

## **Desenvolvimento mamário em novilhas leiteiras: aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no processo**

*Dairy heifer mammary development: physiological and biochemical roles involved in the process*

**Betina J. Lew**

Research Associate Dept. of Environmental Medicine, University of Rochester, Rochester, NY 14642, USA.

Correspondência: [betina\\_lew@urmc.rochester.edu](mailto:betina_lew@urmc.rochester.edu); [betina\\_lew@yahoo.com.br](mailto:betina_lew@yahoo.com.br)

### **Resumo**

A glândula mamária é um órgão único e dinâmico cujo processo de desenvolvimento se inicia na fase embrionária e continua paralelamente às diferentes fases da vida reprodutiva da fêmea. Os fenômenos de proliferação celular, diferenciação e morfogênese que ocorrem durante o desenvolvimento mamário são regulados por proteínas e hormônios circulantes que interagem com moléculas localmente produzidas, fatores de crescimento, fatores de comunicação intercelulares e compostos da matriz extra-celular. Com o intuito de acelerar o início da vida reprodutiva de novilhas leiteiras, pode-se oferecer às mesmas dietas com níveis energéticos altos, no entanto essa conduta pode modificar o desenvolvimento mamário, causando diminuição na futura produção de leite. Os processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos no desenvolvimento mamário ainda não foram totalmente decifrados, e a utilização das modernas tecnologias laboratoriais indica a participação de novas moléculas envolvidas nesse processo, revelando-o ainda mais complexo do que se imaginava.

**Palavras-chave:** fator de crescimento similar à insulina (IGF-1), glândula mamária, leptina, somatotropina.

### **Abstract**

*The mammary gland is a unique and dynamic organ which growth and development processes start in the embryonic life and proceeds in parallel with the different phases of the female reproductive life. The processes of cell proliferation, differentiation and morphogenesis that occur during mammary development are orchestrated by proteins and systemic hormones that locally interact with growth factors, cell-cell communication factors, and extra-cellular matrix components. A higher energy diet can be offered to dairy heifers to achieve an earlier reproductive life, however, it can lead to an impairment in mammary development and decrease in future milk production. The biochemical and physiological processes involved in mammary development still obscure and the development of new laboratorial technologies revealed several novel molecules involved in this much more complex than previously presented process.*

**Keywords:** mammary gland, insulin-like growth factor (IGF-1), leptin, somatotropin.

### **Introdução**

Apesar do aumento da produtividade do leite no Brasil, o atual estágio desse setor encontra-se abaixo do seu potencial (Gomes, 1997). Uma das causas da baixa produtividade de leite no Brasil é a avançada idade ao primeiro parto das novilhas (Deresz, 1992). Tal fato ocasiona atrasos no início da produção leiteira, além de diminuição da taxa de natalidade do rebanho. Isto reduz a taxa de descarte de vacas velhas e/ou de baixo potencial de produção, podendo causar atrasos em programas de melhoramento genético do rebanho e levando esses fatos em conjunto à redução na renda dessa indústria.

Podem-se adotar técnicas nutricionais que forneçam energia extra às novilhas pré-púberes, aumentando, conseqüentemente, o ganho de peso diário das mesmas e possibilitando, assim, uma diminuição na idade ao primeiro parto (Patterson *et al.*, 1992). No entanto, animais submetidos a taxas de ganho de peso superiores a 0,8 kg/dia na fase pré-púbere tendem a apresentar posterior redução na produção de leite (Waldo e Capuco, 1992). Essa redução foi relacionada primeiramente a um acúmulo de gordura no úbere (Swanson, 1960), tendo sido posteriormente postulado que esse tipo de manejo leva a alterações hormonais, que causarão diminuição no desenvolvimento mamário (Sejrsen *et al.*, 1983).

Em novilhas submetidas a taxas de ganho de peso diário elevado, foi observada diminuição nos níveis séricos de somatotropina (Sejrsen *et al.*, 1983; Sejrsen e Purup, 1997), e esse hormônio está diretamente relacionado à mamogênese. A administração de somatotropina bovina recombinante (bST) a novilhas pré-púberes diminuiu a quantidade de gordura no tecido mamário e aumentou a massa de tecido parenquimal (Radcliff *et al.*, 1997). Portanto, a adoção desse tipo de manejo pode atenuar os efeitos deletérios da dieta no desenvolvimento mamário de novilhas em crescimento rápido na fase pré-púbere.

