

GLÂNDULA MAMÁRIA: DA MORFOLOGIA À EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS E MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO EM CAMUNDONGOS PRIMÍPAROS E MULTÍPAROS NA PRENHEZ E PÓS-PARTO

Palavras-Chave: GLÂNDULA MAMÁRIA, CÂNCER DE MAMA, MULTIPARIDADE, PROGESTERONA, PROLACTINA, ESTROGÊNIO, RELAXINA.

Autores:

FERNANDA SILVA DE OLIVEIRA, IB – UNICAMP

RAFAELA FERRAZ TEIXEIRA, IB – UNICAMP

LIZANDRA MAIA DE SOUSA, IB – UNICAMP

Prof. Dr. SÍLVIO ROBERTO CONSONNI, IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A glândula mamária em camundongos é caracterizada por apresentar um estroma, composto principalmente por tecido adiposo, e um parênquima composto por estruturas lóbulo-alveolares secretoras e uma porção excretora composta por ductos. O parênquima mamário é formado por uma dupla camada celular, sendo a camada interna formada por células epiteliais secretoras e a camada externa formada por células mioepiteliais (1,2).

O desenvolvimento dessa glândula, ao contrário da grande maioria dos órgãos e tecidos, se dá principalmente no período pós-natal, dependendo de diversos fatores como a puberdade e a gravidez (3). Em camundongos, a maturidade sexual em fêmeas promove o alongamento dos ductos e o desenvolvimento dos botões terminais, contendo células progenitoras (4). Após a puberdade, a glândula mamária desses camundongos sofre pequenas variações em relação à variação hormonal que ocorre no ciclo estral, porém, é apenas durante a prenhez que o órgão retomará o crescimento do epitélio mamário (5). Nesse modelo animal, o desenvolvimento da glândula mamária compreende quatro etapas na gestação: rápida proliferação, diferenciação da parte secretora, ativação da parte secretora e lactação. Essas etapas são orquestradas pela variação hormonal que ocorre nesse período, com destaque para a atuação de hormônios como a progesterona, o estrogênio, a prolactina e a relaxina (6).

Após o parto, em camundongos, ocorre a etapa de lactação, em que a glândula mamária realiza a secreção e excreção do leite (7). Esse processo é estimulado pelo movimento de sucção nos mamilos e, quando esse estímulo cessa, é iniciado o processo de involução. A involução consiste em

uma série de eventos de morte celular programada, levando a uma remodelação do tecido mamário e um retorno a um estágio semelhante ao observado no período pré-gestacional, com retorno ao tamanho original do estroma composto principalmente por tecido adiposo e com redução dos alvéolos e ductos (7).

Diversos estudos ressaltam a influência da ocorrência de uma gestação completa na proteção contra o desenvolvimento do câncer de mama, principalmente os subtipos ER+, tanto em humanos quanto em roedores. Essa proteção se mostra mais acentuada quando a gravidez ocorre em indivíduos mais jovens (8,9), além de haver um aumento nessa proteção associada a múltiplas gestações completas (4). A ocorrência de uma gestação antes dos 20 anos de idade em humanos relaciona-se a um menor risco de desenvolvimento de câncer de mama, enquanto uma gestação após os 35 anos aumenta esse risco (10). Quando uma gravidez jovem é associada à multiparidade, é maior o fator de proteção contra a doença, tendo sido observado aumento nessa proteção para cada nascimento (4).

Essa proteção conferida por uma gravidez devido à ocorrência de uma gestação pode estar associada a diversos fatores, tais como mudanças no perfil de expressão de receptores hormonais na glândula mamária, com destaque para a diminuição de células ER+, mudanças hormonais, diferenciação na morfologia do órgão, com redução no número de células progenitoras, entre outros (4). Assim, o entendimento das alterações que ocorrem na glândula mamária durante a gestação pode permitir a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais uma ou múltiplas gestações podem reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de mama.

