

JOSÉ ANTONIO NOVAES DA SILVA

MATRIZ EXTRAÇELULAR DE MAMA:
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE
FIBRAS DE COLÁGENO E
QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas para a ob-
tenção do título de Mestre em
Ciências, área de Biologia Cel-
lar.

Orientador: Prof. Dr. Benedito de Campos Vidal

Campinas, 1988

Este exemplar corresponde
à redação final da tese
defendida pelo candidato
José Antônio Novaes da
Silva e aprovada pela
Comissão Julgadora.
Campinas, 08/07/88



Si38m

9697/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA

**MATRIZ EXTRACELULAR DE MAMA:
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE
FIBRAS DE COLÁGENO E
QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS.**

“A história deste negro
É um pouco diferente
Não tenho palavras
Pra dizer o que ele sente
Tudo aquilo que você ouviu
A respeito do que ele fez
Serve para ocultar a verdade
É melhor estudar outra vez”

*As minhas origens
José e Ighes.
A Solange.
que traz em si
os planos de
nossa continuidade.*

Agradecimentos

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo estímulo, rigor científico com que orientou este trabalho, além de compartilhar amizade e espírito científico, pela ministração de palavras não só relativas à biologia celular, mas também pela transmissão de uma filosofia de vida além da confiança depositada em mim.

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela análise crítica desta tese e eficiência administrativa frente a Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Prof. Dr. Guilherme Blumen, pelas sugestões e análise deste trabalho.

Prof. Dr. Humberto Santo Neto, pelas críticas e sugestões a este manuscrito.

Dna. Luiza P. Burghi, pelos primeiros ensinamentos de técnicas de laboratório e amizade.

Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada pela ajuda na correção deste trabalho, sugestões e amizade.

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel, pelas sugestões, auxílio e amizade.

Prof. Ângelo Luiz Cortelazzo, pelas primeiras explicações visando o uso do microcomputador, auxílio na parte estatística.

conselhos e amizade.

Roberto Vilarta, professor da Faculdade de Educação Física da UNICAMP, pelo apoio desde a fase preparatória visando o ingresso neste curso de Pós-graduação.

Mary Anne Heide Dolder pela correção do *abstract*.

Célia Tardelli Jesus Andrade, professora do Departamento de Biologia Geral da FUEL pelo apoio, convivência e amizade.

Jair Tonon, Claudete Serrano e Eiko Itano professores do Departamento de Patologia Geral da Fuel, pelo incentivo em meu primeiro estágio e amizade.

Sra. Ana Gagliardi, bibliotecária chefe do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas correções da referência bibliográficas.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo durante a participação deste curso.

A Comissão de Pós-graduação do Instituto de Biologia da Unicamp pela concessão da bolsa de Monitoria II.

Aos colegas do curso de Pós-graduação pelo convívio e amizade.

Ao departamento de Biologia Celular onde foi realizado este trabalho.

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste manuscrito.

Conteúdo

Agradecimentos	iii
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	5
2 Resultados	6
2.1 Liberação de Colagenase	6
2.2 Extração de Gordura	8
2.2.1 Grupo A (Ratas com 25 Dias de Idade)	8
2.2.2 Grupo B (Ratas com 50 Dias de Idade)	21
2.2.3 Grupo D (Mamas Submetidas a 72 Horas de Regressão)	35
2.2.4 Qunatificação de Áreas Ocupadas por Colágeno Tipo I	37
3 Discussão	41
3.1 Considerações Gerais	41
3.2 Extração de Gordura	41
3.3 Liberação de Colagenase	42
3.4 Análise de Mastócitos	43
3.5 Remodelação de Fibras Colagênicas	44
4 Conclusões	48
5 Resumo	49

1 Introdução

A glândula mamária apresenta origem cutânea, formando-se pela migração de células epidérmicas para a superfície ventral do embrião (PITELKA, 1981). Estas células, conhecidas como as da linhagem do leite, dispõem-se bilateralmente, formando as linhas mamárias que, dependendo da espécie, podem se localizar desde a axila até a região inguinal (KUZMA, 1971; BLOOM & FAWCET, 1975).

A mama apresenta uma estrutura tubuloalveolar composta, secreção exócrina e uma morfologia que varia com a idade, sexo, e condições fisiológicas (PITELKA, 1981).

A prenhez induz a glândula mamária a sofrer um rápido desenvolvimento morfológico o qual, não ocorre de forma simultânea em toda a árvore mamária. Neste estado a mama mostra diferentes graus de desenvolvimento dependendo da região do epitélio examinado. Nota-se um maior número de lóbulos secretores na região X, que compreende o mamilo e porções mais superficiais da glândula, seguido pelo desenvolvimento da região Y, que corresponde à porção mediana do parênquima e finalmente a porção Z, localizada mais profundamente (RUSSO *et alii*, 1982).

Cada glândula, quando examinada à nível histológico, mostra-se formada por quatro constituintes básicos: (1) um epitélio glandular, sustentado por um (2) estroma conjuntivo subcutâneo, que se mostra

envolto por (3) tecido adiposo, (4) papila mamária ou mamilo, porção que fica em contato com o meio externo (PITELKA, 1981).

O epitélio glandular, quando corado com azul de Toluidina (AT) mostra-se constituído por 4 tipos celulares, que podem ser identificados pela sua localização, tamanho, intensidade de coloração e pelo tamanho e forma do núcleo e citoplasma. Estes tipos celulares são denominados de: células escuras, células intermediárias, células claras e células mioepiteliais (RUSSO *et alii*, 1982).

A porção epitelial é separada do estroma conjuntivo por uma membrana basal, que ultra-estruturalmente é dividida em dois componentes principais, a lâmina rarae (lâmina lúcida), e a lâmina densa (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1983; LAURIE & LEBLOND 1985), nas quais são localizados colágeno tipo IV, glicosamino glicanos ácidos (Heparan Sulfato), nidogênio, e as seguintes glicoproteínas estruturais não colagênicas entactina, fibronectina e laminina (TIMPL *et alii*, 1979; WEWER *et alii*, 1986; YOURCHENCO *et alii*, 1986).

Na mama, além do colágeno tipo IV, são também encontrados os colágenos I, III e V (FLEISMAJER, 1981; WARBURTON *et alii*, 1983), dos quais os colágenos I, III e IV podem ser diferenciados por meio de impregnação por prata.

Os colágenos, as proteoglicanas ácidas (Pr GAGA), juntamente com as glicoproteínas estruturais não colagênicas (GPE) são arranjadas em complexos de grande ordem molecular (VIDAL, 1987), sendo denominadas em seu conjunto como matriz extracelular (ME). Esta foi conceituada como sendo produtos extracelulares agregados e organizados de forma especial, conferindo aos tecidos características mecanofisiológicas especiais (VIDAL, 1987). A matriz extracelular apresenta importante papel na manutenção da arquitetura tecidual, morfogênese, filtração seletiva de macromoléculas e substrato de ancoragem celular (WEWER *et alii*, 1986) e no processo de diferenciação celular (BISSEL *et alii*, 1982).

A diversidade das propriedades biomecânicas e fisiológicas do tecido conectivo seriam em grande parte explicadas pela heterogeneidade genética e estrutural das macromoléculas que o constituem e determinando diferentes graus de agregação e ordem molecular (VIDAL, 1986), e originando diferentes informações estruturais a tecidos e a tipos celulares que estejam em contato com a matriz extracelular (MARK, 1982).

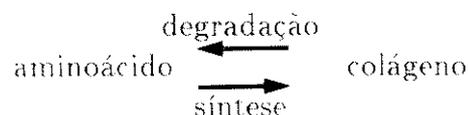
Os resíduos de galactose e glicose, que formam as porções glicídicas da molécula de colágeno, bem como as proteoglicanas e as glicoproteínas estruturais, também apresentam grande importância na manutenção do estado agregacional dos feixes de colágeno. Isto pode ser demonstrado por intermédio de microscopia de polarização, onde nota-se a diminuição do retardo óptico após a oxidação dos resíduos de carboidratos com ácido periódico (VIDAL, 1986), bem como a diminuição da birrefringência após a extração enzimática das PrGAGA e GPE (VIDAL, 1984; 1980).

O estudo do processo de remodelação do tecido conjuntivo obteve grande avanço a partir dos trabalhos de GROSS & LAPIERE (1962) que ao estudarem a reabsorção de fibrilas colagênicas em cauda de girino mantidas em meio de cultura, e conhecendo a estabilidade do colágeno ao ataque de enzimas proteolíticas, imputaram os resultados obtidos a uma colagenase que seria específica para a clivagem da proteína em questão.

VIDAL & BENATTI (1963) ao estudarem as alterações histológicas e histoquímicas causadas durante a reação inflamatória, que leva à formação de bolsas periodontais, responsabilizaram uma colagenase pela destruição do tecido de sustentação do periodonto.

Fibras colagênicas são reabsorvidas durante o crescimento, involução, inflamação e reparo de tecidos (GOLDEMBERG & RABINOVICH, 1981), sendo que a taxa de "turnover" pode variar em função dos estado nutricional, fisiológico e também da idade do organismo. Segundo SHIMIZO & HOKANO (1987), mastócitos poderiam participar deste processo.

A remodelação e o *turnover* do tecido conjuntivo, envolvem, simultaneamente a quebra e a síntese de seus componentes (TENCATE, 1972). O processo pode ser resumido pelo seguinte esquema:



Os trabalhos relativos à glândula mamária abordam principalmente dois aspectos: o bioquímico e o morfológico.

No primeiro são descritos a função catabólica do epitélio, a atividade enzimática em diferentes estágios funcionais, bem como

a ação de enzimas na biossíntese de ácidos graxos na prenhez e durante o estado de lactação (SHORT *et alii*, 1977; STEWART & THOMPSON, 1984).

Com relação ao aspecto morfológico são descritas as alterações sofridas pelo epitélio durante o processo de regressão (HOLLMAN & VERLEY, 1967; RAHM *et alii*, 1984), a influência hormonal na morfologia glandular (STOCKDALE, 1966), a morfologia e a distribuição de células mioepiteliais em mamas sob diferentes estados fisiológicos (RADNOR, 1972; EMERMAN, 1986), e também as alterações sofridas pela mama durante o processo de carcinogênese induzida pela administração de 7-12 dimetilbenzantraceno (DMBA), (RUSSO *et alii*, 1982; 1983; 1987).

Quanto ao aspecto regressivo do epitélio mamário sabe-se que a rapidez com que este se instala varia com a espécie animal, iniciando-se mais rapidamente em ratas que em coelhas. Contudo o processo mostra-se unívoco e comparável de uma espécie para outra (VERLEY & HOLLMAN, 1967).

O mecanismo de regressão pode ser dividido em quatro fases: início de regressão, uma segunda fase com grande índice de quebras e transformações, seguida por um período onde estes processos ocorrem de forma mais lenta, e finalmente a glândula retorna a seu estado de quiescência funcional (RAHM *et alii*, 1984; GEYER, *et alii*, 1986).

Durante a estase que precede a regressão não é notado aumento na atividade de enzimas proteolíticas (BRANDES *et alii*, 1967), ou qualquer alteração morfológica nas primeiras 48 horas que se seguem a separação da ninhada (HOLLMAN & VERLEY, 1967).

As hidrolases ácidas: aril sulfatase (HELMINEN *et alii*, 1968), fosfoamidase, fosfatase ácida, N-acetil- β -glucuronidase (BRANDES *et alii*, 1969), mostram um nítido aumento de atividade durante o processo de regressão.

Estudo histológico, realizado com camundongas, indica que a membrana basal é removida durante o processo de regressão, e que a solubilização de seus antígenos inicia-se 72 horas após o desmame, não havendo alterações drásticas até este tempo (MARTINEZ-HERNANDEZ *et alii*, 1976).

1.1 Objetivos

Tendo em vista a inexistência de dados relativos ao processo de remodelação da matriz extracelular em mama de rata, tem-se por objetivo estudar as alterações sofridas pelo estroma conjuntivo durante o desenvolvimento e regressão normais desta glândula com o propósito de:

1. Detectar as alterações histológicas induzidas sobre a matriz extracelular.
2. Estimar as áreas ocupadas por fibras de colágeno tipo I, por intermédio de métodos estereológicos.
3. Estimar o número e a distribuição de mastócitos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizadas doze ratas da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, agrupadas em quatro grupos, os quais continham 3 animais cada:

Grupo A : formado por ratas virgens com 25 dias de idade, e peso corporal de $46,33 \pm 5,5g$.

Grupo B : ratas virgens com 50 dias de idade e com um peso de $105,00 \pm 6,3g$.

Grupo C : ratas que amamentaram por um período de 15 dias, e que foram sacrificadas após a separação da cria. Estas apresentavam $211,66 \pm 10,40g$ e com $87 \pm 3,0$ dias de idade.

Grupo D : ratas que amamentaram por um período de 15 dias e que foram sacrificadas 72 horas após a separação da ninhada. Estas apresentavam $195,0 \pm 5,0g$ de peso corporal e com $100 \pm 3,0$ dias de idade.

As ratas pertencentes aos grupos C e D, tinham suas ninhadas reduzidas ao número de 8 filhotes. 4 dias após parirem procedimento adotado de conformidade com HELMINEN & ERICSON (1968a)

Os animais dos grupos A e B foram mantidos em gaiolas (3 animais/gaiola) e alimentadas *ad libitum* com água e ração Labina. Por sua vez os pertencentes aos grupos C e D foram mantidos sob as mesmas condições de alimentação, alterando-se o número de ratas mantidas por gaiola, pois as fêmeas permaneceram com a ninhada.

2.2 Obtenção das Glândulas Mamárias

Em ratas anestesiadas com éter sulfúrico fazia-se uma incisão na pele da região inguinal, a qual era estendida até a região peitoral, expondo-se a fáscia subcutânea.

As glândulas mamárias pertencentes aos grupos C e D foram divididas em 2 regiões, uma proximal (PP) e outra distal (PD). A primeira compreendia o mamilo e porções do parênquima glandular subjacentes e a segunda continha regiões que não estavam situadas a base do mamilo (figura 01).

Para que as diferenças entre as glândulas fossem minimizadas (MARTINEZ-HERNANDEZ *et alii*, 1976), somente o segundo par de glândulas peitorais foram utilizadas neste estudo.

Figura 1: Representação esquemática de glândula mamária exindo as porções proximais (PP) e porções distais (PD). Modificado de RUSSO *et alii* (1982).

2.3 Fixação

As porções glandulares utilizadas na descrição morfológica foram fixadas da maneira descrita a seguir. As pertencentes ao lado direito permaneceram durante 48 horas em solução de formaldeído a 10%, e as referentes ao antímero esquerdo foram fixadas em etanol ácido acético na proporção de 3:1 V/V por 24 horas. O processo de fixação ocorreu a 4 graus centígrados.

As peles fixadas em formaldeído eram desidratadas, e para que o excesso de gordura fosse retirado, ambos os lados foram imersos em acetona, até não mais ser notado a formação de um precipitado esbranquiçado quando esta solução fosse colocada em contato com água destilada (10ml/1ml água).

As peças foram hidratadas em bateria de etanol com concentração decrescente durante uma hora cada banho, e ao final, lavadas com água destilada por 30 minutos, coradas rapidamente com azul de Toluidina pH 4.0 (AT) a 0.025% dissecando-se a fáscia subcutânea do segundo par de glândulas torácicas sob lupa estereoscópica Carl Zeiss.

2.4 Preparo da Montagem Total

As mamas foram rapidamente desidratadas em etanol, tratadas em xilol por 15 minutos, diafanizadas em óleo de cedro, por um tempo mínimo de oito dias, sendo montadas entre lâmina e lamínula com óleo de cedro.

A montagem total permitia o exame detalhado, seleção e orientação do material glandular, pois em ratas não prenhas, ou em estágio de lactação, a mama é formada por camadas teciduais relativamente finas e planas (RUSSO *et alii*, 1982). Após isto as montagens eram desfeitas e as peças eram processadas visando sua inclusão em parafina.

2.5 Inclusão em Parafina e Microtomia

As porções glandulares selecionadas, permaneciam em xilol por 15 minutos recebendo então 3 banhos consecutivos de parafina a 60 graus centígrados de 1 hora de duração cada, sendo posteriormente

incluídas em parafina e seccionadas de forma seriada, em micrótomo R. Jung-Heidelberg, com 7 micrômetros de espessura.