O desenvolvimento e crescimento da glândula mamária é um processo complexo de proliferação celular, diferenciação e morfogênese, regulado por proteínas e hormônios circulantes, que interagem localmente com fatores de crescimento (Cunha e Hom, 1996), fatores de comunicação intercelulares e compostos da matriz extra-celular (Matitashvili *et al.*, 1997).

Diversos experimentos foram conduzidos com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária de novilhas submetidas a ganhos elevados de peso e injeção de bST (Weber *et al.*, 1999; Berry *et al.*, 2001). No entanto, esses mecanismos ainda continuam obscuros e a cada dia novas moléculas são implicadas nos ciclos bioquímicos envolvidos nos mesmos.

### O desenvolvimento mamário na fase pré-púbere

A glândula mamária é um órgão único e dinâmico. A maior parte de seu desenvolvimento ocorre após o nascimento, apresentando mudanças cíclicas durante toda a vida produtiva do animal. Pode-se dividir as fases de desenvolvimento mamário em embrionária, pré-púbere, gestacional, lactante e involução (processo que ocorre ao final da lactação). A glândula mamária apresenta basicamente dois tipos de tecidos: o epitelial ou parênquima mamário e o tecido adiposo ou tecido estromático.

O tecido epitelial é derivado da ectoderme embrionária e, ao nascimento, o parênquima mamário consiste de um sistema de ductos limitado e suportado por um estroma que o circunda. O tecido epitelial de bovinos nessa fase consiste de botões primários e secundários que darão origem à cisterna da glândula e a uma linha de ductos principal delineado por uma camada dupla de epitélio (Anderson, 1978).

Durante os três primeiros meses, o desenvolvimento da glândula é isométrico (ou seja, a taxa de crescimento é proporcional à do corpo). Em roedores, o desenvolvimento da glândula nessa fase é bem delineado; entre três e quatro semanas, os botões terminais reaparecem, sinalizando o início da arborização dos ductos e direcionando a sua extensão ao perímetro do tecido adiposo. Os botões terminais abrangerão, então, células corporais que darão origem ao ducto luminal e a células epiteliais mamárias. Os ductos são mantidos enquanto as células dos botões terminais proliferam, formando o estroma do tecido adiposo (Faulkin e Deome, 1960). Nos ruminantes, esse desenvolvimento é bem menos delineado. Em ovinos, por exemplo, a glândula pré-púbere não exibe botões terminais, e os ductos mamários são circundados por tecido conjuntivo (Akers e Sejrsen, 1998).

O estabelecimento do potencial de produção leiteira de uma vaca é criticamente determinado durante a fase pré-púbere de desenvolvimento (Sejrsen e Purup, 1997). Nessa fase, o desenvolvimento da glândula passa de isométrico a alométrico, ou seja, a taxa de crescimento da glândula é mais rápida que a do corpo do animal. O tecido adiposo (basicamente formado por adipócitos e tecido conjuntivo) e os ductos primários, (compostos do tecido parenquimal, que virá a constituir o sistema secretor da glândula no animal adulto), crescem rapidamente nessa fase. A presença do tecido adiposo é essencial para o desenvolvimento e diferenciação do parenquima (Cunha e Hom, 1996). Ainda nesta fase, as extremidades dos ductos se alongam e crescem em direção ao tecido adiposo. Ductos bem desenvolvidos e arborescentes permitirão melhor desenvolvimento de maior número de células secretoras durante a gestação. Apesar de a maior parte do crescimento mamário dar-se durante a gestação, a formação da rede de ductos durante o primeiro ano de vida determinará a extensão do desenvolvimento lóbulo-alveolar na vida produtiva do animal (Sejrsen e Foldager, 1992).

