta em detectar alterações nas temperaturas superficiais do úbere causadas por inflamações e infecções mamárias (BERRY et al., 2003; MATZNER et al., 2014; SALLES et al., 2016).

Durante o início do período de secagem as secreções mamárias no úbere oferecem uma fonte rica em nutrientes e com temperatura adequada para o desenvolvimento de microrganismos patógenos (ALBEZIO et al., 2016). Nesse estudo, realizamos testes bacteriológicos para detectar a contaminação microbiana nas secreções mamárias das cabras experimentais. Com isso, as cabras detectadas como contaminadas apresentaram um aumento de $49,4\%$ na CCS total em relação as cabras saudáveis. Tal como, a maior presença de

leucócitos também foi observada nas cabras contaminadas. Assim, em resposta ao processo inflamatório inicial houve aumento na TU/TMU nas cabras contaminadas (POLAT et al., 2010; METZNER et al., 2014). Porém, quando relacionadas, a correlação entre a CCS total e a TU/TMU foi negativa ($r = -0,60$ e $-0,57$, respectivamente). O período inicial de secagem causou intensa apoptose das células epiteliais mamárias nas cabras experimentais, o que excedeu a CCS >400.000 células/mL, menor fluxo de sangue direcionada para a glândula mamária e consequentemente a menor temperatura superficial. A maior CCS observada em ovelhas com mastite clínica também apresentou menor temperatura superficial do úbere (MARTINS et al., 2013). Em nosso estudo nenhuma cabra apresentou sintomas de mastite clínica. De fato, nossos resultados são interessantes, pois detectaram mudanças na TU e TMU quando houve a contaminação microbiana. No entanto, a CCS não foi correlacionada positivamente como na lactação, e assim, essa, deve ser considerada de forma inversa para correlacionar com a TIV durante o período de secagem de cabras leiteiras.

Em relação as células imunes presentes nas secreções mamárias, observamos que durante a involução mamária os neutrófilos foram as células predominantes em ambos grupos de cabras saudáveis e contaminadas (57,7 vs 55,5, respectivamente). Os neutrófilos são a primeira barreira de defesa imunológica contra bactérias patogênicas que contaminam a glândula mamária de cabras e vacas (PAAPE et al., 2007). Durante a lactação, os neutrófilos representam cerca de 31% do total de leucócitos em cabras com mastites (BAGNICKA et al., 2011).

Os linfócitos foram significativamente maior no grupo de cabras contaminadas (28,2%) em relação ao grupo de cabras saudáveis (30,3%). Esse valor é extremamente maior daquele observado por Bagnicka et al. (2011) de 1,81 a 2,09% durante a lactação de cabras. No entanto, Ying et al. (2002) demonstraram que os linfócitos podem representar de 9 a 39% dos leucócitos no início da lactação e de 11 a 37% no final da lactação. Assim, as subpopulações de linfócitos T desempenham um papel importante na resposta imunológica à processos infecciosos na glândula mamária (PAAPE et al., 2007).

Os eosinófilos foram significativamente menor no grupo de cabras saudáveis em relação as cabras contaminadas (4,75 vs 5,48, respectivamente). Os eosinófilos são aumentados no leite durante contaminações causadas por bactérias (BAGNICKA et al., 2011). No entanto, em nosso estudo, os eosinófilos também aumentaram em resposta à interrupção de ordenha e, assim, o maior recrutamento de células imunes para auxiliar a remodelação do tecido mamário. As demais células imunes, basófilos e macrófagos, não apresentaram diferença significativa. É importante ressaltar que o número de cada célula imune recrutada do sangue para a glândula

mamária depende da resposta fisiológica individual do animal, bem como as diferenças entre espécies, raça, manejo, período lactacional e região tem sido reportadas (PAAPE et al., 2007; BAGNICKA et al., 2011; LEITNER et al., 2012).