2.6 Preparo de Gelatina a 10%

Quatro gramas de gelatina alemã em placas foram dissolvidas em 40 ml de água destilada, aquecida em banho-maria. O gel foi filtrado para a eliminação de grumos e porções não dissolvidas, e aplicado sobre lâminas histológicas que foram mantidas a 4 graus centígrados para que ocorresse a solidificação do gel, que em seguida, foi fixado em solução de formaldeído a 2% durante duas horas, e finalmente lavado em água destilada pelo mesmo período de tempo.

2.7 Detecção da Liberação de Colagenase

Peles não fixadas foram imediatamente imersas em solução fisiológica a 0.9% a uma temperatura de 4 graus centígrados.

A fáscia subcutânea foi rapidamente dissecada sob lupa estereoscópica Carl Zeiss e seccionada com uma espessura de 120 micrômetros, em micrótomo de congelação R. Jung-Heidelberg.

Estas secções foram distendidas sobre lâminas histológicas previamente recobertas com gelatina a 10%, e incubadas em câmara úmida e mantidas a 37 graus centígrados durante duas horas.

2.7.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

Foi empregada para a análise morfológica geral.

O material foi corado durante três minutos em hematoxilina, lavado por doze minutos em água destilada, eosina por dez minutos, rápida desidratação, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

2.8 Coloração com Tricrômico Mason

Foi empregada na coloração de cortes de papilas mármia, visando-se a detecção de músculo liso.

O material foi corado com hematoxilina por dez minutos, lavado em água destilada durante doze minutos, oxidado com ácido fosfomolibdico a 5% durante oito minutos, corado pelo azul de anilina, lavado em água destilada, desidratado em bateria de etanol, diafanizado em xilol e montado com bálsamo do Canadá (BEHMER *et alli*, 1976).

2.8.1 Coloração com Xylidine Ponceau a pH 2,5 (XP)

Empregado para a detecção de radicais catiônicos totais, sobre películas de gelatina.

O material foi corado com XP a 0,1% durante 15 minutos, à temperatura ambiente, lavado em seguida, com ácido acético a 2% por 30 minutos, desidratado em etanol, diafanizado em xilol e montado em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1970).

2.8.2 Coloração com Azul de Toluidina a pH 4,0 (AT)

Foi utilizado para a detecção de basofilia e basofilia metacromática.

O material foi corado à temperatura ambiente por 15 minutos em solução a 0,025% de AT em tampão McIlvaine a pH 4,0, lavado rapidamente em água destilada. Como fixador pós-coloração usou-se molibdato de amônio a 4%, no qual o material era banhado durante quatro minutos, seguindo-se uma rápida desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá (MELLO *et alii*, 1974).

2.8.3 Impregnação por Prata para Reticulina: Método de BIELCOWSKI (Modificado por VIDAL)

Foi útil na descrição morfológica das fibras de colágeno, bem como para as tomadas de medidas das áreas ocupadas por esta proteína no mamilo e no parênquima glandular.

O colágeno pode ser impregnado por prata devido à presença de grupos hidroxila de carboidratos, que se tornam reativos histoquimicamente, após serem oxidados, resultando em aldeídos que passam a promover a precipitação de íons de prata (VELICAN & VELICAN, 1972; VIDAL, 1987).

O material previamente protegido por nitro celulose a 2% foi oxidado com ácido periódico a 0,5% durante 30 minutos, lavado em água destilada, impregnado com nitrado de prata a 2% durante 24 horas, tratado com solução de prata amoníacal, reduzido com formaldeído, tratado com solução de hipossulfito a 5%, e sulfito de sódio a 5%, lavado, desidratado, diafanizado em xilol e montado em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1987).

2.9 Tratamento Enzimático

2.9.1 Digestão com α -Amilase Bruta

Utilizada para a remoção de porções glicídicas de proteínas estruturais não colagênicas (ANDERSON, 1976; VIDAL, 1980).

α -amilase a 1%, 0,08 mg de cloreto de sódio, 0,013 mg de difosfato de sódio anidro, 0,008 g de monofosfato de potássio monohidroclorado em 10 ml de água destilada. Incubar em câmara úmida por uma hora a 37 graus centígrados (LISON, 1960).

2.10 Análises Quantitativas

2.10.1 Quantificação das Áreas Ocupadas por Colágeno Tipo I

Foi realizada sobre os cortes impregnados com prata, pois esta técnica permitiu uma visualização mais precisa da morfologia das fibras de colágeno, que passaram a exibir uma tonalidade marrom.

Empregou-se a ocular K-10 X Carl Zeiss, que apresenta seis grades ou discos integradores, dos quais quatro diferem entre si quanto ao número e a distância entre os pontos de contagem que os constituem e que se distribuem formando um quadrado.

No presente trabalho foi utilizada a grade II, procedendo-se a contagem do número de pontos que interceptavam as fibras de colágeno. A distância entre dois pontos adjacentes foi determinada empregando-se lâmina micrométrica Leitz Wetzlar. Em associação com esta grade foi empregada a objetiva Plan 40.0.65 obtendo-se uma área de aproximadamente $1.45.10^5 \mu\text{m}^2$ por campo focalizado. Foi empregado o microscópio Standart 044 Br da Carl Zeiss.

Foram contados 30 campos microscópicos escolhidos ao acaso, tanto para o mamilo quanto para o parênquima glandular mamário dos grupos A e B, C e D respectivamente, sendo realizadas 10 medidas por rata em cada porção glandular.

As áreas (A) em micrômetros quadrados (μm^2) foram determinadas, conforme instruções contidas no manual do equipamento, aplicando-se a seguinte fórmula.

$$A = p \cdot a^2$$

onde:

p = número de interseções:

a^2 = quadrado da distância entre dois pontos adjacentes.

Os resultados foram comparados por meio de análise exploratória. As medias foram submetidas a análise de variância bifatorial seguida por teste de Tukey para a comparação dos tratamentos ao nível de $P = 0.01$.

2.10.2 Quantificação de Mastócitos

Foi realizada sobre os cortes corados com AT a pH 4.0, pois estas células quando coradas, por esta técnica, exibem um citoplasma rico em granulações metacromáticas, que facilitam grandemente a distinção entre mastócitos e outros tipos celulares (FULLMER, 1965).

A contagem foi levada a efeito em microscópio standard 044 Br da Carl Zeiss utilizando-se da ocular KPL 10X e objetiva Plan 40/0.65 obtendo-se uma área de aproximadamente $1.45 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ por campo focalizado.

Tanto para a papila mamária quanto para o parênquima glandular, foram contados 30 campos microscópicos escolhidos ao acaso sendo feitas 10 contagens por animal em cada porção glandular.

Cada dado foi transformado por meio da adição de 0.5 com posterior extração da raiz quadrada. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância bifatorial, seguida por teste de Tukey para a comparação dos tratamentos ao nível de $P = 0.01$.

3 Resultados

3.1 Liberação de Colagenase

Secções glandulares provenientes de ratas com 25, 50 dias de idade, ou com um período de 15 dias de amamentação (grupo C) não exibiam qualquer tipo de ação sobre a película de gelatina, pois o gel exibiu-se intacto após a coloração com XP (figura 02a-b).

Porções glandulares de ratas submetidas ao período de 72 horas de regressão, no entanto, apresentaram diferentes níveis de ação sobre o substrato, sendo que porções próximas ao mamilo digeriram quase completamente o substrato fornecido, restando alguns pontos residuais não digeridos, que foram evidenciados após a coloração com XP (figura 02c).

As regiões situadas distalmente ao mamilo apresentaram uma menor ação degradativa sobre o gel, que foi evidenciada pela coloração de fundo avermelhada após o emprego de XP. A liberação enzimática também não se mostrou homogênea, pois notou-se uma variação na tonalidade avermelhada do material não digerido (figura 02c).

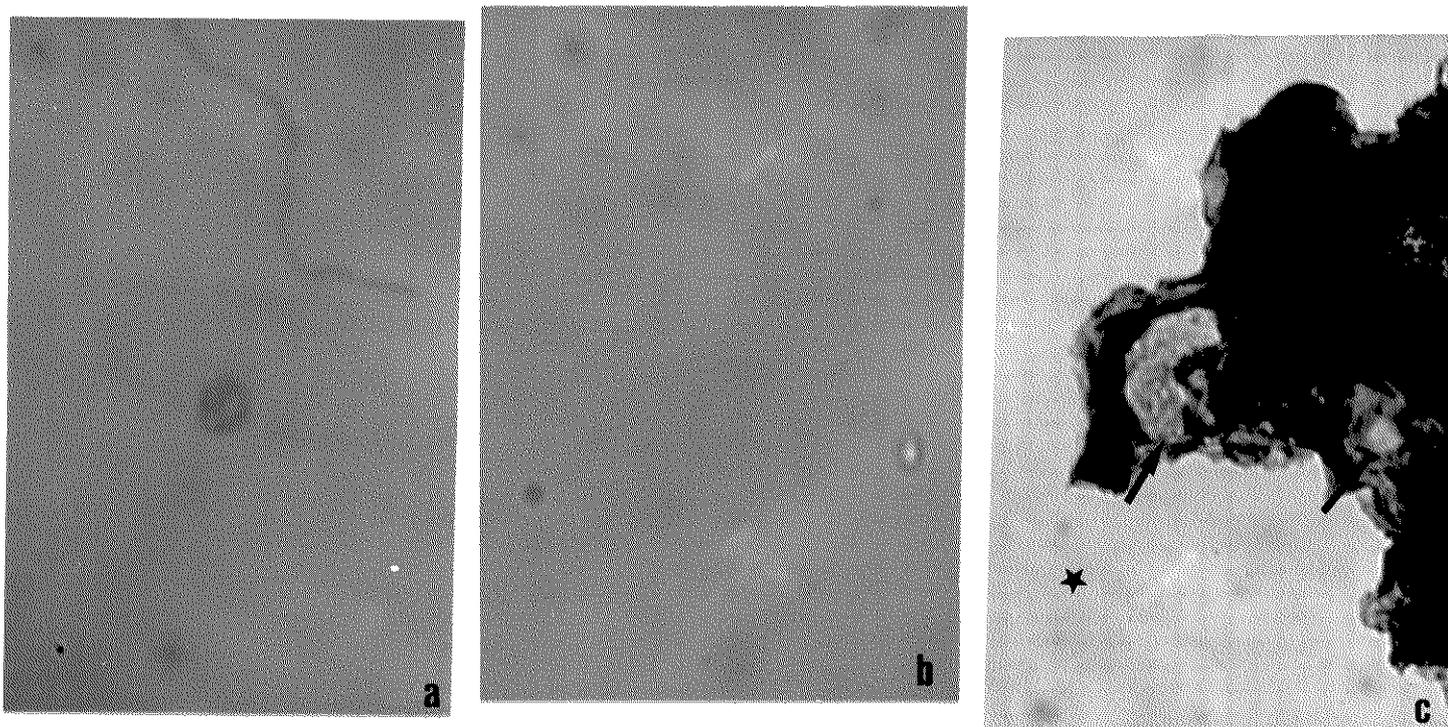


Figura 2a-c: Géis incubados com: a: mama de rata com 25 dias de idade: b: porção distal de mama submetida a 15 de amamentação e c: mama submetida a 72 horas de regressão. Notam-se porções onde o gel foi completamente digerido (★) e regiões com digestão parcial (→) e não digeridas. Xylidine Ponceau. 130X.

3.2 Extração de Gordura

Com a utilização da acetona empregada para a retirada do excesso de gordura das peças, obteve-se diferentes níveis de extração após a adição de água destilada. O grau de precipitação foi estudado visualmente. Os índices mais acentuados pertenceram a ratas com 25 e 50 dias de idade, cujo parênquima glandular era envolvido por um extenso coxim adiposo. Para os grupos submetidos a amamentação, ou amamentação seguida por regressão, notou-se um precipitado bem menos acentuado que o observado nas ratas com 25 e 50 dias de idade, sendo que nas ratas pertencentes ao grupo D (regressão) o precipitado mostrou-se um pouco mais acentuado que no grupo submetido apenas à amamentação.

3.3 Exame Microscópico

3.3.1 Grupo A (ratas com 25 dias de idade)

Secções glandulares, de ratas com esta idade, coradas com HE, apresentaram um parênquima com distribuição esparsa e crescimento longitudinal, o qual é formado predominantemente, por ductos em diversos estágios de desenvolvimento, botões de crescimento que surgiam nas extremidades de ductos, ou a partir de qualquer ponto do sistema canalicular, e por uma extensa malha de tecido adiposo (figura 03).

O mamilo apresentava um contorno regular, sendo que a papila conjuntiva exibia curtas invaginações que eram recobertas, externamente, por um epitélio pavimentoso queratinizado estratificado (figura 04).

O estroma conjuntivo do mamilo, mostrava uma alta celularidade, estando presentes fibroblastos que apresentavam núcleos com diferentes formatos, que podiam variar entre um contorno estrelado a um elipsóide, não sendo encontradas fibras de músculo liso.

Nas porções apicais do mamilo, onde ainda não se notava a presença do canal galactóforo, as fibras colagênicas não apresentavam uma direção preferencial para sua deposição, e sua espessura variava em relação a porção analisada. Junto ao epitélio queratinizado que contornava à papila mamária, as fibras encontradas eram finas e nas regiões mais centrais do mamilo eram ligeiramente mais espessas (figura 05).

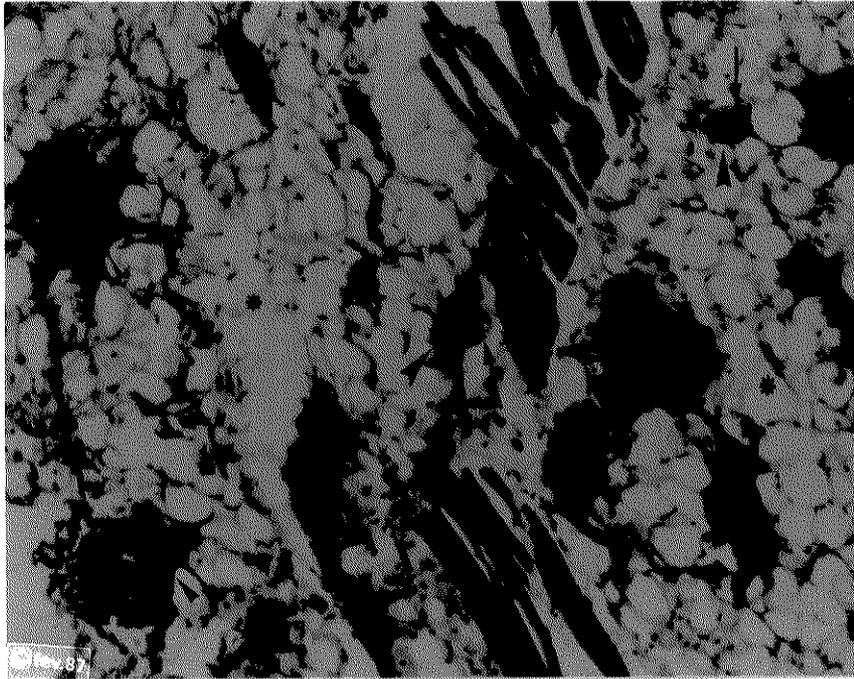


Figura 3: Mama de rata com 25 dias de idade. O parênquima glandular (►) mostra-se envolto por uma discreta camada de tecido conjuntivo (—→) , cujas fibras se interconectam com o tecido adiposo (*) formando uma rede tridimensional. Hematoxilina/eosina. 90 X.

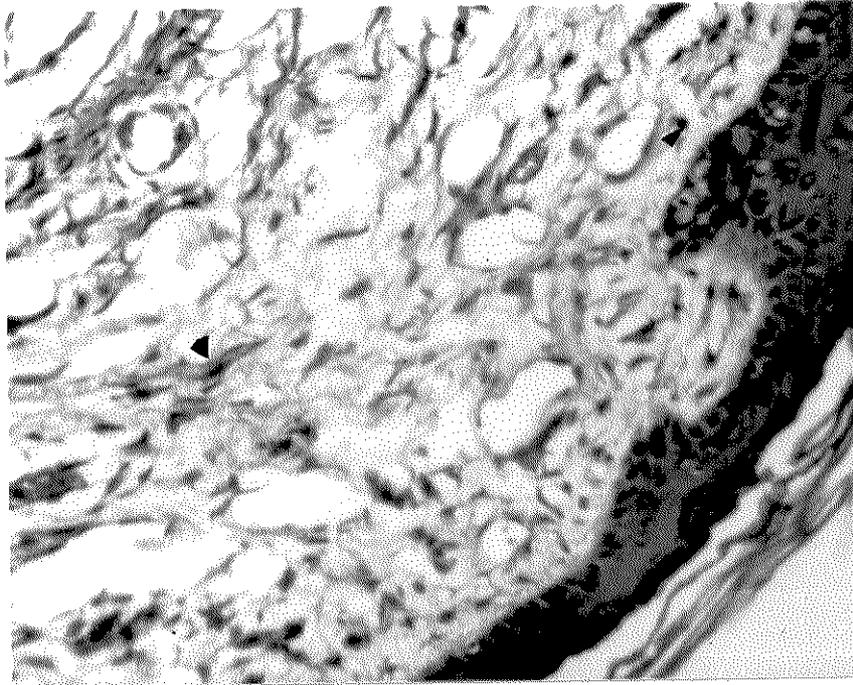


Figura 4: Corte transversal de mamilo de rata com 25 dias de idade. Este exhibe um contorno regular, sendo envolto por epitélio pavimentoso queratinizado estratificado (►). Finas fibras colágenas distribuem-se concentricamente ao canal galactóforo (*) e contornam irregulares espaços intersticiais. Hematoxilina/eosina 190 X.