Da puberdade até a gestação, o desenvolvimento da glândula mamária é bem menos acentuado que nas fases anteriores. Durante o início do período pós-púbere inicial (peri-púbere), a proliferação celular mamária varia de acordo com a fase do ciclo estral. A maior concentração de DNA mamário em ratos ocorre primeiramente durante os três primeiros ciclos estrais e mantém esse nível até a concepção (Sinha e Tucker, 1969). Em geral, o nível máximo de desenvolvimento morfológico da glândula ocorre durante o estro, enquanto o pico mitótico dá-se ao diestro (Imagawa *et al.*, 1994). Em novilhas, a concentração de DNA mamário é maior no estro do que nas outras fases do ciclo (Sinha e Tucker, 1969).

O desenvolvimento mamário mais extenso dá-se com o início da gestação até a concepção, quando a glândula torna-se funcional, ou seja, produtora de leite. No entanto, havendo uma má formação do úbere na fase pré-púbere, com excesso de deposição de gordura e diminuição na quantidade de células epiteliais, a futura produção leiteira do animal poderá ser prejudicada (Sejrsen *et al.*, 2000).

### Controle hormonal sistêmico e local do desenvolvimento mamário

O desenvolvimento e a diferenciação da glândula mamária são governados por hormônios de origem hipofisária e ovarianos, por uma extensa gama de fatores localmente produzidos pelo tecido adiposo e pelo tecido parenquimal (Hovey *et al.*, 1999), além de fatores de comunicação intercelulares e interações entre diferentes células e compostos da matriz extra-celular (Matitashvili *et al.*, 1997). As interações que ocorrem entre esses diferentes fatores tornam ainda maior a complexidade do processo de desenvolvimento desse órgão.

A somatotropina (ST) ou hormônio do crescimento é produzida na hipófise e influencia o crescimento e o metabolismo de diversos tecidos, entre eles a glândula mamária (Akers *et al.*, 2000). Experimentos clássicos

realizados há mais de meio século demonstraram que tanto as secreções ovarianas quanto as hipofisárias são essenciais ao processo de mamogênese (Cowie, 1949; Lyons, 1958). O estrógeno e a ST foram apontados como fatores criticamente relacionados ao desenvolvimento dos ductos nas fases púberes, enquanto a sincronidade entre produção de prolactina, estrógeno e progesterona foi implicada no alongamento final dos ductos e na formação lóbulo-alveolar após a concepção (Lyons, 1958; Forsyth, 1994).

A produção de bST em escala comercial permitiu a realização de diversos trabalhos, evidenciando o envolvimento desse hormônio no estímulo do desenvolvimento mamário e tendo a sua administração aumentado a quantidade de tecido parenquimal (Sejrsen *et al.*, 1986; Purup *et al.*, 1993; Radcliff *et al.*, 1997), de conteúdo de DNA e quantidade de células epiteliais, bem como diminuindo a quantidade de gordura no úbere de novilhas pré-púberes (Radcliff *et al.*, 1997).

Evidências sugerem que a atuação da ST no desenvolvimento parenquimal é indireta, uma vez, que em experimentos conduzidos *in vitro*, a ST não exerceu efeitos sobre os extratos mamários (Akers, 1985) e não estimulou a proliferação de células epiteliais (Hovey *et al.*, 1998). Além disso, apesar de ter sido detectada a presença tanto da proteína como do mRNA de receptores para somatotropina (ST) nas porções epitelial e estromática da glândula mamária (Sinowatz *et al.*, 2000), ligação específica do hormônio não pôde ser demonstrada (Purup *et al.*, 1995). O IGF-1 foi postulado como um dos mediadores dos efeitos da somatotropina no desenvolvimento mamário (Akers *et al.*, 2000), visto que a administração de bST em novilhas aumenta dramaticamente os níveis do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) no soro sanguíneo (Purup *et al.*, 1993; Cohick e Turner, 1998; Radcliff *et al.*, 2004) e este é um potente fator mitogênico das células epiteliais *in vitro* (Weber, 1998; Weber *et al.*, 1999).

Além disso, a administração de ST exógena aumentou a expressão gênica de IGF-1 na glândula mamária (Kleinberg, 1998). O IGF-1 é produzido localmente na porção estromática da glândula mamária de roedores, humanos e ovinos (Hovey *et al.*, 1998). Hovey *et al.* (1999) sugeriram que o IGF-1 produzido na porção estromática da glândula mamária atua paracrinamente em “feedback” positivo com o parênquima, aumentando a proliferação das células epiteliais. Em novilhas pré-púberes, a expressão gênica de IGF-1 também foi encontrada no estroma mamário e aumentou após administração de bST (Weber, 1998).