O grupo de cabras contaminadas apresentou o maior valor para lactoferrina (2,09 vs 1,70 ng/mL), assim um aumento de 23% na concentração de lactoferrina em relação ao grupo saudável. Desse modo, a presença de microrganismos na glândula mamária das cabras estimulou a maior síntese de lactoferrina como uma característica de controlar a contaminação. A lactoferrina é uma proteína que apresenta sítio de ligação com o ferro e ação bacteriostática na glândula mamária durante o período seco (MOLENAAR et al., 1996).

Nesse estudo, o teor de gordura das secreções mamárias foi significativamente maior ($p < 0,0001$) no grupo de cabras saudáveis. Ao contrário, MARTINS et al. (2013) observou maior teor de gordura em ovelhas lactantes que estavam desenvolvendo mastites (subclínica e clínica). Alguns autores sugerem que as bactérias causam danos na síntese dos componentes do leite durante um processo infeccioso (PEZESKI et al., 2010; LEITNER et al., 2012). No entanto, esse resultado no teor de gordura pode ser relacionado ao efeito da produção de leite das cabras antes do período de secagem, e não diretamente com o status de saúde do úbere. O maior percentual de gordura visualizado no grupo de cabras saudáveis, que corresponderam também à baixa produção leiteira (dados não apresentados), apresentou menor acúmulo de leite no úbere após a secagem, e consequentemente a maior concentração de gordura. Enquanto que o grupo de cabras contaminadas possuíam a maior produção de leite, e assim maior acúmulo de leite no úbere e portanto, a maior diluição do teor de gordura nas secreções mamárias.

Por fim, nesse estudo, as ferramentas geométricas utilizadas para mensurar a temperatura superficial por TIV do úbere das cabras foram adequadas em detectar as alterações entre os grupos de cabras saudáveis e contaminadas durante o início do período de secagem. No entanto, mais estudos são necessários para aprimorar o uso da TIV durante o período seco e torna-la mais acessível em fazendas leiteiras.

3.5 CONCLUSÃO

A TIV foi significativamente correlacionada com a presença ou não de bactérias nas secreções mamárias durante o início do período de secagem das cabras Saanen. Porém, foi negativamente correlacionada com a CCS total.

REFERÊNCIAS

- ALBENZIO, M. et al. **Effect of stage of lactation on the immune competence of goat mammary gland.** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 5, p. 3889-3895, 2016.
- ALEJANDRO, M. et al. **Infrared thermography as a tool to determine teat tissue changes caused by machine milking in Murciano-Granadina goats.** Livestock Science, v. 160, p. 178-185, 2014.
- CHEDLY, H. B. et al. **The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats.** Animal, v. 7, n. 1, p. 124-133, 2013.
- BERRY, R. J. et al. **Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection.** Canadian journal of animal science, v. 83, n. 4, p. 687-693, 2003.
- BAGNICKA, E. et al. **Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk.** Small Ruminant Research, v. 100, n. 1, p. 72-77, 2011.
- BREAU, W. C.; OLIVER, S. P. **Growth inhibition of environmental mastitis pathogens during physiologic transitions of the bovine mammary gland.** American journal of veterinary research, v. 47, n. 2, p. 218-222, 1986.
- CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. **Mammary involution in dairy animals.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 4, n. 2, p. 137-144, 1999.
- CAROPRESE, M. et al. **Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes.** Journal of dairy research, v. 76, n. 1, p. 66-73, 2009.
- CARUOLO, E. V.; JARMAN, R. F.; DICKEY, D. A. **Milk Temperature in the Claw Piece of the Milking Machine and Mammary Surface Temperature are Predictors of Internal Mammary Temperature in Goats 1.** Journal of Veterinary Medicine Series A, v. 37, n. 1-10, p. 61-67, 1990.
- CHEDLY, H. B. **The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats.** Animal, v. 7, n. 1, p. 124-133, 2013.
- GRUET, P. et al. **Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.
- HOOPEER, H. B. et al. **Acute heat stress induces changes in physiological and cellular responses in Saanen goats.** International journal of biometeorology, p. 1-9, 2018.
- LEITNER, G. et al. **Effects of intra-mammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of**

leukocytes into milk: comparison among cows, goats and sheep. Veterinary immunology and immunopathology, v. 147, n. 3-4, p. 202-210, 2012.