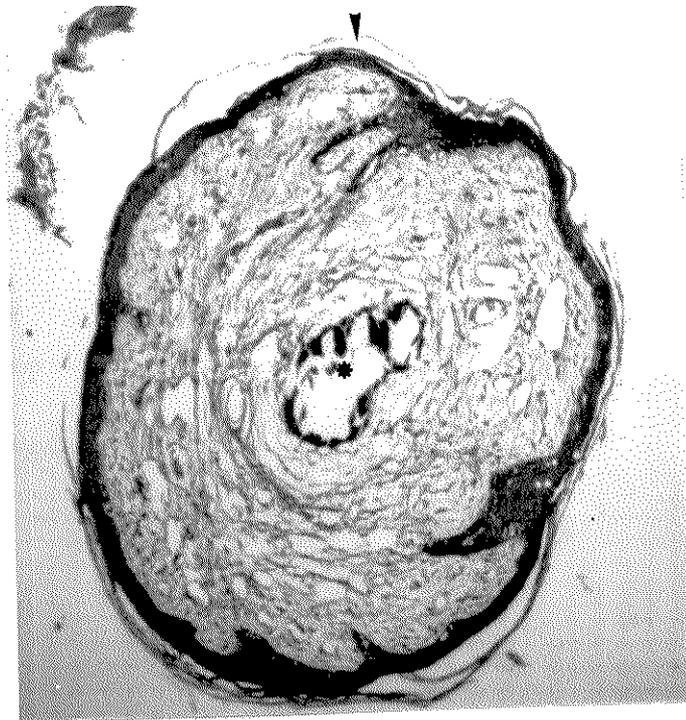


Figura 5: Porção periférica de papila mamária de rata com 25 dias de idade. As fibras de colágeno distribuem-se formando massas com diferentes espessuras (), que se unem ao epitélio pavimentoso queratinizado estratificado () por meio de fibrilas finas, mas relativamente compactas. Hematoxilina/eosina. 580X.

Nas secções onde o canal galactóforo era visualizado, as fibras colágênicas passaram a formar massas cordonais que se dispunham concentricamente ao canal. Entre as mesmas grande número de espaços intersticiais foi visualizado.

O sistema canalicular que constituía o parênquima glandular, mostrou-se envolto por um tecido conjuntivo justatubular que se dispunha longitudinalmente aos ductos condutores. Este tecido conjuntivo emitia prolongamentos que realizavam a fixação destas estruturas e também do tecido adiposo (figura 06).

A deposição de colágeno em torno dos conductos e dos botões de crescimento não se mostrou homogênea, ocorrendo uma variação na espessura do lençol conjuntivo justatubular que os envolvia.

O emprego de hematoxilina-eosina permitiu uma boa visualização dos mastócitos, evidenciando nestas células um citoplasma fortemente corado pela eosina que muitas vezes apresentava-se finamente granular. (figura 07).

Empregando-se o corante tiazínico azul de Toluidina constatou-se ausência de metacromasia em qualquer porção glandular, mas este corava intensamente os grânulos de mastócitos, evidenciando granulações fortemente metacromáticas, distinguindo-se claramente este tipo celular dos demais (figura 08).

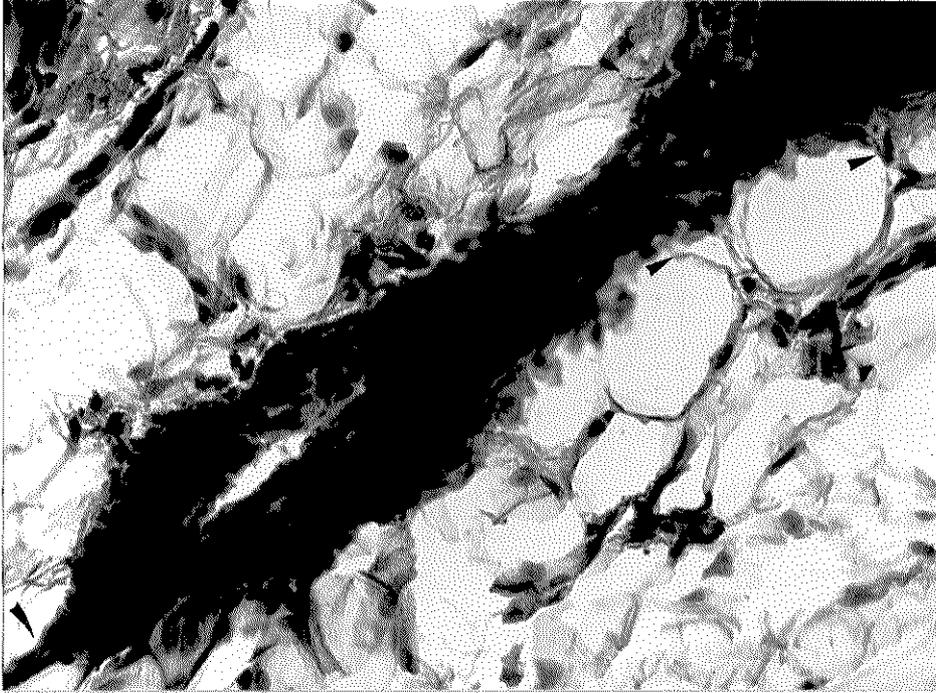


Figura 6: Corte longitudinal de ducto de mama de rata com 25 dias de idade. O conjuntivo justatubular emite prolongamentos (►) que realizam a sustentação do tecido adiposo. Hematoxilina/eosina. 370X.

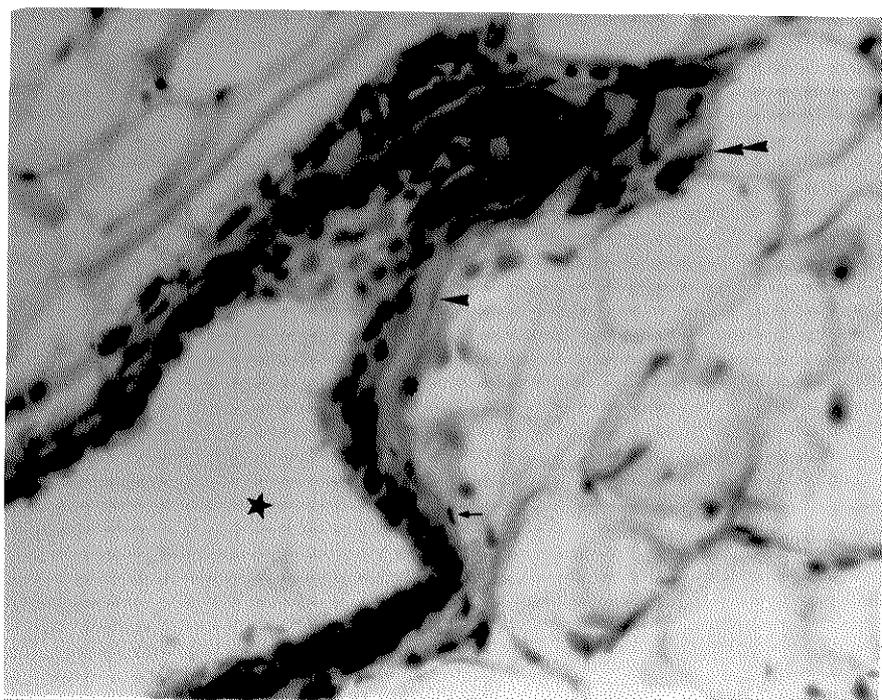


Figura 7: Corte longitudinal de ducto de mama de rata com 25 dias de idade. O lumên mostra-se amplo (★). A matriz colagênica dispõe-se de forma longitudinal e compacta (★) em torno do canal condutor. Mastócitos (►►) e fibroblastos jovens (→) situam-se no limite entre o tecido conjuntivo e o adiposo. Hematoxilina eosina. 740X.

Partindo-se do ápice do mamilo, em direção à sua base foi notado um aumento no número destas células, que exibiam uma distribuição periférica, dispendo-se próximos ao epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (figura 08).

Junto à árvore mamária, os mastócitos e os eosinófilos, distribuía-se preferencialmente, nas proximidades do parênquima glandular, sendo que os primeiros ocupavam posições limítrofes entre o tecido adiposo e a matriz colagênica (figura 09).

A impregnação metálica demonstrou uma matriz conjuntiva rica em colágeno tipo I, evidenciando um aspecto fino e fibrilar junto ao mamilo e árvore mamária, sendo que junto ao parênquima as fibras colagênicas dispunham-se paralelamente ao maior eixo do sistema canalicular, exibindo-se compactas e flexuosas, sem a formação de espaços intersticiais.

Esta técnica evidenciou a malha formada por fibras de colágeno tipo I e fibras reticulares (colágeno III) nas regiões situadas próximas ao mamilo (figura 10), bem como os finos prolongamentos responsáveis pela sustentação do epitélio (figura 11) . Junto ao parênquima secções longitudinais aos ductos, exibiam fibras reticulares finas e flexuosas em negro (figura 12), dispostas paralelamente ao maior eixo do sistema canalicular.

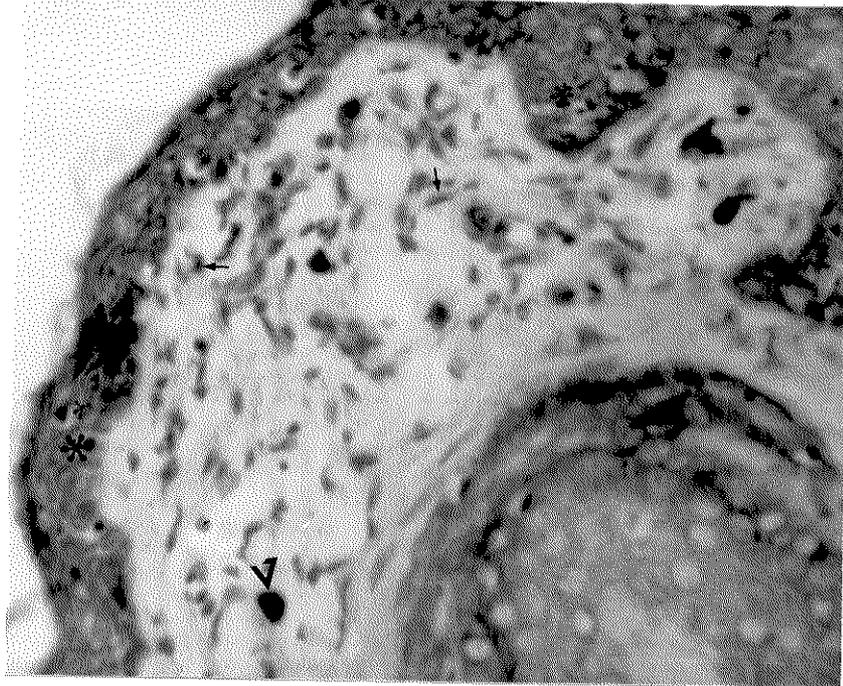


Figura 8: Corte transversal de mamilo de rata com 25 dias de idade, mostrando a localização de mastócitos (➤) que tendem a se distribuir próximos ao epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (*). Fibroblastos jovens exibem uma variação da morfologia nuclear (→). Azul de Toluidina a pH 4.0. 740X.

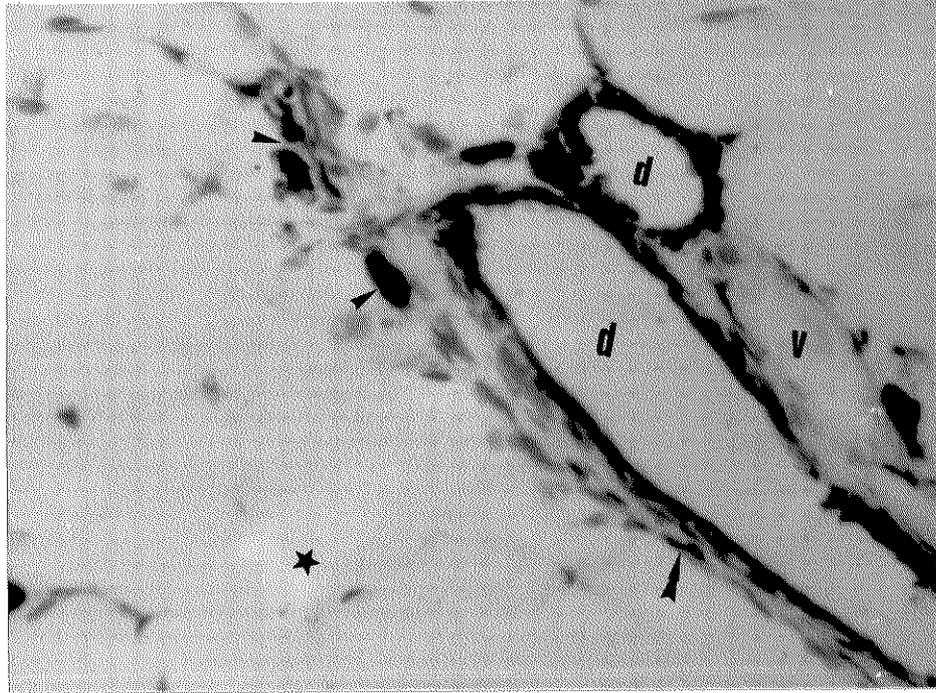


Figura 9: Corte longitudinal de ducto (d) e vaso sanguíneo (v). Fibroblastos (\blacktriangleright) mostram-se alinhados paralelamente ao maior eixo do canal condutor. Mastócitos (\blacktriangleright) situam-se nos limites entre os feixes de colágeno e o tecido adiposo (\star). Azul de Toluidina a pH 4.0. 180X.

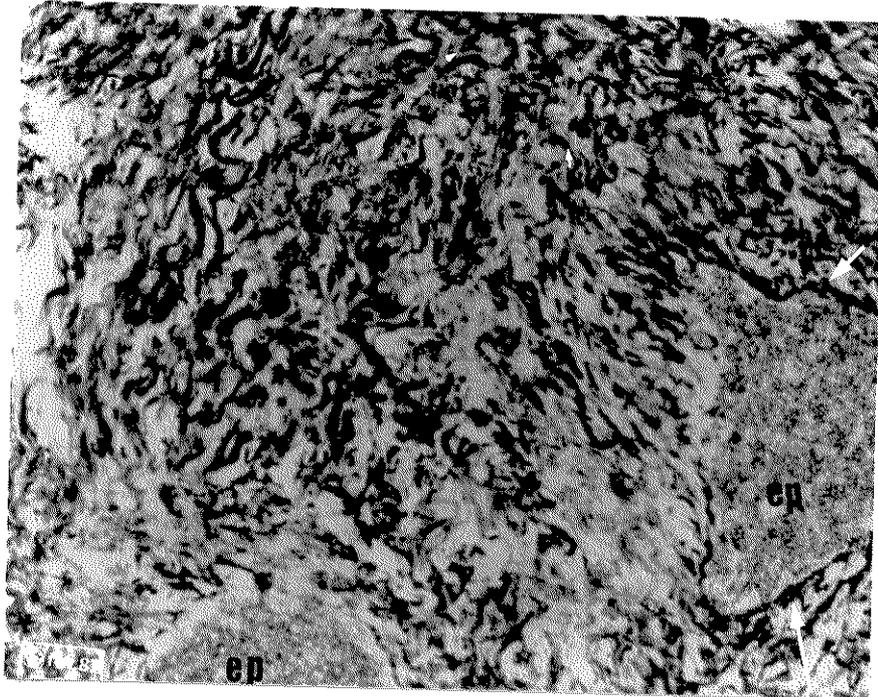


Figura 10: Corte próximo à papila mamária de rata com 25 dias de idade, exibindo porções epiteliais (ep) envoltas pela membrana basal (). Reticulina (colágeno III) em negro e fibras de colágeno tipo I () formam uma malha. Impregnação por Prata. 370X.