As interações entre IGF-1 e ST, no entanto, são mais complexas do que o exposto, já que, em novilhas em taxas de crescimento acelerado, há diminuição do ST e aumento do IGF-1 circulante. Extratos mamários obtidos de novilhas em crescimento rápido foram menos responsivos às ações do estímulo do IGF-1 na proliferação celular (Sejrsen *et al.*, 1998). Essa diminuição na responsividade ao IGF-1 em novilhas em crescimento rápido pode estar relacionada a modificações nas proporções de fatores localmente produzidos, como as proteínas ligantes de IGF (IGFBP).

As células epiteliais mamárias produzem IGFBP-3 *in vivo* (Weber *et al.*, 1999) e em cultura de células imortalizadas (Cohick *et al.*, 1998). Os efeitos moduladores do IGFBP-3 são contraditórios e em alguns experimentos essa proteína reduziu dramaticamente o crescimento de células MCF-7 *in vitro* (Nickerson *et al.*, 1997), tendo inibido também os efeitos mitogênicos de extratos mamários em culturas de células primárias (Weber *et al.*, 1999) e aumentado os efeitos do IGF-1 em linhas de células epiteliais mamárias - MAC-T (Cohick *et al.*, 1998).

A produção de IGF-1 e IGFBP-3 na glândula mamária é modulada por hormônios endócrinos. A ovariectomia diminuiu a expressão gênica mamária de IGF-1 em novilhas (Akers *et al.*, 2000), e a administração de estrógeno aumentou os efeitos da somatotropina na expressão gênica de IGF-1 mamário em roedores (Ruan *et al.*, 1995). Berry *et al.* (2001), em trabalho conduzido com novilhas pré-púberes, encontraram aumento no IGF-1 quando da administração de estrógeno, não tendo o bST alterado a sua concentração, enquanto a quantidade de IGFBP-3 diminuiu em resposta a ambos, estrógeno, bST ou combinação dos dois hormônios. O aumento na proporção IGF-1:IGFBP-3 foi positivamente correlacionado a um aumento na proliferação celular (Berry *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual o IGFBP-3 modula as ações mitogênicas do IGF-1 ainda não foi completamente esclarecido. No entanto, essa proteína provavelmente se liga ao IGF-1, tornando-o menos disponível à proliferação celular (Berry *et al.*, 2001).

Apesar de o IGF-1 ter sido postulado diversas vezes como mediador dos efeitos da somatotropina no desenvolvimento mamário, muito provavelmente existem mecanismos de ação que independem do IGF-1, uma vez que esse fator, atuando sozinho, não foi capaz de substituir a somatotropina no estímulo do desenvolvimento alveolar na glândula mamária de roedores (Plaut *et al.*, 1993).

### **A participação das citocinas e leptina no desenvolvimento mamário**

A leptina, uma proteína semelhante às citocinas, foi relacionada, quando da sua descoberta, à ingestão energética e regulação de peso. Posteriormente, mostrou-se implicada em diversas funções orgânicas, entre elas a divisão celular (Houseknecht *et al.*, 1998). O seu receptor pertence à família dos receptores de citocina (Zhang *et al.*, 1997) e atua estimulando a tirosina-quinase janus intracelular (JAK), que é ativada pelas proteínas ativadoras de transcrição e tradução (STAT). A forma longa do receptor de leptina (OB-Rb) foi identificada em diversos tecidos do organismo, inclusive nas células epiteliais mamárias de novilhas (Silva *et al.*, 2002).

Além da expressão gênica do receptor, mRNA da leptina também foi identificado no tecido mamário de vacas, ovelhas e cabras (Chilliard *et al.*, 2001). A presença de leptina foi demonstrada nos adipócitos mamários durante as fases iniciais de gestação e, nas células epiteliais, durante a lactação (Chilliard *et al.*, 2001). A leptina é produzida pelas células epiteliais mamárias de humanos (Smith-Kirwin *et al.*, 1998), roedores (Aoki *et al.*, 1999) e bovinos (Smith e Sheffield, 2002). A adição de leptina ao meio de cultura contendo IGF-1 e FBS (soro fetal bovino) diminuiu a proliferação de células MAC-T *in vitro* (Silva *et al.*, 2002). Esses dados somados sugerem que a leptina pode atuar no desenvolvimento mamário autócrino e paracrinamente por meio de sua produção pelas células do tecido estromático e do tecido parenquimal.