MARTELLO, L. S. et al. **Infrared thermography as a tool to evaluate body surface temperature and its relationship with feed efficiency in Bos indicus cattle in tropical conditions.** International journal of biometeorology, v. 60, n. 1, p. 173-181, 2016.

MARTINS, R. F. S. et al. **Mastitis detection in sheep by infrared thermography.** Research in Veterinary Science, v. 94, n. 3, p. 722-724, 2013.

MCMANUS, C. et al. **Infrared thermography in animal production: An overview.** Computers and Electronics in Agriculture, v. 123, p. 10-16, 2016.

METZNER, M. et al. **Infrared thermography of the udder surface of dairy cattle: Characteristics, methods, and correlation with rectal temperature.** The Veterinary Journal, v. 199, n. 1, p. 57-62, 2014.

MOLENAAR, A. J.; KUYSS, Y. M.; DAVIS, S. R.; WILKINS, R. J.; MEAD, P. E.; TWEEDIE, J. W. **Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland.** Journal of dairy science, v. 79, n.7, p. 1198-1208, 1996.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of small ruminant: sheep, goats, cervids and New World camelids.** Washington, D.C., 262 p., 2006.

OLIVER, S. P.; SORDILLO, L. M. **Approaches to the manipulation of mammary involution.** Journal of Dairy Science, v. 72, n. 6, p. 1647-1664, 1989.

OLLIER, S.; ZHAO, X.; LACASSE, P. **Effects of feed restriction and prolactin-release inhibition at drying off on metabolism and mammary gland involution in cows.** Journal of Dairy Science, v. 97, n. 8, p. 4942-4954, 2014.

OVIEDO-BOYSO, J. et al. **Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis.** Journal of Infection, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.

PAAPE, M. J. et al. **Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts.** Small Ruminant Research, v. 68, n. 1-2, p. 114-125, 2007.

PEZESHKI, A. et al. **An integrated view on how the management of the dry period length of lactating cows could affect mammary biology and defence.** Journal of animal physiology and animal nutrition, v. 94, n. 5, p. e7-e30, 2010.

POLAT, B. et al. **Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 8, p. 3525-3532, 2010.

RIBEIRO, N. et al. **Adaptive profile of Garfagnina goat breed assessed through physiological, haematological, biochemical and hormonal parameters.** Small ruminant research, v. 144, p. 236-241, 2016.

SALLES, M. S. V. et al. **Mapping the body surface temperature of cattle by infrared thermography.** Journal of thermal biology, v. 62, p. 63-69, 2016.

SAS INSTITUTE SAS/STAT. **User's guide**, version 9.2. SAS Inst., Inc., Cary, 2008.

SINGH, K. et al. **Milk accumulation decreases expression of genes involved in cell-extracellular matrix communication and is associated with induction of apoptosis in the bovine mammary gland.** Livestock Production Science, v. 98, n. 1-2, p. 67-78, 2005.

SINGH, K. et al. **cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland.** Journal of Dairy Science, v. 91, n. 6, p. 2236-2246, 2008.

STEWART, M. et al. **Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic.** Physiology & Behavior, v. 93, n. 4-5, p. 789-797, 2008.

VRIES, L. D. et al. **Characterization of mammary stromal remodeling during the dry period.** Journal of Dairy Science, v. 93, n. 6, p. 2433-2443, 2010.

YING, C.; WANG, H.; HSU, J. **Relationship of somatic cell count, physical, chemical and enzymatic properties to the bacterial standard plate count in dairy goat milk.** Livestock Production Science, v. 74, n. 1, p. 63-77, 2002.