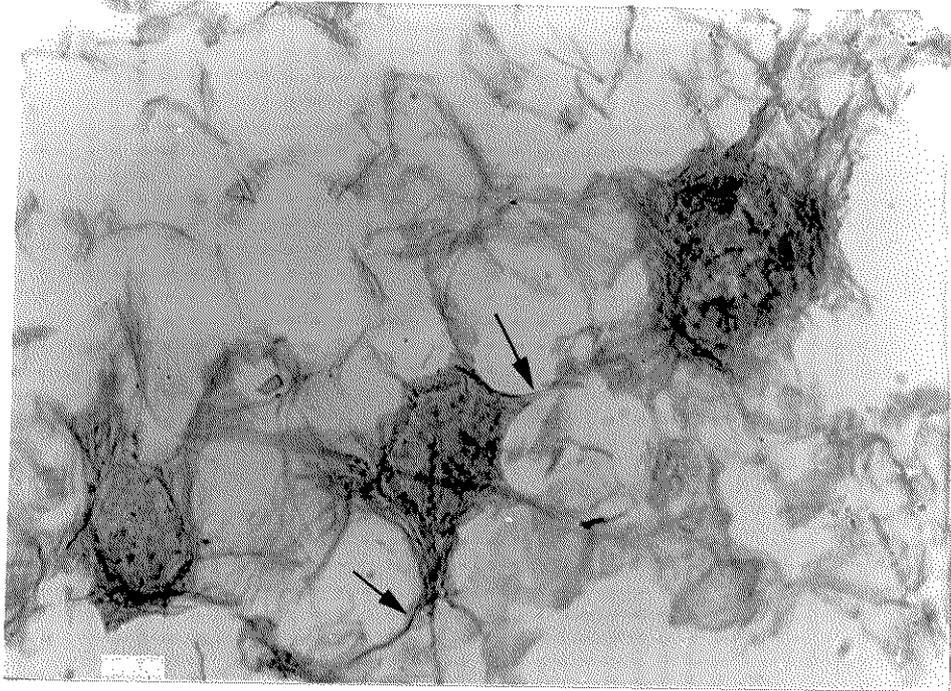


Figura 11: Ductos de mama de rata com 25 dias de idade, cortados transversalmente. As setas indicam o conjuntivo responsável pela sustentação do epitélio glandular. Impregnação por prata, com pré-tratamento com α -amilase bruta. 370X.

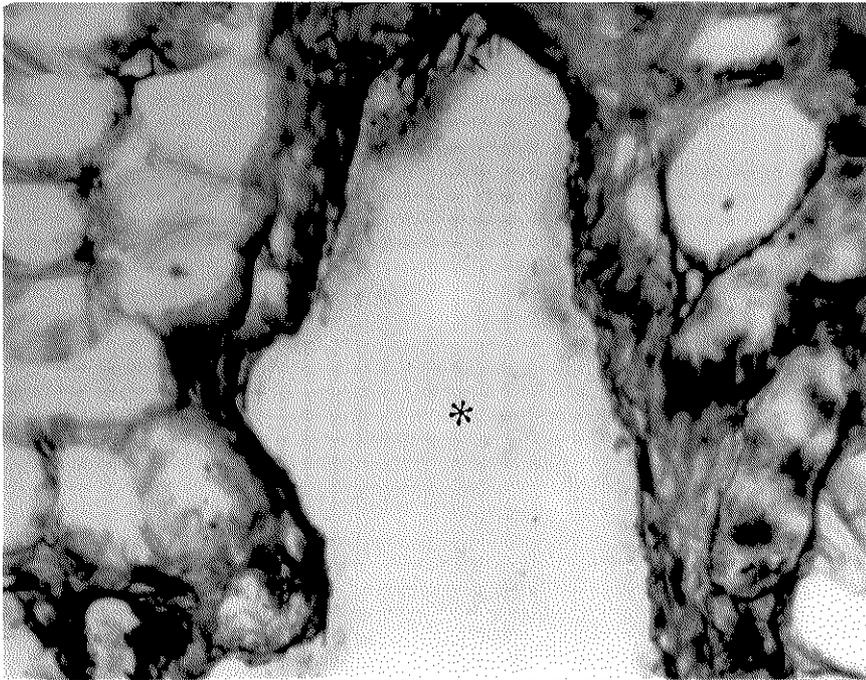


Figura 12: Corte longitudinal de ducto de mama. O colágeno (◻) dispõe-se de forma relativamente homogênea em torno do ducto condutor (*). Fibrilas de reticulina (←) realizam a conexão entre o parênquima glandular e o estroma conjuntivo. Impregnação por Prata. 740X.

3.3.2 Grupo B (ratas com 50 dias de idade)

Glândulas mamárias de ratas pertencentes a este grupo, coradas com HE, apresentavam uma estruturação básica semelhante à do grupo A, com o mamilo mostrando um contorno regular, alta celularidade, e sendo envolto por uma fina camada de queratina (figura 13).

Em segmentos apicais da papila mamária, onde não era observado o canal galactóforo, as fibras colagênicas dispunham-se sem uma direção preferencial, deixando entre si um grande número de espaços intersticiais. As porções centrais apresentavam fibras mais longas e espessas as quais, na periferia, junto ao epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, tornavam-se curtas e afiladas. Em cortes de regiões mais basais, onde já havia a presença do canal galactóforo, o colágeno distribuía-se formando massas cordonais que se dispunham concentricamente em torno do ducto excretor. Não foram visualizados feixes de músculo liso, em mamilos de ratas com esta idade.

A árvore mamária distribuía-se de forma esparsa, apresentando grandes áreas ocupadas por tecido adiposo. O sistema de ductos mostrava-se com a luz já formada, sendo envolvido por uma camada de fibras colagênicas com espessura uniforme (figuras 14 e 15).

A coloração com azul de Toluidina evidenciou mastócitos localizados na periferia do mamilo (figura 16), o número destas células aumentando da porção apical do mamilo em direção à sua base. À nível do parênquima mamário mastócitos e eosinófilos foram localizados em zonas limítrofes entre o tecido adiposo e a matriz colagênica. Os mastócitos somente estavam presentes nas regiões onde a matriz conjuntiva mostrava-se mais descompactada. Isto geralmente ocorria em porções com uma maior concentração de dutos, ou de botões de crescimento.

Com a impregnação pela prata, as mamas de ratas deste grupo passaram a exibir uma matriz rica em colágeno tipo I, a qual apresentava uma coloração marrom (figura 17).

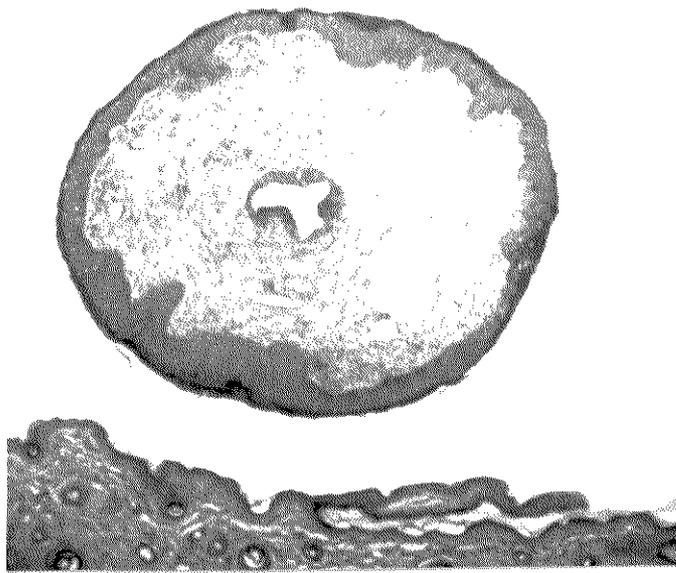


Figura 13: Corte transversal de papila mamária de rata com 50 dias de idade, exibindo um contorno regular, com os feixes de colágeno tendo uma distribuição circunferencial. Hematoxilina-eosina. 140X.

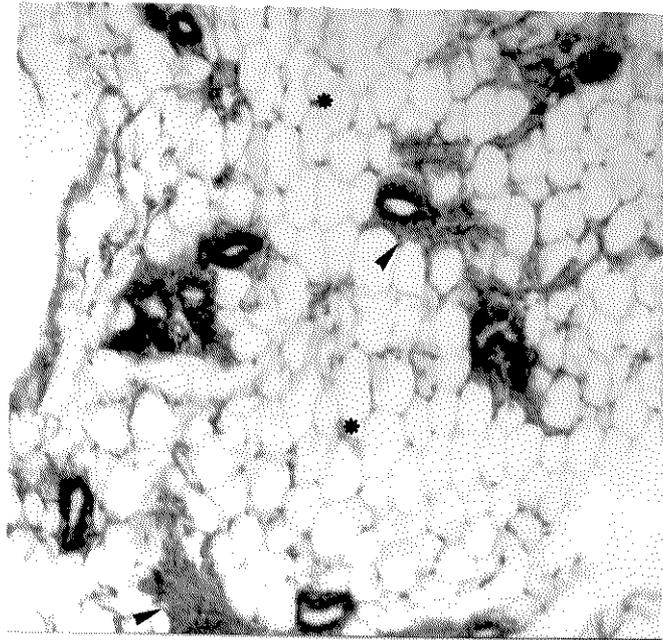


Figura 14: Secção transversal de ductos de mama de rata com 50 dias de idade que são envoltos por colágeno (►). O sistema canalicular mostra-se suspenso em um vasto coxim adiposo (*). Hematoxilina eosina. 190 X.

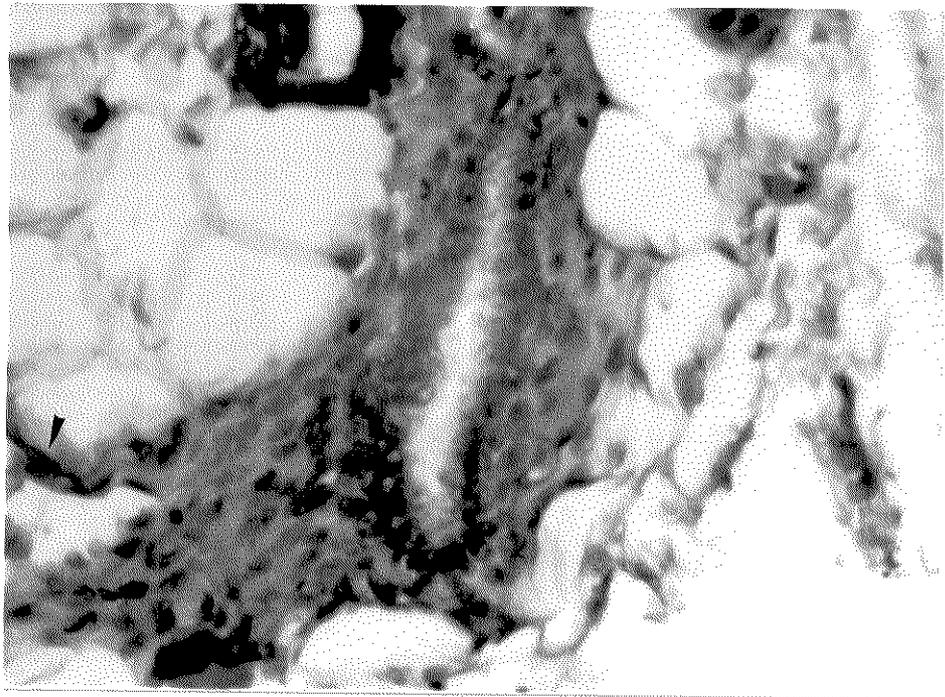


Figura 15: Corte de glândula mamária de rata com 50 dias de idade, exibindo o ducto fixado ao estroma adiposo por prolongamentos colagênicos (►). Hematoxilina eosina. 740X.

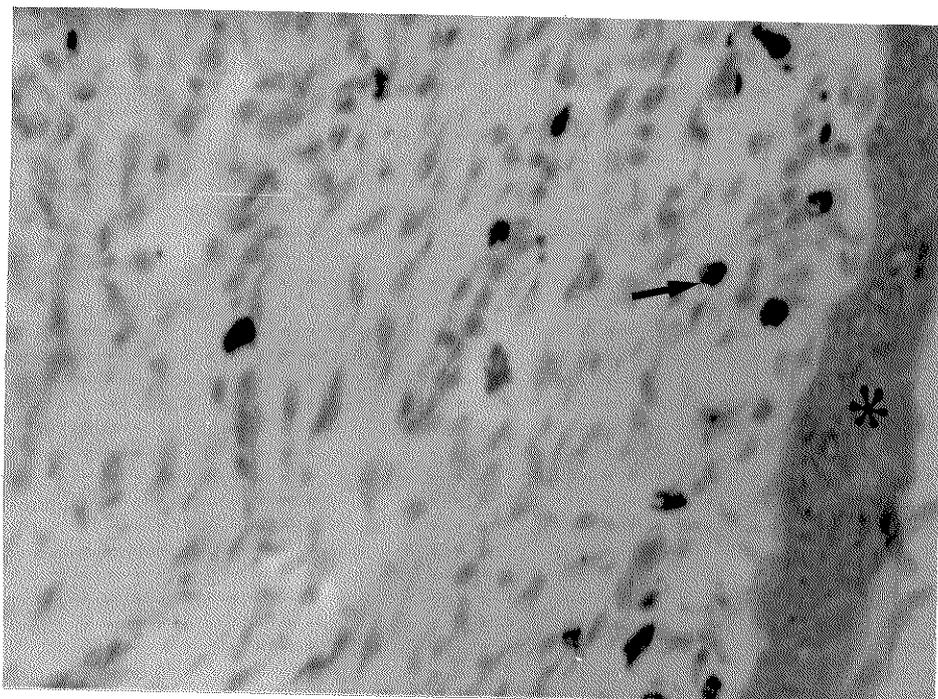


Figura 16: Secção transversal de papila mamária de rata com 50 dias de idade, exibindo mastócitos (→) situados na periferia do mamilo, próximos ao epitélio estratificado queratinizado (*). Azul de Toluidina a pH 4.0. 740X.

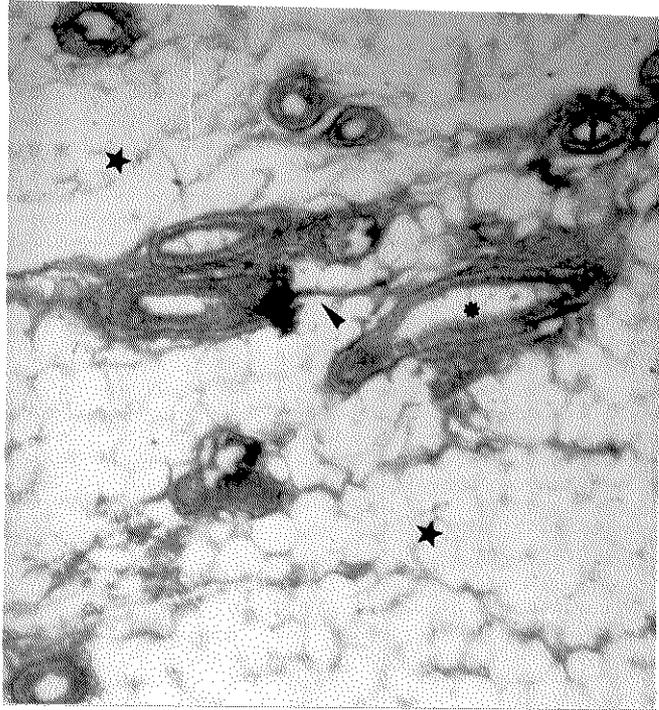


Figura 17: Secções longitudinais (*) e transversais (t) de ductos. de glândula mamária de rata com 50 dias de idade. Fibras de colágeno tipo I (em marrom), emitem longos prolongamentos (►) fixando o parênquima glandular ao tecido adiposo (★). Impregnação por Prata. 185 X.

3.3.3 Grupo C (ratas que amamentaram durante 15 dias)

Secções glandulares, coradas com HE, exibiam o mamilo com contornos irregulares, devido as evaginações emitidas pela papila conjuntiva. Estas mostraram-se recobertas, externamente, por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (figura 18). Podiam ser contados de 15 a 20 ductos galactóforos acessórios que dispunham-se ao redor de um conduto excretor central de maior diâmetro. Os espaços entre os mesmos eram preenchidos por um conjuntivo relativamente denso, onde se encontravam fibroblastos maduros (figura 18).