As citocinas são mediadores solúveis que apresentam variadas funções biológicas, dentre elas a proliferação celular (Van Deuren *et al.*, 1992). Assim como a leptina, a presença de mRNA para diversas citocinas, como a IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  foi identificada em células mamárias epiteliais normais de novilhas (Okada *et al.*, 1997).

Os efeitos das citocinas sobre o desenvolvimento e proliferação celular da glândula mamária foram reportados por diversos autores. Por um lado, citocinas como a IL-1 e IL-6 inibiram a proliferação de células epiteliais mamárias de bovinos (Okada *et al.*, 1999), enquanto a TNF- $\alpha$  estimulou a proliferação de células epiteliais normais de ratos (Ip *et al.*, 1992) e foi apontada como um importante regulador do desenvolvimento mamário, estimulando a proliferação das células epiteliais e a morfogênese dos ductos mamários (Shea-Eaton *et al.*, 2001).

Os efeitos da suplementação com bST e dieta com níveis energéticos elevados na expressão gênica de leptina e citocinas no parênquima mamário de novilhas pré-púberes não foram totalmente estudados, e essas moléculas podem estar envolvidas no desenvolvimento da glândula mamária, atuando tanto parácrina como autocrinamente no desenvolvimento parenquimal.

A participação da IL-6 nos efeitos mitogênicos induzidos pelo IGF-1 em células mamárias epiteliais não foi estudada e pode complementar o esclarecimento do envolvimento das citocinas no desenvolvimento mamário.

### Conclusões e trabalhos futuros

Recentemente, Imagawa *et al.* (2002) resumiram alguns dos fatores sabidamente produzidos nas porções estromática e/ou epitelial da glândula mamária. Esses fatores atuam de maneira autócrina e/ou parácrina, formando um complexo processo bioquímico e fisiológico cujo ciclo está distante de ser inteiramente decifrado. Diversas citocinas, fatores de crescimento (epidérmico, fibroblástico, hepático), inibinas e activinas, IGF, lipídios, prostaglandinas, fatores de crescimento de transformação, entre outros, foram citados pelos autores (Imagawa *et al.*, 2002).

Além disso, fatores da matriz extra-celular são capazes de mediar a ação dos fatores de crescimento no desenvolvimento da glândula mamária, tornando todo o processo ainda mais complexo e interessante (Akers *et al.*, 2000).

O recente desenvolvimento da técnica laboratorial de microarranjos (“microarrays”) permite avaliar de uma só vez milhares de genes diferencialmente expressos em animais submetidos a diferentes condições experimentais. A análise das alterações que ocorrem em nível molecular pode levar a uma melhor compreensão dos inúmeros fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária, possibilitando aplicações de novas técnicas de manejo em produção animal que permitam a este atingir a puberdade precocemente sem efeitos negativos nas futuras produções leiteiras.

### Agradecimentos

Aos meus supervisores Dr. Mauro Dal Secco de Oliveira (Dept. de Zootecnia, UNESP – Campus de Jaboticabal) e Dr. Michael J. VandeHaar (Dept. of Animal Science, Michigan State University, East Lansing, Michigan). À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudo concedidas durante a realização do doutorado e doutorado sanduíche.

### Referências

- Akers RM. Lactogenic hormones: binding sites, mammary growth, secretory cell differentiation and milk biosynthesis in ruminants. *J Dairy Sci*, v.68, p.501-519, 1985.
- Akers RM, Mcfadden TB, Purup S, Vestergaard M, Sejrsen K, Capuco AV. Local IGF-1 axis in peripubertal ruminant mammary development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.5, p.43-51, 2000.
- Akers RM, Sejrsen K. Mammary development: what's it all mean? In: Annual PDHGA National Conference, 2<sup>nd</sup>, Reno, NV. Reno: PDHGA, 1998. p.7-26.
- Anderson RR. Embryonic and fetal development of the mammary apparatus. In: Larson BL (Ed.). *Lactation: a comprehensive treatise*. New York: Academic Press, 1978. v.4.