METODOLOGIA:

Foram obtidos do CEMIB, camundongos fêmeas virgens C57BL/6J jovens (três meses de idade) com massa corporal de 25-30 g e fêmeas constituintes da “matriz reprodutiva” (mínimo 5 partos) com aproximadamente 8 meses de idade, massa corporal de aproximadamente 40 g. Foi oferecida oportunidade de acasalamento para ambos os grupos e o dia, no qual o “plug” vaginal foi encontrado, tornou-se o 1º dia de gestação. Assim, nos dias 12 (D12) e 18 (D18) de prenhez, 3 (3dpp) e 21 (21dpp) dias pós-parto, as glândulas mamárias inguinais de cada animal foram coletadas. Foram utilizados três animais de cada grupo para cada técnica. As amostras foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em solução-tampão de fosfato salino 0,1 M (PBS, pH 7,4), durante 24 h a 4 °C. As amostras de tecido mamário foram desidratadas em bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina (Paraplast Kit embedding, Sigma, St Louis, MO, EUA) a 58 °C. Cortes de 5 a 7 µm foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina. Até o momento, foi realizada a análise imuno-histoquímica do material para imunolocalização dos receptores de hormônio ER-β, relaxina (LGR7) e para o marcador de proliferação Ki-67. As fotomicrografias foram adquiridas em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), utilizando-se câmera digital P6FL PRO (Optika, Itália) e software OPTIKA PROVIEW. A avaliação dos tipos celulares e da organização da matriz extracelular foi realizada de forma qualitativa. A quantificação das imagens de imuno-histoquímica foi feita pela análise de marcação por área no programa QuPath.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Do D12 ao 21dpp, a análise por microscopia de luz do material corado pelo método de Hematoxilina e Eosina revelou um aumento significativo na porção secretora em relação ao estroma adiposo. Em D12, tanto em primíparas quanto em múltiparas, a glândula mamária era formada majoritariamente pelo estroma, contendo algumas estruturas ductais em estado inicial de desenvolvimento. Já em D18, pode-se perceber um maior desenvolvimento da parte secretora em relação a D12, com a formação dos alvéolos, ainda não lactantes. Em 3dpp, a glândula mamária encontra-se em estado de lactação, sendo formada principalmente por ductos e alvéolos lactantes. Por fim, em 21dpp, a porção secretora ainda é dominante, mas é possível perceber a redução no tamanho do lúmen dos alvéolos, com o colapso dessas estruturas, bem como são observados fragmentos celulares, que podem ser associados a eventos de morte celular coincidentes com o fim do período de lactação e início da involução.

Ao se comparar D12 múltiparas às D12 primíparas, foi possível observar que as múltiparas apresentam um maior número de ramificação e desenvolvimento dos alvéolos e ductos. Ainda, a comparação entre os resultados obtidos para primíparas e múltiparas revela uma diferença no estroma desses dois grupos, em que em múltiparas são observados adipócitos maiores em relação às primíparas, fator possivelmente associado à senescência em que as múltiparas se encontram.

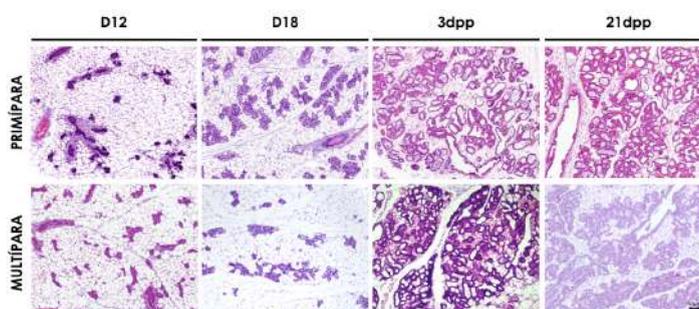


Figura 1 - Fotomicrografias representativas da secção longitudinal da glândula mamária inguinal de camundongos primíparas e múltiparas em D12, D18, 3dpp e 21 dpp coradas com Hematoxilina e Eosina na objetiva de 10x.

