

Apoptose na involução da glândula mamária

Apoptosis in involution of mammary gland

Fátima F. Caldoncelli
Rogério E. Farias
Martha de Oliveira Guerra
Vera Maria Peters
Fernando Monteiro Aarestrup

Resumo

Preparando-se para a lactação, a glândula mamária sofre várias modificações estruturais e funcionais. Após a amamentação, com a estase do leite e a queda hormonal (hormônios esteróides, progesterona, prolactina), a mama tende a voltar ao seu estágio anterior à gestação. Esta involução mamária envolve remodelação da matriz extracelular (MEC) e perda de células. A remodelação da MEC é dependente da ação de enzimas proteolíticas produzidas localmente. A degradação da MEC altera a interação do epitélio glandular e da matriz extracelular adjacente e atua no mecanismo de involução glandular. A diminuição do número de células ocorre através da apoptose, um fenômeno de morte celular programada dependente de fatores intracelulares e da interação célula/meio externo. Participam desse processo de morte celular programada vários genes reguladores da sobrevivência celular, como os genes da família bcl 2 e o gene p53. Podemos observar células em apoptose através do método Tunel, que identifica a fragmentação do DNA das células glandulares. Nessa revisão da literatura procuramos entender melhor o complexo mecanismo de apoptose na involução da glândula mamária.

Abstract

On preparing for lactation the mammary gland undergoes some structural and functional modifications. After nursing, milk stasis and hormone drop (steroid hormones, progesterone, prolactin) make the breast lean back to the stage before gestation. This mammary involution includes the recast of extracellular matrix (ECM) and cell loss. The recast of ECM depends on the action of locally produced proteolytic enzymes. The degeneration of ECM changes the interaction of the gland epithelium and extracellular adjacent matrix and acts on the gland involution mechanism. The decrease of cell number occurs by means of apoptosis, that is a programmed cell death phenomenon dependent on intracellular factors and the interaction of cell/external environment. Several cell survival regulating genes like family gens bcl 2 and p53 gene take part on this process. We can watch cells in apoptosis by means of the Tunel method, that identifies the DNA fragmentation of gland cells. In this literature review we try to understand the complex mechanism of apoptosis in the involution of the mammary gland.

Introdução

A glândula mamária, durante a gestação, sofre várias modificações ao se preparar para a lactação. Após a amamentação a mama involui, isto é, tende a voltar a seu estado anterior à gestação. A involução da glândula mamária, um fenômeno fisiológico, envolve uma complexa interação de fatores endócrinos e locais, como decréscimo dos níveis de hormônios lactogênicos e estase do leite, respectivamente. Do ponto de vista morfológico ocorre:

- perda de células por apoptose;
- remodelação da matriz extracelular (MEC).

Neste trabalho será realizada uma revisão não-exaustiva da literatura relativa ao processo de apoptose na involução da glândula mamária.

Processo de apoptose

A apoptose, um mecanismo de eliminação de células, é um fenômeno de morte celular programada. Ela

Unitermos

Apoptose
Mama
Fisiologia

Key words

Apoptosis
Breast
Physiology

Aceito para publicação em novembro de 2002.

Trabalho realizado nos laboratórios de Imunopatologia e Patologia Experimental, de Toxicologia Reprodutiva e de Embriologia e Biologia dos Tecidos, Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora.

ocorre individualmente em cada célula, ou seja, a morte de uma célula não leva à morte de outras células. É um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfologicamente por condensação e fragmentação da cromatina e formação de bolhas na superfície celular. Em seguida, ocorre a formação dos chamados corpos apoptóticos, que possuem membrana celular intacta envolvendo componentes degradados do citoplasma e cromatina fragmentada. Os corpos apoptóticos mantêm um gradiente osmótico impedindo o extravasamento dos seus componentes para o meio extracelular, portanto são imunologicamente inativos, ou seja, não ativam a resposta imunológica. O destino final dos corpos apoptóticos é a fagocitose, executada por macrófagos que promovem o *clearance* de restos celulares (**Figura 1**)⁽²⁴⁾.