Alterações hormonais induzidas pela prenhez e lactação levaram ao completo desenvolvimento do sistema canalicular, tornando o parênquima hipertrofiado e constituído por lóbulos, alvéolos secretores condutos excretores inter e intralobulares e por tecido adiposo, que passou a apresentar uma distribuição esparsa (figura 19).

A matriz colagênica que envolvia este sistema de ductos, era formada por massas cordonais dicotômicas, que se dispunha concentricamente em torno dos ductos deixando entre si irregulares espaços intersticiais. Nestas porções foram identificadas glândulas sebáceas sem pelo e fibras de músculo liso, estas distribuíam-se circularmente na papila mamária (figura 20).

Ao nível do parênquima glandular, localizado na porção proximal, o tecido conjuntivo de sustentação emitia septos interlobulares e intralobulares, que delimitavam lóbulos e alvéolos respectivamente. Septos interlobulares apresentavam-se mais largos e formados por tecido conjuntivo relativamente frouxo, com um grande número de fibroblastos jovens.

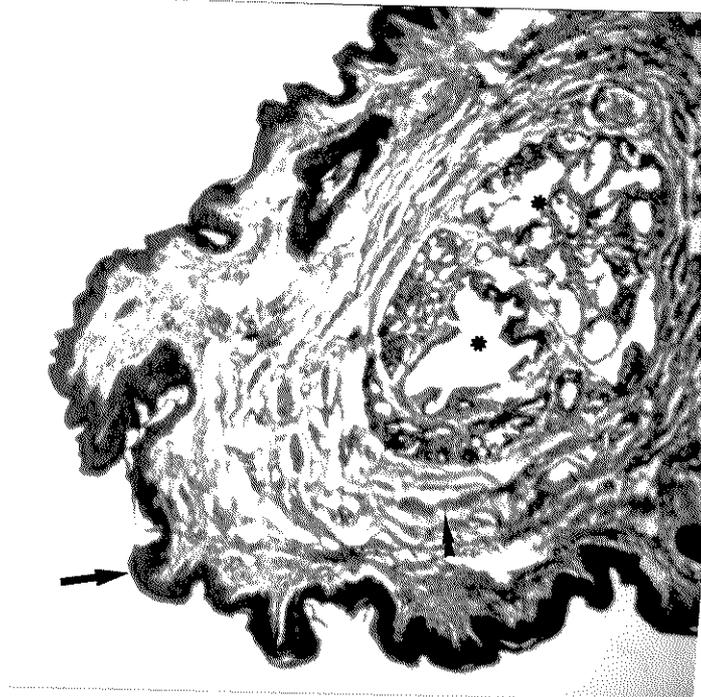


Figura 18: Secção transversal de mamilo de rata submetida a período de amamentação de 15 dias. a papila conjuntiva emite evaginações, que são recobertas pelo epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. A matriz colagênica forma massas cordonais (►) que dispõem-se circunferencialmente ao conjunto de canais excretores. Hematoxilina/eosina. 110X.

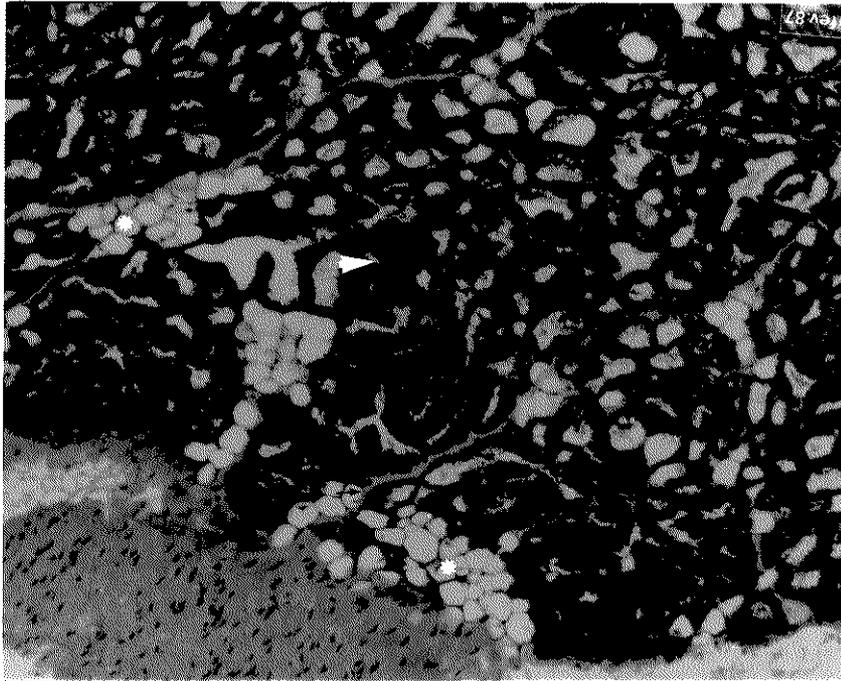


Figura 19: Porção de mama submetida a 15 dias de amamentação . Esta leva uma atenuação dos septos interlobulares (→), e a uma hipertrofia do tecido epitelial, passando o tecido adiposo (*) a apresentar uma distribuição esparsa. Hematoxilina eosina 30X.

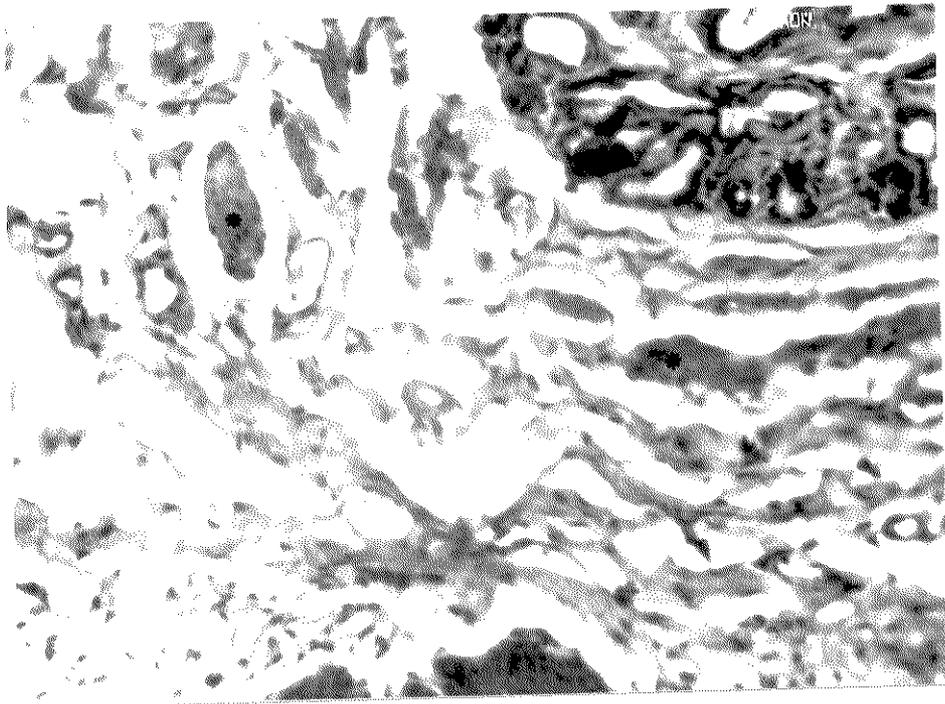


Figura 20: Secção transversal de papila mamária de rata que amamentou por 15 dias, exibindo feixes de músculo liso (●) que se dispõem de forma concêntrica aos ductos excretores (★). Tricrômico Mason. 400X.

Este aspecto variava em função da porção que estava sendo examinada, e era principalmente localizado nas porções mais centrais. Regiões distais apresentavam sinais de remodelação e tinham a matriz colagênica descontínua e com uma eosinofilia menos acentuada.

Os septos intralobulares apresentavam-se estreitos e com uma forte eosinofilia. Eram formados por um tecido conjuntivo de aspecto denso, onde localizavam-se fibroblastos maduros. Este aspecto mostrava-se uniforme, não se notando diferenças significativas entre as porções centrais e distais da glândula.

O epitélio glandular ativo apresentou algumas variações histológicas, pois as partes que o constituíam, não estavam no mesmo estado funcional. Nas porções que exibiam o lumên dilatado e repleto de leite, as células epiteliais destas regiões eram baixas, enquanto nas áreas onde o lumên era estreito, o epitélio mostrava-se mais colunar.

A utilização de AT evidenciou um epitélio corado cujo citoplasma apresentava uma acentuada basofilia. O número de mastócitos mostrava-se menor na região apical do mamilo, e maior em sua base, e com uma distribuição essencialmente periférica. Sua distribuição apresentou-se relativamente constante por toda a árvore mamária, não havendo diferenças quanto ao número destas células entre as regiões próximas e distantes ao mamilo (figuras 22 e 23).

A impregnação metálica evidenciou fibras de colágeno tipo I, que passaram a exibir uma tonalidade marrom. Na papila mamária, as fibras mostravam-se formadas por irregulares massas cordonais altamente compactadas.

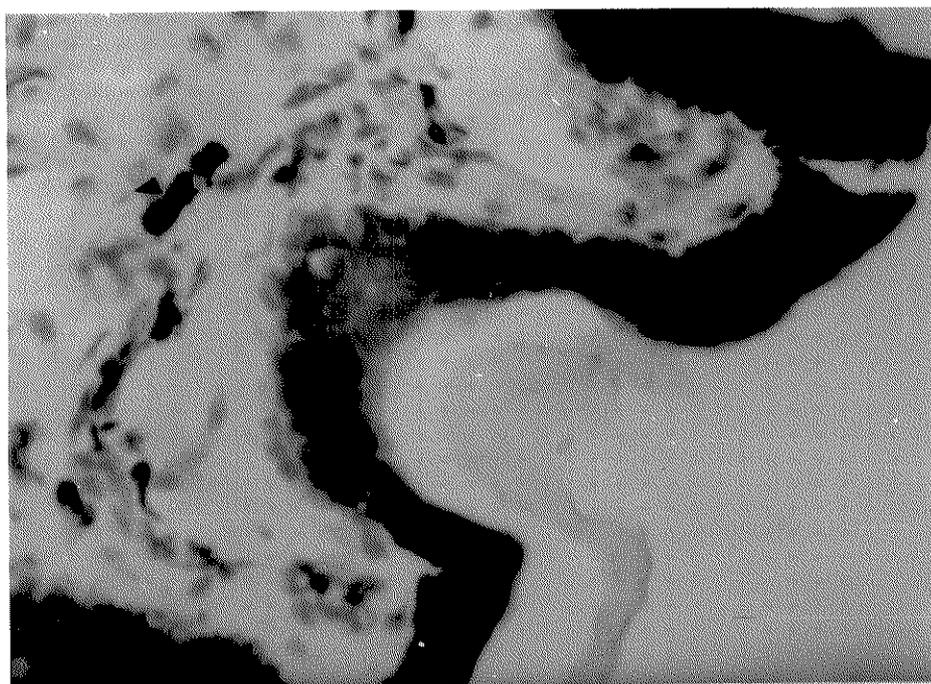


Figura 21: Secção transversal de mamilo de rato que amamentou por 15 dias. Mastócitos (➤) corados metacromaticamente mostram-se presentes na periferia da papila mamária. Azul de Toluidina a pH 4.0. 740 X.

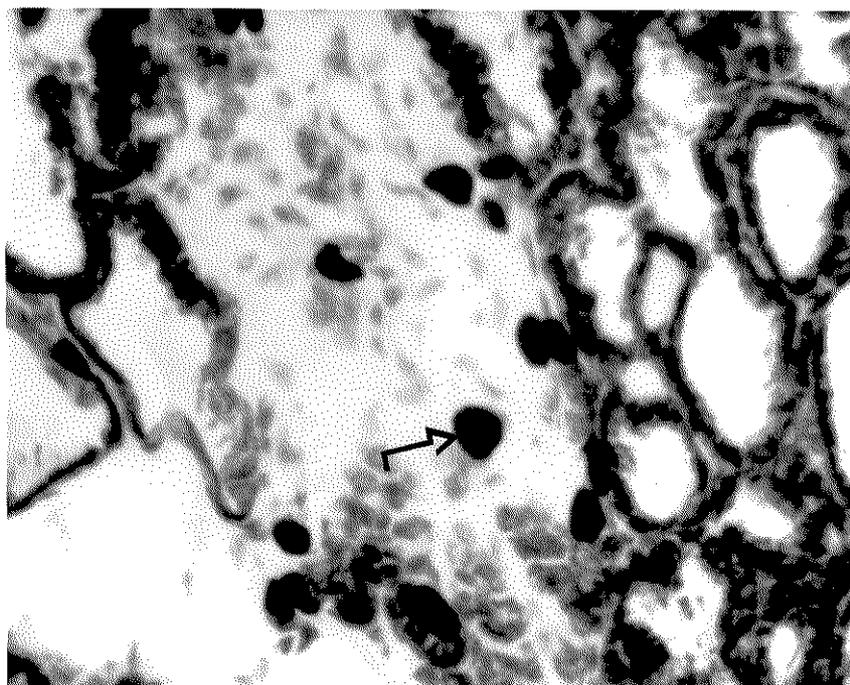


Figura 22: Secção ao nível da porção alveolar. Mama de rata submetida a 15 dias de amamentação. Mastócitos (→) presentes principalmente nos septos interlobulares. O epitélio glandular exibe uma acentuada basofilia. Azul de Toluidina, a pH 4,0. 740 X.

Os septos interlobulares apresentavam uma maior espessura junto ao septos primários, que realizavam a sustentação da glândula a fáscia muscular subcutânea, os primeiros delimitavam lóbulos com diferentes formatos e tamanhos (figuras 24 e 25).

Os septos intralobulares, com a impregnação metálica exibiram fibras reticulares, possivelmente associadas a uma glicoproteína estrutural não colagênica. O colágeno tipo III dispunha-se ao redor das porções alveolares, mas não foi possível a observação de fibrilas individualizadas por estas apresentarem um elevado nível de empacotamento (figura 25). Embora a área ocupada por estas fibras não tenha sido quantificada, pode ser salientado que a análise morfológica possibilitou a observação de um maior número das mesmas em torno das porções secretoras.

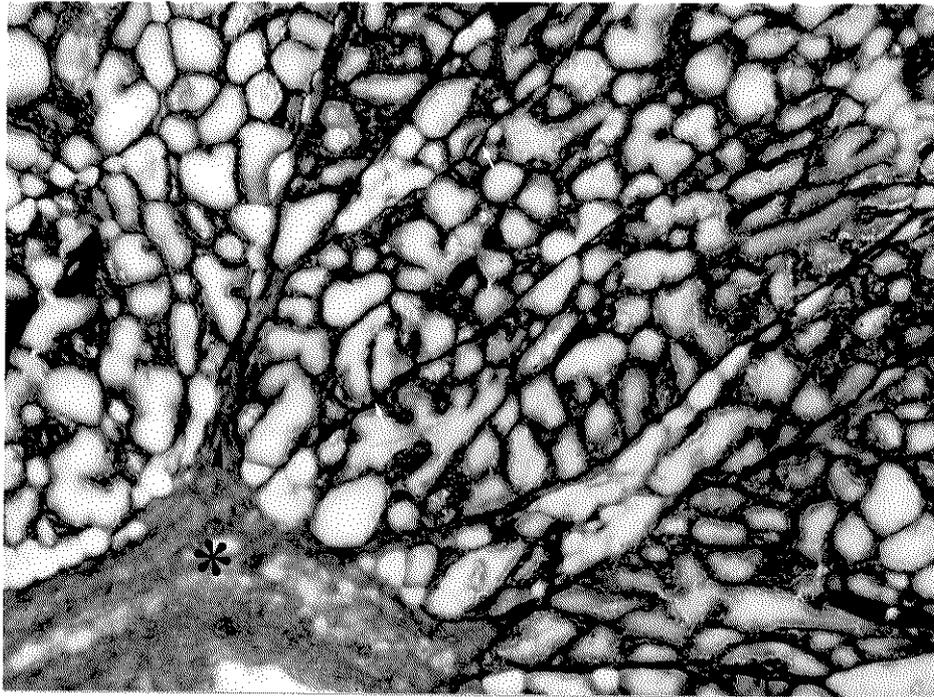


Figura 23: Septos primários (*) emitem prolongamentos para o interior da árvore mamária, formando os septos interlobulares (►). Porções alveolares são envoltas por um complexo de fibras reticulares (→) provavelmente associadas a uma GPE. Impregnação por Prata. 90 X.