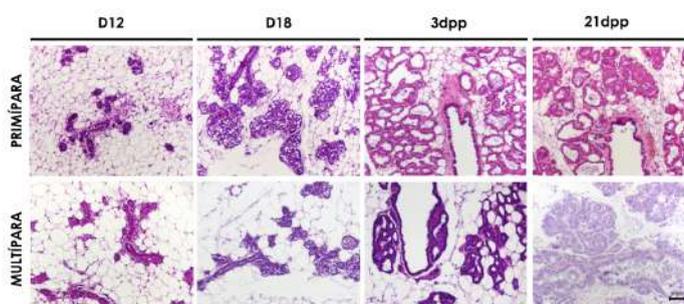


Figura 2 - Fotomicrografias representativas da secção longitudinal da glândula mamária inguinal de camundongos primíparas e múltiparas em D12, D18, 3dpp e 21 dpp coradas com Hematoxilina e Eosina na objetiva de 20x.

A partir da realização da técnica de imuno-histoquímica, foi observada a marcação de células positivas para ER- β e Ki-67, em primíparas e múltiparas, e LGR7 em primíparas. As análises dos resultados de ER- β revelam uma marcação em todos os dias avaliados, nos dois grupos,

principalmente nas células do parênquima mamário e com destaque para o período pós-parto, quando o parênquima é mais presente. Essa marcação concentrou-se principalmente na parte basal das células. A marcação de LGR7 também foi presente em todos os dias analisados em primíparas, mas diferentemente do observado para ER- β , a marcação se deu de maneira mais homogênea por todo citoplasma celular.

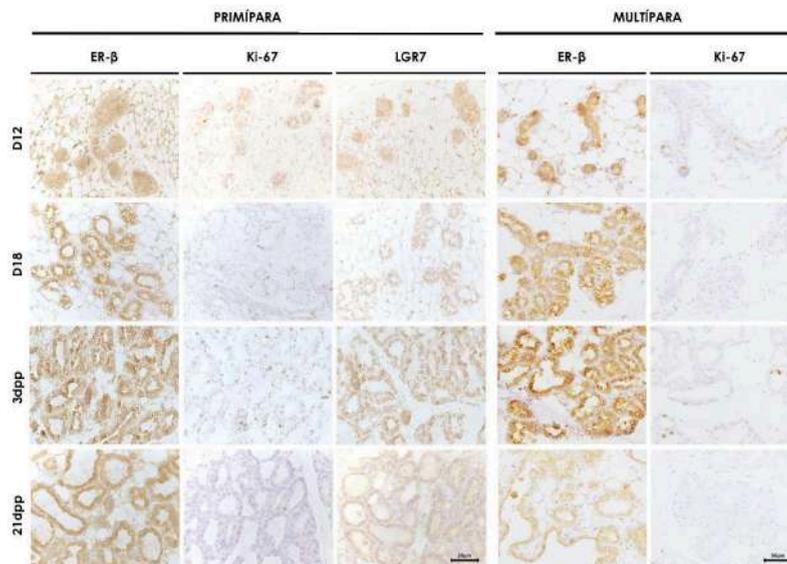


Figura 3 - Fotomicrografias representativas da localização celular do marcador Ki-67 e dos receptores de ER- β e relaxina (LGR7) em secção longitudinal da glândula mamária inguinal de camundongos primíparas em D12, D18, 3dpp e 21 dpp na objetiva de 40x. Imunohistoquímica.

A quantificação das fotomicrografias de imuno-histoquímicas em primíparas permitiu observar que há aumento na marcação de células positivas para ER- β à medida que a gestação avança e no período pós-parto. Foi observado também um pico de células que expressam LGR7 em 3dpp. Em relação ao Ki-67, observou-se um grande número de células marcadas em D12 e 3pp, enquanto o menor valor mostrou-se em 21dpp. As próximas análises de quantificação versarão os demais grupos.