- Aoki N, Kawamura M, Matsuda T.** Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta*, v.1427, p.298–306, 1999.
- Berry SD, Mcfadden TB, Pearson RE, Akers RM.** A local increase in the mammary IGF-1:IGFBP-3 ratio mediates the mammatogenic effects of estrogen and growth hormone. *Dom Anim Endocrinol*, v.21, p.39–53, 2001.
- Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F.** Leptin in ruminants gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Dom Anim Endocrinol*, v.21, p.271–295, 2001.
- Cohick WS, Turner JD.** Regulation of IGF binding protein synthesis by a bovine mammary epithelial cell line. *J Endocrinol*, v.157, p.327–336, 1998.
- Cowie AT.** The relative growth of the mammary gland in normal, gonadectomized, and adrenalectomized rats. *J Endocrinol*, v.6, p.145–157, 1949.
- Cunha GR, Hom YK.** Role of mesenchymal-epithelial interactions in mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.1, p.21–35, 1996.
- Deresz F.** Alimentação e manejo de novilhas na fase de recria. *Inf Agropec*, v.16, p.37–40, 1992.
- Faulkin LJ, DeOme KB.** Regulation of growth and spacing of gland elements in the mammary fat pad of the C3H mouse. *J Natl Cancer Inst*, v.24, p.953–969, 1960.
- Forsyth IA.** Comparative aspects of placental lactogens: Structure and function. *Exp Clin Endocrinol*, v.102, p.244–251, 1994.
- Gomes ST.** Cadeia agroindustrial do leite no MERCOSUL. In: Vieira W, Carvalho F (Ed.). *Agronegócios e desenvolvimento econômico*. São Paulo: Atlas, 1997. p.155–175.
- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME.** The biology of leptin: a review. *J Anim Sci*, v.76, p.1405–1420, 1998.
- Hovey RC, Davey HW, Mackenzie DDS, McFadden TB.** Ontogeny and epithelial-stromal interactions regulate IGF expression in the ovine mammary gland. *Mol Cell Endocrinol*, v.136, p.139–144, 1998.
- Hovey RC, McFadden TB, Akers RM.** Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.4, p.53–68, 1999.
- Imagawa W, Edchenko VK, Elber J, Zhang H.** Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.80, p.213–230, 2002.
- Imagawa W, Yang J, Guzman R, Nandi S.** Control of mammary gland development. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p.1033–1063.
- Ip MM, Shoemaker SF, Darcy KM.** Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology*, v.130, p.2833–2844, 1992.
- Kleinberg DL.** Role of IGF-I in normal mammary development. *Breast Cancer Res Treat*, v.47, p.201–208, 1998.
- Lyons WR.** Hormonal synergism in mammary growth. *Proc R Soc Biol Sci*, v.149 p.303–325, 1958.
- Matitashvili E, Bramley AJ, Zavizion B.** An *in vitro* approach to ruminant mammary gland biology. *Biotechnol Adv*, v.15, p.17–41, 1997.
- Nickerson, T, Huynh, H, Pollak, M.** Insulin-like growth factor binding protein 3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.237, p.690–693, 1997.
- Okada H, Ito T, Ohtsuka H, Kirisawa R, Iwai H, Yamashita K, Yoshino T, Rosol TJ.** Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells *in vitro*. *J Vet Med Sci*, v.59, p.503–507, 1997.
- Okada H, Miyake Y, Ohtsuka H, Kiku Y, Fukuda S, Watanabe A, Yokomizo Y, Rosol TJ, Yoshino T.** Effects of isoprothiolane on cell growth of cultured bovine mammary epithelial cells. *J Vet Med Sci*, v.61, p.553–556, 1999.
- Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR.** Management considerations in heifer development and puberty. *J Anim Sci*, v.70, p.4018–4035, 1992.
- Plaut K, Ikeda M, Vonderhaar BK.** Role of growth hormone and insulin-like growth factor-I in mammary development. *J Endocrinol*, v.133, p.1843–1848, 1993.
- Purup S, Sejrsen K, Foldager J, Akers RM.** Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones, and acute *in vitro* proliferative response of mammary explants from Holstein heifers. *J Endocrinol*, v.139, p.19–26, 1993.
- Purup S, Sejrsen K, Akers RM.** Effect of bovine GH and ovariectomy on mammary tissue sensitivity to IGF-I in prepubertal heifers. *J Endocrinol*, v.144, p.153–158, 1995.
- Radcliff RP, Vandehaar MJ, Kobayashi Y, Sharma BK, Tucker HA, Lucy MC.** Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotrophic axis in Holstein heifers. *J Dairy Sci*, v.87, p.1229–1135, 2004.
- Radcliff RP, Vandehaar MJ, Skidmore AL, Chapin LT, Radke BR, Lloyd JW, Stanisiewski EP, Tucker HA.** Effects of diet and bovine somatotropin on heifer growth and mammary development. *J Dairy Sci*, v.80, p.1996–2003, 1997.
- Ruan W, Catanese V, Wiczorek R, Feldman M, Kleinberg DL.** Estradiol enhances the stimulatory effect of

- insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-1 messenger ribonucleic acid. *J Endocrinol*, v.136, p.1296-1302, 1995.
- Sejrsen K, Foldager J.** Mammary growth and milk production capacity of replacement heifers in relation to diet energy concentration and plasma hormone levels. *Acta Agric Scand Sect Anim Sci*, v.42, p.99, 1992.
- Sejrsen K, Foldager J, Sorensen MT, Akers RM, Bauman DE.** Effect of exogenous bovine somatotropin on pubertal mammary development in heifers. *J Dairy Sci*, v.69, p.1528-1535, 1986.
- Sejrsen K, Huber JT, Tucker HA.** Influence of amount fed on hormone concentrations and their relationship to mammary growth in heifers *J Dairy Sci*, v.66, p.845-855, 1983.
- Sejrsen K, Purup S.** Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *J Anim Sci*, v.75, p.828-835, 1997.
- Sejrsen K, Purup S, Martinussen H; Vestergaard M.** Effect of feeding level in calves and prepubertal heifers. *J Dairy Sci*, v.81, suppl.1, p.377, 1998.
- Sejrsen, K, Purup, S, Vestergaard, M, Foldager, J.** High body weight gain and reduced mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Dom Anim Endocrinol*, v.19, p.93-104, 2000.
- Shea-Eaton WK, Lee PP, Ip MM.** Regulation of milk protein gene expression in normal mammary epithelial cells by tumor necrosis factor. *Endocrinology*, v.142, p.2558-2568, 2001.
- Silva LFP, VandeHaar MJ, Weber Nielsen MS, Smith GW.** Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, v.85, p.3277-3286, 2002.
- Sinha YN, Tucker HA.** Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. *J Dairy Sci*, v.52, p.507-512, 1969.
- Sinowatz F, Schams D, Kolle S, Plath A, Lincoln D, Waters MJ.** Cellular localization of GH receptor in the bovine mammary gland during mammogenesis, lactation and involution. *J Endocrinol*, v 166, p 503-510, 2000.
- Smith JL, Sheffield LG.** Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells. *Dom Anim Endocrinol*, v.22, p.145-154, 2002.
- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL.** Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab*, v.83, p.1810-1813, 1998.
- Swanson EW.** Effect of rapid growth with fattening of dairy heifers on their lactational ability. *J Dairy Sci*, v.43, p.377-387, 1960.
- Van Deuren M, Dofferhoff AS, Van Der Meer JW.** Cytokines and the response to infection. *J Pathol*, v.168, p.349-356, 1992.
- Waldo DR, Capuco AV.** Effects of feeding dairy heifers on growth and milk production. In: California Animal Nutrition Conference, 1992, Fresno, CA. *Proceedings ... Fresno: The Conference*, 1992. p.1.
- Weber MS.** *The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in mammary gland development.* 1998. 185f. Thesis (PhD) - Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1998.
- Weber MS, Purup M, Vestergaard M; Ellis SE.** Contribution of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 to mitogenic activity in bovine mammary extracts and serum. *J Endocrinol*, v.161, p.365-373, 1999.
- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, Dimarchi R, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery J, Schevitz RW.** Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, v.387, p.206-209, 1997.
-