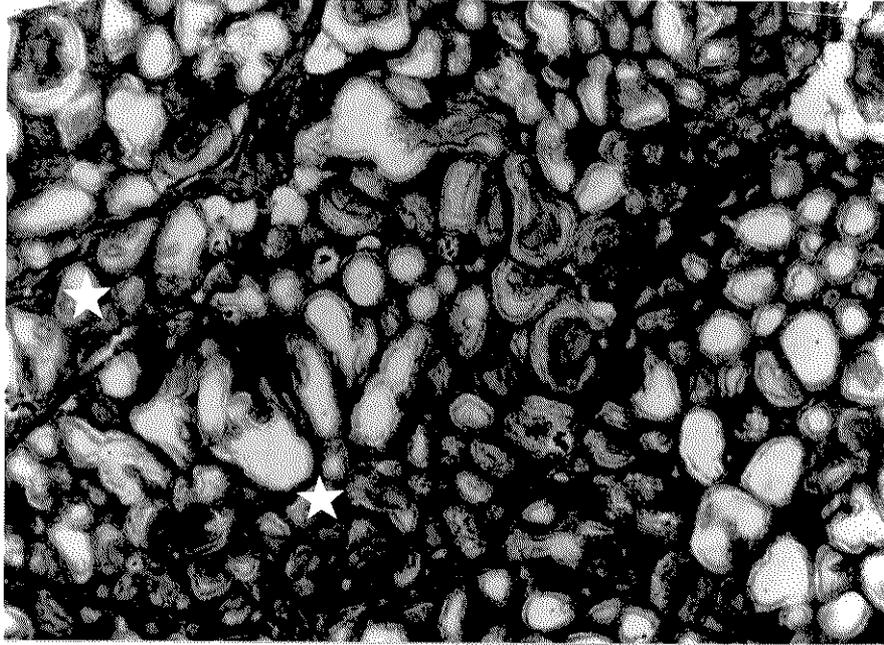


Figura 24: Secção de região alveolar de mama de rata pertencente ao grupo C. Os septos interlobulares (*) separam lóbulos (★) que apresentam tamanhos diferentes, e formatos irregulares. Septos e porções alveolares mostram-se íntegros. Fibras reticulares mostram-se altamente empacotadas. Impregnação por Prata. 110X.

Figura 25: Porção alveolar de mama de rata submetida a 72 horas de regressão. Os septos interlobulares (), exibem fibras colagênicas irregulares e contorcidas. O quadrante inferior direito exibe um destes septos no qual as fibras foram completamente reabsorvidas. Hematoxilina eosina. 460 X.

3.3.4 Grupo D (mamas submetidas a 72 horas de regressão)

As papilas mamárias, coradas com HE, mostravam-se idênticas às encontradas no grupo apenas submetido ao período de amamentação. Exibiam um contorno irregular com o colágeno dispondo-se de forma circular ao canais galactóforos, sendo que estas fibras não apresentavam sinais de degradação.

A árvore mamária ficou reduzida, em diversas regiões, ao arcabouço conjuntivo, onde ao nível dos septos interlobulares podiam ser notados um maior número de macrófagos. Os fibroblastos mostravam-se mais frequentemente localizados nos septos intralobulares.

A matriz colagênica exibia fibras interrompidas e irregularmente contorcidas, que mostravam uma eosinofilia reduzida quando comparadas ao grupo submetido apenas à amamentação, tornando as porções alveolares parcialmente isoladas, mas com septos intralobulares integros, ou quase não exibindo alterações morfológicas (fig. 25).

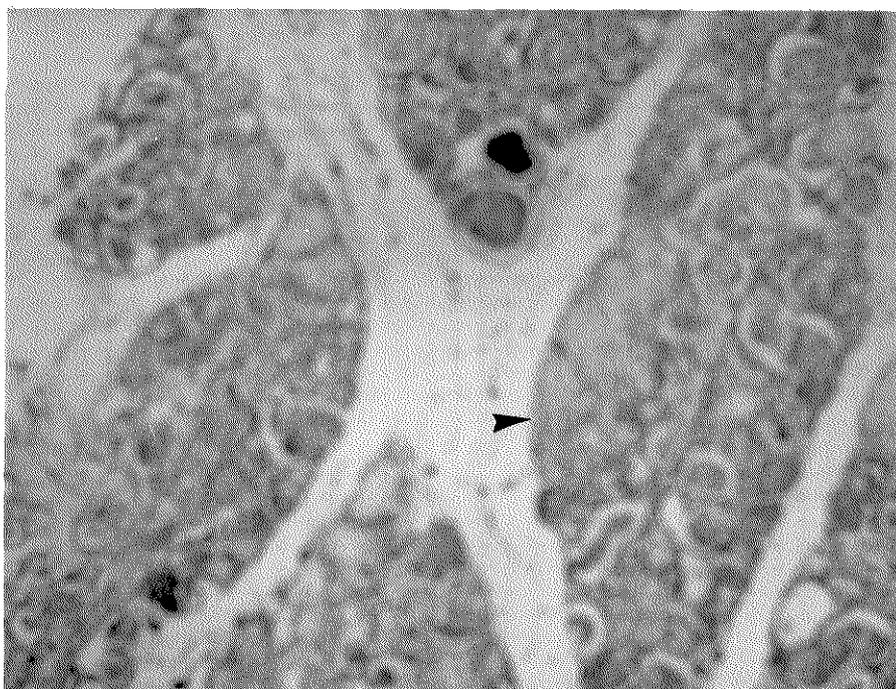


Figura 26: Secção de parênquima glandular de rata submetida a período de regressão. Porções alveolares (►) exibem uma reduzida basofilia. Azul de Toluidina a pH 4.0. 460X.

O emprego de azul de Toluidina pH 4.0, salientou mastócitos posicionados perifericamente aos lóbulos glandulares, e praticamente não encontrados nas regiões de septos intralobulares (figura 26). Estas células estavam presentes em maior número na papila mamária, onde sua presença aumenta da porção apical para a região basal do mamilo, e mantendo uma disposição essencialmente periférica.

A impregnação metálica salientou o aspecto das fibras que separavam lóbulos adjacentes, que mostravam uma grande variação em sua espessura e eram irregularmente contorcidas, e apresentavam uma coloração marrom.

As fibras reticulares, presentes entre os ácinos glandulares, apresentaram um aspecto flexuoso e de comprimento variado e mostraram-se menos compactadas do que as observadas no grupo de ratas submetido somente a amamentação (Fig. 27).

O tratamento enzimático com α -amilase bruta salientou a morfologia irregular das fibras de reticulina (Fig. 28).

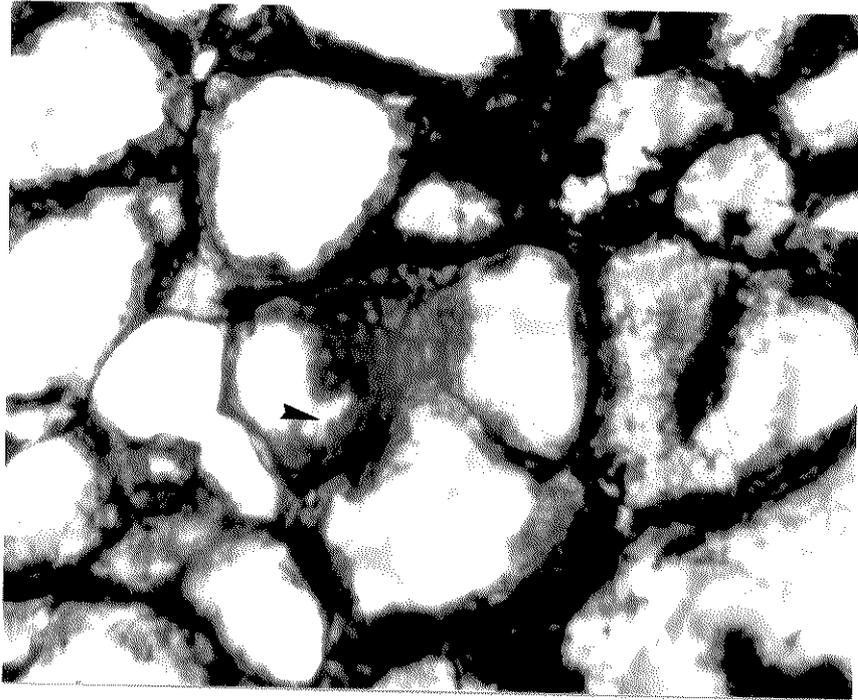


Figura 27: Secção de parênquima glandular pertencente a rata do grupo D. O epitélio mostra-se parcialmente reabsorvido (▶). Impregnação por prata. 580X.

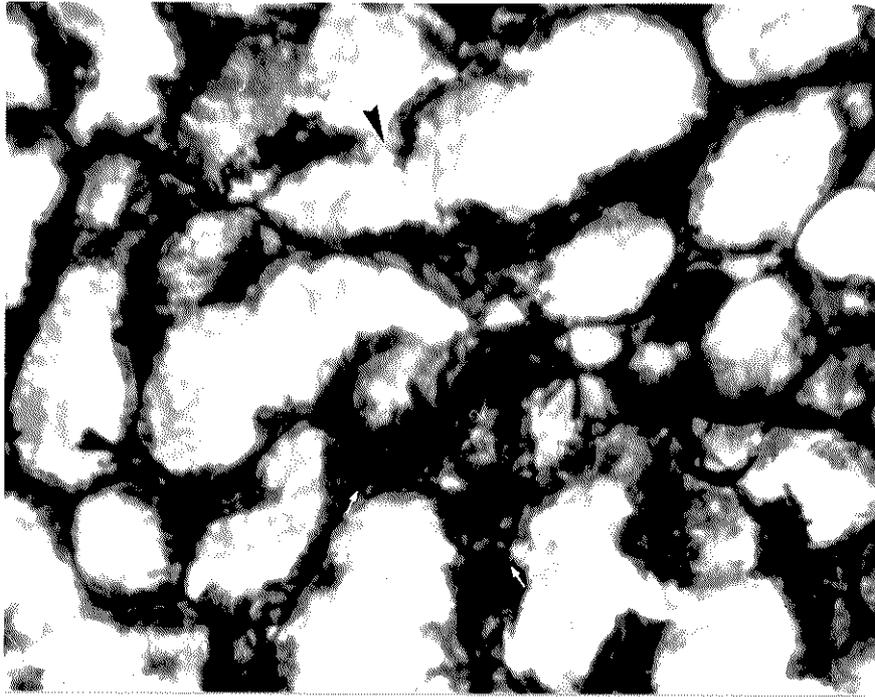


Figura 28: Secção de parênquima mamário, onde são notadas fibras reticulares parcialmente distendidas (→). Impregnação por prata, com pré-tratamento com α -amilase. 580X.

3.3.5 Análise Quantitativa

Quantificação de Áreas Ocupadas por Colágeno Tipo I Os valores das áreas médias ocupadas pelo colágeno tipo I, no mamilo e no estroma glandular, são apresentados na tabela 01.

Ao nível de significância empregado ($P = 0,01$) estas não diferiam significativamente entre as ratas que apresentavam o mesmo estado fisiológico.

As áreas médias calculadas para os mamilos de animais pertencentes ao grupo A não diferiam significativamente das encontradas para a mesma porção glandular de ratas do grupo C, sendo ainda que as áreas médias de papilas mamárias do grupo B não diferiam de forma significativa de mamilos de animais submetidos a regressão.

Independentemente do estado fisiológico, as papilas mamárias apresentaram áreas médias que eram significativamente maiores que as calculadas para os estromas glandulares.

A este nível de significância, a área média do estroma glandular, proximal não diferia de forma significativa em relação a mesma porção glandular de animais pertencentes ao grupo C. Tendo-se ainda que o estroma distal dos animais do grupo D não diferiram significativamente do estroma distal do grupo C.

As áreas médias ocupadas pelo colágeno, no mamilo e no estroma glandular são representadas de forma esquemática na figura 30.

Tabela 1: Valores médios das áreas (μm^2) ocupadas pelo colágeno tipo I.

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Comparação
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	
Mamilo grupo A	30880 \pm 4536	28400 \pm 3143	29460 \pm 4664	(a)
Mamilo grupo B	22920 \pm 5153	22720 \pm 5893	22680 \pm 4615	(b)
Mamilo grupo C	33040 \pm 2295	32400 \pm 3244	32210 \pm 3757	(a)
Mamilo grupo D	24520 \pm 1923	23360 \pm 2200	23740 \pm 1847	(b)
Estroma proximal grupo A	10320 \pm 2189	8880 \pm 2556	9400 \pm 3076	(c)
Estroma proximal grupo B	8160 \pm 3384	8000 \pm 3532	8760 \pm 3744	(c, d)
Estroma proximal grupo C	7600 \pm 1484	7600 \pm 1600	7440 \pm 1635	(c, d)
Estroma proximal grupo D	5480 \pm 1222	5240 \pm 873	5440 \pm 1180	(c, e)
Estroma distal grupo C	4840 \pm 932	4960 \pm 983	4920 \pm 597	(d, e)
Estroma distal grupo D	3240 \pm 9848	3400 \pm 984	3160 \pm 716	(e)

Número de medidas por rata e estado fisiológico = 10; Não há diferença ao nível de $P = 0.01$ para nenhuma das diferentes ratas de mesmo estado fisiológico; Na coluna "comparação", letras iguais (a-e) indicam não haver diferenças significativas ao nível de $P = 0.01$ para as ratas nesses estados fisiológicos.

Quantificação de Mastócitos O número médio de mastócitos encontrados no mamilo, e no estroma conjuntivo de glândula mamária de rata é apresentados na tabela 02.

Ao nível de significância empregado não foram encontradas diferenças significativas no número médio destas células dentre as ratas pertencentes ao mesmo grupo.

Comparando-se o número médio de mastócitos contados nos mamilos, somente o grupo B diferia significativamente dos demais, sendo que o número destas células nos mamilos dos grupos C e D não diferiam significativamente do número médio encontrado ao nível do estroma de ratas dos grupos A e B.

O estroma proximal de animais submetidos a amamentação (grupo C), não mostrou diferir significativamente, quando comparado a mesma porção glandular de mama de ratas pertencentes ao grupo D, sendo encontrado um número de mastócitos que são significativamente maiores que os encontrados nas porções distais do grupo D.

A figura 34 representa esquematicamente o número médio de mastócitos encontrados no mamilo e no estroma mamário.

Tabela 02: Valores médios do número de mastócitos encontrados no mamilo e no estroma de glândulas mamárias de ratas.

	Rata 1	Rata 2	Rata 3
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
Mamilo grupo A	3,14 \pm 0,14 (a)	3,20 \pm 0,21 (a)	3,21 \pm 0,21 (a)
Mamilo grupo B	4,34 \pm 0,50	4,49 \pm 0,36	4,36 \pm 0,42
Mamilo grupo C	2,77 \pm 0,32 (a, b)	2,66 \pm 0,29 (b)	2,65 \pm 0,36 (b)
Mamilo grupo D	2,60 \pm 0,17 (b)	2,79 \pm 0,72 (a, b)	2,72 \pm 0,31 (b)
Estroma proximal A	2,61 \pm 0,27 (b)	2,67 \pm 0,20 (b)	2,80 \pm 0,22 (a, b)
Estroma proximal B	2,64 \pm 0,17 (b)	2,69 \pm 0,19 (b)	2,38 \pm 0,82 (b, c)
Estroma proximal C	1,90 \pm 0,40 (c)	2,08 \pm 0,27 (c)	2,18 \pm 0,20 (c)
Estroma proximal D	1,98 \pm 0,20 (c)	2,04 \pm 0,15 (c)	2,29 \pm 0,18 (c)
Estroma distal C	2,46 \pm 0,20 (b)	2,42 \pm 0,19 (b, c)	2,56 \pm 0,13 (b, c)
Estroma distal D	1,42 \pm 0,21	1,51 \pm 0,29	1,52 \pm 0,27

Número de medidas por rata e estado fisiológico = 10; Não há diferença ao nível de $P < 0,01$ para nenhuma das diferentes ratas de mesmo estado fisiológico; Letras iguais (a-c) indicam não haver diferenças significativas ao nível de $P < 0,01$ para as ratas nesses estados fisiológicos.

4 Discussão

4.1 Considerações Gerais

Este trabalho demonstrou que a matriz extracelular de glândulas mamárias de ratas sofrem alterações quantitativas e morfológicas durante o crescimento, amamentação e a instalação de processos regressivos provocados pela separação da ninhada. Os dados contidos no mesmo sugerem que mastócitos poderiam estar envolvidos na migração de células epiteliais, as quais formariam ductos galactóforos acessórios e também participariam dos processos iniciais de remodelação do estroma mamário.