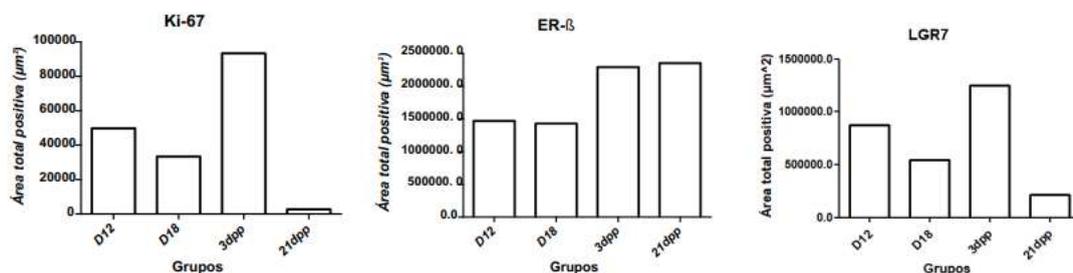


Figura 5 - Representação gráfica da quantificação de área total positiva dos resultados obtidos para as análises de imuno-histoquímica em primíparas.

CONCLUSÕES:

Nossos resultados preliminares revelam que uma gestação tanto em camundongos fêmeas primíparas quanto multíparas induz o desenvolvimento da glândula para a formação da porção secretora, a partir do crescimento de alvéolos e ductos que, durante a lactação, são responsáveis pela

produção e excreção do leite. A análise de imuno-histoquímica do material revela as alterações no padrão de expressão e de localização dos receptores hormonais que ocorrem na glândula mamária durante uma gestação e no pós-parto em primíparas, reforçando a importância da regulação espaço-temporal desses hormônios para a remodelação tecidual durante esse período. Nas próximas etapas, será realizada a análise de imuno-histoquímica em fêmeas múltiparas. Apesar das alterações morfológicas, de ciclo celular e de expressão de receptores hormonais ocorrerem com sucesso em primíparas e múltiparas, a maior quantidade de alvéolos e de ductos em D12 de fêmeas múltiparas, bem como os resultados preliminares da marcação de Ki-67 corroboram a hipótese de proteção ao desenvolvimento de células cancerígenas, já que a ocorrência de múltiplas gestações leva a um processo de morfogênese e de diferenciação tecidual que se conserva, mesmo após o fim do período de lactação.

Ainda, nas etapas seguintes do trabalho, de forma semelhante ao realizado para o método de Hematoxilina e Eosina, será feita a coloração Tricrômico de Masson para avaliação da remodelação tecidual no estroma da glândula mamária nos grupos de fêmeas primíparas e múltiparas. Ainda, será realizada a imunolocalização de receptores de estrogênio- α , progesterona (PR) e prolactina (PRLR) e a técnica de *whole-mounting* para avaliação morfológica da glândula mamária.

BIBLIOGRAFIA

1. MCMANAMAN, James L.; NEVILLE, Margaret C. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [s. l.], 2003.
2. ARANDA-GUTIERREZ A; DIAZ-PEREZ HM. Histology, Mammary Glands. *StatPearls*, [s. l.], 2024
3. JOSHI, Purna A.; DI GRAPPA, Marco A.; KHOKHA, Rama. Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, [s. l.], v. 23, ed6. 6, 2012.
4. DALL, Genevieve; RISBRIDGER, Gail; BRITT, Kara. Mammary stem cells and parity-induced breast cancer protection- new insights. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, [s. l.], v. 170, 2017.
5. CARDIFF, ROBERT D. et al. Mammary gland. In: *COMPARATIVE anatomy and histology: A mouse rat, and human atlas*. 2. ed. [S. l.: s. n.], 2015. cap. 23.
6. KOMMAGANI, Ramakrishna. Mammary gland morphogenesis and function during pregnancy. In: CROY, B.A et al. *The guide to investigation of mouse pregnancy*. Elsevier mammary: [s. n.], 2014.
7. RICHERT, Monica M. An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 227-241, 2000.
8. TUCKER, Deirdre K et al. The Mammary Gland: An Overview. *Encyclopedia of Reproduction*, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 771-778, 2018.
9. MEIER-ABT, Fabienne; BENTIREN-ALJ, Mohamed. How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends in molecular medicine*, [s. l.], 2014.
10. BRITT, Kara; ASHWORTH, Alan; SMALLEY, Matthew. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, [s. l.], 2017.