4.2 Extração de Gordura

A diminuição do tecido adiposo observado nos grupos submetidos a amamentação e o aumento seguido pela regressão, devem estar relacionados com o estado fisiológico das ratas, pois durante o período de lactação provavelmente houve a incorporação de lipídios ao leite, o que esta de acordo com os dados descritos por FORSYTH & TURVEY (1984).

No presente trabalho detectou-se que é durante as 72 horas do período de regressão que os níveis de gordura começam a ser res-

tabelecidos. Isto pode ser devido ao fato de que paralelamente à reabsorção das porções epiteliais ocorre a substituição destas por tecido adiposo, como afirmado por BLOVOM & FAWCET (1975).

4.3 Liberação de Colagenase

A liberação de colagenase foi estudada por GROSS & LAPIERE (1962) durante a regressão de caudas de girino *in vitro* colocadas sobre um gel de colágeno. Esses autores consideraram que a degradação do colágeno ocorria em áreas ao redor do explante, que deixaram de apresentar uma coloração opalescente.

No presente trabalho, a distinção entre as regiões degradadas e as não degradadas foi revelada através da coloração com Xy- lidine Ponceau, que oferece uma melhor visualização, uma vez que este corante liga-se aos radicais catiônicos disponíveis no pH utilizado para a coloração, como por exemplo os radicais amino das proteínas (VIDAL, 1970; PIMENTEL *et alii*, 1981).

A fixação das peças por métodos químicos foi evitada pois as soluções normalmente empregadas (formaldeído a 10% e etanol ácido acético 3:1 v v) apresentam valores de pH 3.35 e 2.05 respectivamente. Sabe-se que altas concentrações hidrogeniônicas inibem a ação da colagenase, uma vez que esta enzima requer um pH entre 7.5 e 8,5 para que possa apresentar atividade hidrolítica (BIREDAL-HANSEN *et alii*, 1976; GROSS, 1985; HARRIS, 1986). Utilizando-se este método não se detectou a ação da colagenase nos grupos de animais com 25 e 50 dias de idade, nem no grupo amamentação.

De acordo com dados citados por RUSSO & RUSSO (1987) as glândulas mamárias, de animais com estas idades, sofrem alterações morfológicas. Estas alterações poderiam envolver a ação de colagenase, mas em concentrações baixas, não possibilitando sua detecção pelo método utilizado. Já nos processos fisiológicos em que a liberação de colagenase é intensa (SHIMIZO & HOKANO, 1987) como a que ocorre no período de 72 horas, a ação desta enzima pode ser verificada.

Embora tenha sido constatada uma maior degradação das películas de gelatina nas regiões próximas ao mamilo, verificou-se que as alterações morfológicas eram mais drásticas na região distal. Este fato

sugere a existência de uma programação na liberação da colagenase: se iniciaria na porção distal antes das 72 horas empregadas como período regressivo. Mecanismo semelhante em termos temporais foi sugerido por HELMINEN e colaboradores (1968) para as enzimas fosfatase ácida, aril sulfatase, as quais apresentam uma atividade maior entre 48 e 72 horas após o desmame da ninhada. Neste período, ocorre uma sensível diminuição no número de células do parênquima mamário a qual iniciava-se a partir da porção distal da glândula.

O fato da digestão da gelatina não ter sido uniforme fazendo com que fossem visualizados pontos isolados de degradação sugere que apesar do processo regressivo ser disparado a partir das porções distais, este se instalaria em diferentes pontos desta porção da glândula.

4.4 Análise de Mastócitos

Mastócitos foram observados pela primeira vez por Ehrlich em 1879, que ressaltou a afinidade deste tipo celular por corantes básicos (FULLMER, 1965). A alta afinidade dos mastócitos por corantes catiônicos tais como azul de toluidina, tionina, azul de alcian, é devido à elevada concentração de poliânions encontrados no interior de grânulos localizados em seu citoplasma, podendo-se destacar: glicosaminoglicanos ácidos sulfatados (LEWIS *et alii*, 1973) e heparina (YURT *et alii*, 1977). Além desses poliânions, os grânulos contêm histamina e enzimas proteolíticas (LINCH *et alii*, 1978).

A elevada metacromasia apresentada pelos mastócitos tem sido um dos principais fatores que os diferenciam de outros tipos celulares. Dentro de uma mesma população, o número de células que apresentam metacromasia pode variar em função da solução fixadora empregada na preservação tecidual (BECKER *et alii*, 1985). Isto levou esses autores a sugerirem a presença de pelo menos duas populações de mastócitos em pele de cães atópicos.

O fixador empregado mostra grande importância na preservação de mastócitos, sendo descrito na literatura que para a evidência de seus grânulos, na espécie humana ou em cães, é necessário a presença de íons de chumbo na solução fixadora e mesmo estas células apresentando uma ampla distribuição, muitas vezes não são observados por

métodos de fixação e coloração de rotina (WEISS & GREEP, 1975; BECKER *et alii*, 1985). Apesar de ser sugerido por esses autores a utilização de soluções fixadoras contendo íons de chumbo, no presente trabalho a utilização de formaldeído a 10% e de etanol/ácido acético 3:1 v/v mostraram uma excelente ação fixadora, permitindo a visualização de mastócitos mesmo quando as secções teciduais eram coradas com hematoxilina e eosina.

O aumento do número médio de mastócitos encontrado em mamilos de ratas pertencentes ao grupo B, comparados aos demais, pode estar relacionado à preparação para uma possível prenhez, pois nesses animais, o primeiro ciclo estral ocorre quando estes apresentam uma idade em torno de 40 dias (RUSSO & RUSSO, 1987). Desta forma, as células epiteliais presentes nos canais galactófaros proliferariam sob o estímulo de estrógeno (WEISS & GREEP, 1981) e a migração destas poderia ser facilitada devido ao estímulo provocado pela heparina liberada pelos mastócitos. Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de AZIZKHAN e colaboradores (1980) que relacionaram a heparina com a migração de células endoteliais nos processos de neovascularização.

Os mastócitos encontrados no estroma proximal no grupo de amamentação (grupo C), pode estar relacionado com a necessidade de histamina, uma vez que este mediador químico mostra-se associado com o aumento da permeabilidade capilar, provavelmente promovendo a formação de fendas entre as células endoteliais conforme sugerido por WEISS & GREEP (1981). No caso do presente estudo, este aumento da permeabilidade induzido pela histamina, facilitaria a transferência de anticorpos e linfócitos para o leite.

A diminuição do número de mastócitos observada ao nível do estroma distal na fase de regressão (grupo D) era esperada, uma vez que não existiam mais os estímulos que justificassem a necessidade de um número maior destas células.

4.5 Remodelação de Fibras Colagênicas

Sabe-se que ocorre um aumento do parênquima glandular durante o desenvolvimento da glândula com hipertrofia do mesmo durante a prenhez e lactação (BLOOM & FAWCET, 1971). Neste trabalho, a

tendência a diminuição dos valores de áreas médias ocupadas pelo colágeno I no estroma proximal dos grupos B, C e D comparados ao grupo A pode ser explicada pelo fato de que nos animais com 25 dias de idade, considerados pré-púberes a porção do parênquima glandular é reduzida com conseqüente predomínio de colágeno. À medida que se processa o desenvolvimento fisiológico, com a entrada dos animais no ciclo estral (grupo B) ocorre, por ação hormonal, o aumento das áreas ocupadas pelo parênquima, ocorrendo desta forma a redução das áreas preenchidas pelo colágeno. Na fase de amamentação há aumento acentuado da porção secretora, reduzindo as áreas ocupadas pelo colágeno. No período de regressão, seria esperado ocorrer a redução da porção secretora da glândula com conseqüente aumento de tecido conjuntivo. No entanto, este aumento esperado não ocorreu com 72 horas de período regressivo, sendo contudo detectado na porção distal do estroma. Este resultado está coerente com dados de HELMINEN e colaboradores (1968) que afirmam que o processo de regressão do epitélio se inicia na porção distal.

Com relação às fibras reticulares, o aumento detectado no período de amamentação se justifica pois essas fibras agem como suportes adicionais auxiliando na manutenção das porções glandulares que mostram-se em constante deformação nesse período, conforme sugere também RADNOR (1972). O aumento das fibrilas nesse período e também na prenhez acompanhando o crescimento do sistema lobuloalveolar foi descrito por DEMPSEY e colaboradores (1947).

O fato de não se observar fibrilas individualizadas no grupo de amamentação tanto no material submetido ao tratamento por α -amilase quanto no não tratado, enquanto no grupo de regressão as fibrilas puderam ser individualizadas após aquele tratamento, sugere a associação dessas fibrilas com glicoproteínas estruturais não colagênicas. Esta visualização foi possível no período de regressão provavelmente devido à reabsorção dessas glicoproteínas como parte dos eventos envolvidos no processo de regressão da glândula mamária.

A papila mamária exibiu praticamente o mesmo aspecto histológico em todos os grupos estudados, cumprindo salientar somente a presença de canais galactóforos acessórios nos grupos submetidos a amamentação, pois as células formadoras destes ductos passam a apresentar uma maior atividade proliferativa durante a prenhez, sob o estímulo

de estrógenos.

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho e informações existentes na literatura propomos que durante a fase de regressão, mastócitos, independentemente seu número seriam necessários para interagirem com fibroblastos, para induzir início da liberação de colagenase. Esta via de interação mastócito/fibroblasto foi citada por FULLMER (1965) afirmando que mastócitos caracterizados como atípicos seriam células que fagocitaram material por eles secretado. VIDAL (1967) cita que fibroblastos passam a metabolizar heparina após fagocitarem grânulos de mastócitos.

A hipótese de interação mastócito-fibroblasto levantada neste trabalho é corroborada pelas observações de GREENBERG & BORNSTOCK (1983) que descrevem que fibroblastos passam a degradar colágeno após englobarem material secretado por mastócitos. Neste trabalho foi observada a presença de macrófagos em quantidade expressiva na fase de regressão. Estes seriam atraídos pelos peptídeos derivados do colágeno sob a ação de colagenase liberada pelos fibroblastos. Um aumento destes fagócitos mononucleares na fase de regressão de glândula mamária de cabra, foi obtido por RAHM e colaboradores (1984); GEYER e colaboradores (1986). O efeito quimiotático para macrófagos exercido pelos peptídeos de colágeno que foram liberados pela ação da colagenase foi sugerido por CHANG & HOUCK (1970) e HOUCK & CHANG (1971) em processos inflamatórios.

Além disso, estas células sob condições patológicas semelhantes à reação inflamatória (SAVION *et alii*, 1984), ou sob condições normais, tais como nos processos de reparo, remodelação tecidual (WERB & GORDON, 1976b) translocam-se através do sistema circulatório para a região afetada (ROELS, 1981) indicando que deve haver uma atração quimiotática para estas células que uma vez presentes na porção afetada fagocitariam os peptídeos, os quais seriam digeridos.

Sabe-se que estas células apresentam uma rica bateria de enzimas hidrolíticas (OHKUMA & POOLE, 1978; SCHNYDER & BAGGIOLINI, 1978), produzem e secretam proteases neutras tais como: ativadores de plasminogênio (UNKELESS *et alii*, 1974; WERB, 1978), elastase (WERB & GORDON, 1975a). As proteases neutras presentes em seus lisossomos degradam componentes da matriz extracelular tais como, elas-

tina, glicoproteínas estruturais não colagênicas, colágeno (WERB *et alii*, 1980a; WERB *et alii*, 1980b), e também glicosaminoglicanos ácidos (LAUB & VAES, 1982, SAVION *et alii*, 1984).

Desta forma, pelos resultados de que dispomos, não se pode descartar ainda a possibilidade de que após iniciada a atividade hidrolítica do fibroblasto por estímulo de mastócitos esta seja mantida pela interação do fibroblasto com macrófagos. Isto é sugerido com base na proposição de LAUB & VAES (1982), que demonstraram que macrófagos estimulam fibroblastos a ativarem plasminogênio, e uma vez que a plasmina é também uma ativadora de collagenase, fica claro que macrófagos apresentariam um papel potencial na ativação de funções proteolíticas em fibroblastos. A participação de fibroblastos em processos de remodelação foi sugerida também por TEN CATE (1972) e TEN CATE & DEPORTER (1975).

GROSS (1985) sugere que a forma pela qual enzimas degradativas são liberadas para o meio extracelular dependeria de uma localização temporal e espacial de células tais como macrófagos, fibroblastos, e da forma pela qual estas células interagiriam com os componentes estruturais formadores da matriz extracelular.

Em resumo, com base nos resultados levantados no presente trabalho e nos dados obtidos na literatura, sugere-se que a degradação dos componentes da matriz extracelular, em mama de rata na fase de regressão venha da interação entre macrófagos e fibroblastos.

Em vista dos resultados deste trabalho, esta interação deve ocorrer apenas na fase de regressão, e baseando-se nos fatos discutidos acima, pode ser sugerido que estas células estariam programadas para se intercomunicarem somente sob determinadas condições fisiológicas, podendo também ser esperado que as diferentes enzimas proteolíticas sejam também secretadas de forma degradativa e sequencial, não sendo de se esperar qualquer tipo de ação degradativa antes que os sinais para remodelação sejam disparados.

O fato de não ser observados macrófagos nem sinais de remodelação nas glândulas de ratas com 25 e 50 dias de idade sugere que a glândula quiescente teria sua matriz colagênica mantida de forma intacta devido à presença de inibidores de collagenase presentes na matriz extracelular (HARRIS, 1987).

A leve remodelação observada nas porções glandulares distais ao mamilo de ratas submetidas ao período de amamentação seriam devido à gradual diminuição da sucção que ocorreu pela procura de outras formas de alimentação que a ninhada passou a ingerir (WEISS & GREEP, 1981).

5 Conclusões

1. O tecido conjuntivo presente em mama de rata sofre alterações quantitativas e morfológicas durante o crescimento e regressão do parênquima mamário.
2. A glândula mamária inicia o processo de regressão a partir de suas porções distais em diferentes pontos desta região glandular.
3. O crescimento do epitélio glandular, a prenhez acompanhada por posterior lactação levam a uma diminuição da área média ocupada pelo colágeno tipo I.
4. O conjuntivo de aspecto mais denso que envolve os alvéolos é formado por fibras reticulares, provavelmente associadas a glicoproteínas estruturais não colagênicas.
5. A presença de mastócitos, macrófagos e colágeno degradado no período de regressão possibilitou propor um mecanismo de interação para remodelação envolvendo esses elementos e os fibroblastos, através de uma ação programada envolvendo inicialmente mastócitos-fibroblastos e a seguir fibroblasto-macrófagos.

6. Músculo liso e ductos lactóforos acessórios são encontrados em mamilos durante o período de amamentação, sendo que somente o segundo persiste durante o estágio regressivo.

6 Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar as alterações histológicas ocorridas na matriz extracelular, estimar a área ocupada pelo colágeno tipo I, por intermédio de métodos estereológicos, bem como verificar o número e a distribuição de mastócitos durante o crescimento e regressão normais de glândulas mamárias de ratas. Foram usados cortes impregnados por prata, ou submetidos a técnicas gerais e citoquímicas. Constatou-se que independentemente da idade, ou do estado fisiológico, que o colágeno ocupava uma maior área média em mamilos que nos estromas glandulares, sendo que paralelamente ao crescimento do parênquima ocorria uma diminuição da área média ocupada por esta proteína no estroma mamário. Esta diminuição tornou-se mais acentuada durante os processos regressivos. Em ratas do grupo C (amamentação) notou-se uma grande concentração de fibras reticulares (estimadas visualmente), estas contornavam alvéolos e apresentavam um aspecto compacto. Com a instalação dos processos regressivos fibrilas individualizadas podiam ser observadas. Foi encontrado um maior número de mastócitos em mamilos de animais com 50 dias de idade, sendo contado um menor número destas células ao nível do estroma distal de mamas submetidas à regressão. O extenso coxim adiposo, que envolvia glândulas mamárias de ratas com 25 e 50, tornou-se reduzido passando a apresentar uma distribuição esparsa durante o período de amamentação, com o mesmo voltando a se desenvolver a durante a regressão.

7 Abstract

This study was directed towards evaluating the histological alterations of the extracellular matrix, estimating the area occupied by type I collagen through stereological methods, as well as verifying the numbers and distribution of mast cells during normal growth and regression of the mammary glands of rats. Sections were treated with silver impregnation, cytochemical and general staining techniques. Irrespective of age and physiological period, we verified that the collagen occupied a greater average area in the nipples than in the glandular region, with a corresponding reduction of the average area of this protein in the glandular region, as this tissue grew. This reduction was pronounced in the periods of regression. In lactating rats (group C), a large concentration of compact reticular fibers (visually estimate) was found contouring the alveoli. During regression of the mammary glands, the fibers became individually distinguishable. A large number of mast cells were found in the nipples of 50 day old animals, while a smaller number was counted in the distal stroma of mammary glands in regression. The extensive fat layer which surrounds the mammary gland of 25 to 50 day of rats was reduced to infrequent islets during lactation. This tissue developed again in the regression period.

8 Referências Bibliográficas

- ANDERSON, J. C. Glycoproteins of the connective tissue matrix. *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.*, 7: 251-315, 1976.
- ANDERSON, J. J. B.; MILIN, L. & CRACKEL, W. C. Effect of exercise on mineral and organic bone turnover in swine. *J. Appl. Physiol.*, 30: 810-3, 1971.
- AUGSBURGER, H. Electron microscopic studies of mammary gland involution in the goat. *Zentbl. Vetmed.*, 35: 337-55, 1985.
- AZIZKHAN, R. G.; AZIZKHAN, C. J.; ZETTER, B. R. & FOLKMAN, J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 152: 931-44, 1980.
- BECKER, A. B.; CHUNG, K. F.; McDONALD, D. M.; LAZARUS, S. G.; FRICK, O. L. & GOLD, W. M. Mast cell heterogeneity in dog skin. *Anat. Rec.*, 213: 477-80, 1985.

- BECKER, J.; SCHUPPAN, D.; BENZIAN, H.; BALS, T.; HAHN, E. G. CANTALUPPI, C.; & REICHART, P. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V and VI pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 1417-29, 1986.
- BIRKEDAL-HANSEL, H.; COBB, C. M.; TAYLOR, R. E.; & FULLMER, H. M. Activation of fibroblast collagenase by mast cell protease. *Biochim. Biophys. Acta*, 438: 273-86, 1976.
- BISSEL, N. J.; HALL, H. G. & PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.*, 99: 31-68, 1982.
- BLOOM, W. & FAWCET, D. W. Glândula mamária. In: ———, & ——— ——. *Tratado de histologia*. 10ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1975. p.834-40.
- BRANDES, D.; ANTON, E. & BARNARD, S. Lysosomes and cellular regressive changes in rat mammary gland involution. *Lab. Invest.*, 20: 465-71, 1969.
- CHANG, C. & HOUCK, J. C. Demonstration of the chemotactic properties of collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 134: 22-6, 1970.
- COWIE, A. T. & FOLLEY, S. J. The role of the adrenal cortex in mammary development and relation to the mamogenic action of the anterior pituitary. *Endocrinology*, 40: 274-84, 1947.
- CUTRUNEO, K. R.; STERLING, K. M. Jr.; SHULL, S. Steroid hormone regulation of extracellular matrix. In: MECHAN, R. P. *Regulation of matrix accumulation*. Orlando, Academic Press, 1986. p.120-167.
- DALTRO, D. M. Injeções intradérmicas de colágeno e suas implicações na matriz extracelular. Campinas, 1987. Tese (mestrado) UNICAMP, Instituto

de Biologia.

- DANIEL, C. W.; SILBERSTEIN, G. B. & STRICKLAND, P. Mammary cells.
In: CRISTOFALO, V. I., ADELMAN, R. C. & ROTH, G. S. *Handbook of cell biology of aging*. Boca Raton CRC 1985, p.289-301.
- DAOUST, R. Histochemical localization of enzymes activities by substrate film: ribonucleases, deoxiribonucleases, proteases, amylases, and hyaluronidase. *Int. Rev. Cytol.*, 18: 191-221, 1965.
- DAYER, J. M.; RUSSEL, R. G. G. & KRANE, S. M. Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by human lymphocyte. *Science*, 195: 181-93, 1977.
- DEMPSEY, E. W.; BUNTING, H. & WISLOCKI, G. B. Observations on the chemical cytology of the mammary gland. *Amer. J. Anat.*, 81: 309-41, 1947.
- EMERMAN, J. & VOGL, A. W. Cell size and shape change in the myoepithelium of the mammary gland during differentiation. *Anat. Rec.*, 216: 405-15, 1986.
- ETHERINGTON, D. J. The dissolution of insoluble bovine collagen by cathepsin B-1m collagenolytic cathepsin and pepsin. *Conn. Tiss. Res.*, 5: 135-45, 1977.
- FLEISCHMAJER, R.; TIMPL, R.; TUDERMAN, L.; WIESNER, M.; PERLISH, J. S. & GRAVES, P. N. Ultrastructural identification of extension aminopropeptides of type I and III collagens in human skin. *Proc. Natl. Sci. USA*, 78: 7360-4, 1981.
- FORSYTH, I. A. & TURVEY, A. Fatty acid synthesis by explant cultures from the mammary glands of goats on days 60 and 120 of pregnancy. *J.*

Endocrinol., 100: 87-92, 1984.

FRATELLO, B. Enhanced interpretation of tissue protease activity by use of photographic film as a substrate. *Stain Technol.*, 43: 125-8, 1968.

FULLMER, H. M. The histochemistry of the connective tissue. *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.*, 3: 1-70, 1965.

GEYER, H.; OETTLI-RHAM, S. & AUGSBURGER, H. The involution of the mammary gland in goats. Histological and histochemical investigation at different time of drying off. *Winterhurerstr.*, 260: 451-73, 1986.

GOLDEMBERG, B. & RABINOVITCH, M. Tecido conjuntivo. In.: WEISS, L. & GREEP, R. O. *Histologia*. 4ed. Rio de Janeiro, 1981. p.120-147.

GROSS, J. & LAPIERE, C. W. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Sci. USA*, 48: 1014-22, 1962.

-----, An assay on biological degradation of collagen. In.: HAY, E. *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press, 1985. p.2217-53.

HARRIS, E. D. Jr. Regulation of collagenolysis in synovial cell systems. *Rheumatol. Ann. Rev.*, 10: 197-215, 1986

HELMINEN, H. J. & ERICSSON, J. L. E. Studies on mammary gland involution. I On the ultrastructure of the lactating mammary gland. *J. Ultrastruc. Res.*, 25: 193-213, 1968a.

----- & -----, Studies on mammary gland involution. II ultrastructural evidence for auto and heterophagocytosis. *J. Ultrastruc. Res.*, 25: 214-27, 1968b.

- , & ———. Studies on mammary gland. III Alterations outside auto and heterophagocytic pathways for cytoplasmatic degradation. *J. Ultrastruc. Res.*, 25: 228-39, 1968c.
- , & ORRENIUS, S. Studies on mammary gland involution. IV Histochemical and biochemical observations lysosomal enzymes. *J. Ultrastruc. Res.*, 25: 240-52, 1968.
- HOLLMANN, K.H. & VERLEY, J. M. La regression de la glande mammaire à l'arrêt de la lactation. II Étude au microscope électronique. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 82: 228-38, 1967.
- HOLST, B. D.; HURLEY, W. L. & NELSON, D. R. Involution of the bovine mammary gland histological and ultrastructural changes. *J. Dairy. Sci.* 70: 935-44, 1987.
- HOUCK, J. & CHANG, C. The chemotactic properties of the products of collagenolysis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 138: 69-75, 1971.
- HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETERS-JORIS, C. & VAES, G. Partial characterization of the macrophage factor that stimulates fibroblasts to produce collagenase and to degrade collagen. *Biochim. Biophys. Acta.*, 84: 51-4, 1985.
- KUZMA, J. Breast. In: ANDERSON, W. A. D. *Pathology*. 6ed. Saint Louis, C. V. Mosby, 1971. p.1578-1605.
- LAUB, R.; HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETERS-JORIS, C. & VAES, G. Degradation of collagen and proteoglycan by macrophages and fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 721: 425-33, 1982.
- LAURIE, G. W.; BING, J. T.; KLEINMAN, H. K.; HASSEL, J. R. AUMAILLEY, J.; MARTIN, G. R. & FELDMANN, R. J. Localization of binding

- sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (TYPE IV) collagen. *J. Mol. Biol.*, 189: 205-16, 1986.
- , & LEBLOND, C. P. Basement membrane nomenclature. *Nature*, 313: 272, 1985.
- LIOTTA, L. A.; TRYGGVASON, K.; GARBISA, S.; ROBEY, P. G. & ABE, S. Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. *Biochemistry*, 20: 100-04, 1981.
- LYNCH, S. M.; AUSTEN, K. F. & WASSERMAN, S. I. Release of arylsulfatase A, but not B from rat mast cell by noncytotoxic secretory stimuli. *J. Immunol.*, 121: 1394-8, 1978.
- MARINKOVICH, M. P. & ROCHA, V. Collagen Synthesis and deposition during mammary epithelial cell spreading on collagen gels. *J. Cell. Physiol.*, 128: 61-70, 1986.
- MARK, K.; SASSE, J.; MARK, H. & KUHL, U. Changes in the distribution of collagen types during embryonic development. *Conn. Tiss. Res.*, 10: 37-42, 1982.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; FINK, L. M. & PIERCE, G. B. Removal of basement membrane in the involuting breast. *Lab. Invest.*, 34: 455-62, 1976.
- , & AMENTA, P. S. The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.*, 48: 656-77, 1983.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. & VALDRIGHI, L. Anisotropy and isoelectric point determinations on collagen bundles of the rat periodontal fibres. *Histochemistry*, 42: 163, 1974.

- MILLER, E. J. Chemistry of the collagens and their distribution. In: PIEZ, K. A. & REDDI, A. H. *Extracellular matrix biochemistry*. ed. New York, Elsevier, 1984. p. 41-78.
- MURPHY, G.; McALPINE, C. G.; POOLL, C. T. & REYNOLDS, J. Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and IV and V collagen. *Biochim. Biophys. Acta.*, 831: 49-58, 1985.
- OHKUMA, S. & POOLE, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 3327-31, 1978.
- PIMENTEL, E. R.; RECCO, S. M. & GRACCHO, M. Jr. Photometric studies on xylydine Ponceau collagen interaction. *Cell. mol. Biol.*, 27: 347-52, 1981.
- PITELKA, D. R. A glândula mamária. In: WEISS, L. & GREEP, R. *Histologia*. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 1981. p.778-799.
- RADNOR, C. J. P. Myoepithelium in involuting mammary glands of rat. *J. Anat.*, 112: 355-65, 1972.
- RAHN, S., GEYER, H. & NEUBURGER, D. Histological and histochemical studies on the involution of the pig mammary gland. *Zentralb. Veterinar-med. Reihe.*, 31: 776-91, 1984.
- RAMSHAW, J. A. M. Distribution of type III collagen in bovine skin of various ages. *Conn. Tiss. Res.*, 14: 307-14, 1986.
- REID, L. & JEFFERSON, D. M. Cell culture studies using extract of extracellular matrix to study growth and differentiation in mammalian cells. In: MATHER, J. *Mammalian cell culture. The use of serum-free hormone supplemented media*. Plenum Press, 1985. 10. p. 239-80.

- ROELS, H. Hyperplasia versus atrophy regeneration *versus* repair. In.: GLYNN, L. E. *Tissue and repair regeneration*. Amsterdam, Elsevier, 1981. 7 p.243-283
- RUSSO, J. & RUSSO, I. H. Biology of disease. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 57: 112-37, 1987.
- .: TAIT, L. & ———. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III The cell origem of the mammary carcinoma. *Am. J. Path.*, 113: 50-66, 1983.
- .: TAY, L. K. & ———. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2: 5-73, 1982.
- SAVION, N.; VLODAVSKY, I. & FUKS, Z. Interaction of T lymphocytes and macrophages with cultured vascular endothelial cells: attachment, invasion, and subsequent degradation of the subendothelial extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.*, 118: 169-78, 1984
- SCHNYDER, J. & BAGGIOLINI, M. Role of phagocytosis in the activation of macrophages. *J. Exp. Med.*, 148: 1449-57, 1978.
- SEKHRI, K. K.; PITELKA, D. R. & DEOME, K. B. Studies of mouse mammary glands. I Cytomorphology of the normal mammary gland. *J. Natl. Cancer Inst.*, 39: 459-90, 1967.
- SHIMIZU, K. & HOKANO, M. Collagen concentration and mast cell in perinatal murine uterus. *Acta Anat.*, 129: 262-64, 1987.
- SHORT, V. J.; BRINDLEY, D. N. & DILS, R. Co-ordinate changes in enzymes of fatty acid synthesis, activation and esterification in rabbit mammary

- gland during pregnancy and lactation. *Biochem. J.*, 162: 445-50, 1977.
- STEWART, H. J. & THOMPSON, G. E. Adrenocorticotrophic hormone stimulation of mammary secretion in lactating goats independent of increase mammary uptake of glucose. *J. Endocrinol.*, 101: 203-11, 1984.
- STOCKDALE, F. E.; JUERGENS, W. G. & TOPPER, Y. J. A histological and biochemical study of hormone dependent differentiation of mammary gland tissue *in vitro*. *Develop. Biol.*, 13: 266-81, 1966.
- TATA, J. R. Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Develop. Biol.*, 13: 77-94, 1966.
- TEN CATE, A. R. Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodelling. *J. Anat.*, 114: 401-14, 1972.
- , & DEPORTER, D. A. The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue. *Anat. Rec.*, 182: 1-14, 1975.
- THIBERG, J. LOHMANDER, S. & FRIBERG, V. Electron microscopic demonstration of proteoglycans in guinea pig epiphyseal cartilage. *J. Ultrastruc. Res.*, 45: 407-27, 1973.
- THOMPSON, R. C. & BALLOU, J. E. Studies of metabolic turnover with tritium as a tracer. V The predominantly non-dynamic state of body constituents in the rat. *J. Biol. Chem.*, 223: 795-809, 1956.
- UNKELESS, J. C.; GORDON, S. & REICH, E. Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.*, 139: 834-50, 1974.
- VERLEY, J. M. & HOLLMAN, K. H. La regression de la glande mammaire à

- l'arrêt de la lactacion. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 82: 212-21. 1967.
- VELICAN, C. & VELICAN, D. Silver impregnation techniques for the histochemical analysis of basement membrane and reticular fiber networks. In: GLICK, D. & ROSENBAUN, R. M. ed. *Techniques of biochemical morphology*. New York, Willy Interscience, 1972. p.143-190.
- VIDAL, B. C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56: 529-36. 1963.
- . Desorganização macromolecular dos feixes de colágeno sob a influência da histamina. Estudo experimental. Piracicaba, 1967. p.8-11. UNICAMP.
- . Dichroism in collagen bundles stained with xylydine Ponceau 2R. *Ann. Histochem.*, 15: 286-96. 1970.
- . Histochemical and anisotropical properties characteristics of silver impregnation. The differentiation of reticulín fibers from the others interstitial collagens. *Zool. Jb. Anat.*, 1987 (aceito para publicação).
- . Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell. mol. Biol.*, 32: 527-35. 1986.
- . & BENATTI, O. Mecanismo biológico na formação das bolsas periodontais. *Rev. Biol. Oral.*, 1: 24-34. 1963.
- . Matriz Extracelular. In: ———. & MELLO, M. L. S. *Biologia celular*. 1ed. São Paulo, Atheneu, 1987. p.273-303.
- WARBURTON, M. J.; MITCHELL, D.; ORMEROD, E. J. & RUDLAND, P.

Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the resting, pregnant, lactating and involuting rat mammary gland. *J. Histochem Cytochem.*,30: 667-76, 1982.

—————; MONAGHAN, P.; FERNS, S. A.; HUGHES, G. M. & —————. Distribution and synthesis of type V collagen in the rat mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 31: 1265-73, 1983.

WERB, Z.; BANDA, M. J. & JONES, P. A. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. III Morphological, pericellular, and intracellular events in matrix proteolysis by macrophages in culture. *J. Exp. Med.*, 152: 1537-53, 1980a.

—————; —————, & —————. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J. Exp. Med.*,152: 1340-57, 1980b.

—————, & GORDON, S. Elastase secretion by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.*, 142: 361-77, 1975a.

—————, & —————. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.*, 142: 346-60, 1976b.

WEWER, U. M.; ALBERCHTSEN, R.; RAO, C. N. & LIOTTA, L. A. The extracellular matrix in malignancy. *Rheumatol. An. Rev.*,10: 451-78, 1986.

YURT, R. W.; LEID, R. W. Jr. & AUSTEN, K. F. Native heparin from peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.*, 252: 518-21, 1977.

Este livro foi composto no sistema L^AT_EX e impresso
em *laser* no Centro de Computação da UNICAMP.