Uma importante característica do processo de apoptose é que ele ocorre individualmente, em células que estão participando de fenômenos fisiológicos ou estão envolvidas na patogênese de diversos estados mórbidos⁽⁵⁾.

Os sinais recebidos na superfície celular através de receptores são freqüentemente transmitidos ao núcleo, onde alteram a expressão de genes específicos, alterando, portanto, o comportamento celular⁽⁴⁾. Diversos estímulos (p. ex.: radioterapia, quimioterapia, infecção, produção de citocinas inflamatórias) atuam desencadeando um processo de *signal transduction*⁽⁵⁾. Os receptores na superfície celular, quando em contato com seu ligante, ativam as proteinocinasas, que desencadeiam uma cascata de fosforilação ativadora de proteínas sinalizadoras. Um importante grupo de proteinocinasas são as tirosinocinasas⁽¹⁾. As tirosinocinasas ativam o fator Stat (*signal transducer and ativator of transcription*), que parece estar envolvido no mecanismo de apoptose⁽⁴⁾.

Stats são uma família de fatores de transcrição latentes que são ativados em resposta ao estímulo de várias citocinas e fatores de crescimento. Esta família de

moléculas está envolvida no crescimento, na diferenciação, na sobrevivência e na apoptose⁽³⁾.

Demonstrou-se que o interferon γ (INF- γ) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) ativam Stat 1 e induzem apoptose em células de câncer de mama (linhagem MDA-MB-468). Utilizando-se células A431 tratadas com INF- γ e EGF observou-se a ocorrência de apoptose, porém, em células A431 mutantes em que a ativação de Stat foi abolida a apoptose foi ausente. Observou-se ainda que INF- γ e EGF induziram a expressão de caspase 1 (protease citoplasmática) por um mecanismo dependente de Stat. As células Stat 1-deficientes (U3A) incubadas com INF- γ não sofreram apoptose, porém, quando Stat 1 foi reintroduzido, houve expressão de caspase 1 e indução da apoptose. Conclui-se então que a ativação de Stat pode induzir apoptose através da indução da expressão de caspase 1⁽⁴⁾.

Caspases são uma família de enzimas proteolíticas presentes no citoplasma em sua forma inativa. Para a ativação das caspases em resposta aos estímulos apoptogênicos é necessária a liberação do citocromo C pela mitocôndria. O controle sobre a liberação do citocromo C é exercido por genes da família do gene bcl 2⁽⁶⁾. A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações estruturais que caracterizam a apoptose, como desmonte da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação dessas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer⁽²⁾.

Muitos genes estão envolvidos diretamente no processo de apoptose. Uma importante família é a do gene bcl 2. Algumas proteínas codificadas por genes componentes dessa família bloqueiam a apoptose (Bcl 2 e Bcl x) e outras promovem-na (Bax, Bad e Bak)⁽¹⁵⁾. O bcl 2 é um gene promotor da sobrevivência celular por inibição da ocorrência de apoptose. A proteína Bcl 2 está localizada na membrana mitocondrial externa de numerosos tipos celulares, como epitélios capazes de proliferação e morfogênese (p. ex.: na mama em repouso)⁽²⁾. A proteína Bcl 2 bloqueia a liberação de citocromo C pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação das caspases⁽¹³⁾. A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl 2 (Bax/Bcl 2) ou homodímeros (Bax/Bax). Ao que parece, Bcl 2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax; por outro lado o homodímero Bax/Bax promoveria a morte celular programada⁽²⁾. O mecanismo pelo qual a família do gene bcl 2 controla a apoptose seria através da formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da apoptose⁽²⁰⁾.

Um outro importante gene envolvido no processo de morte e proliferação celulares é o gene p53, um dos genes chamados supressores de tumor⁽¹⁾. O aumento artificial da proteína p53 em cultura inibe a proliferação celular.

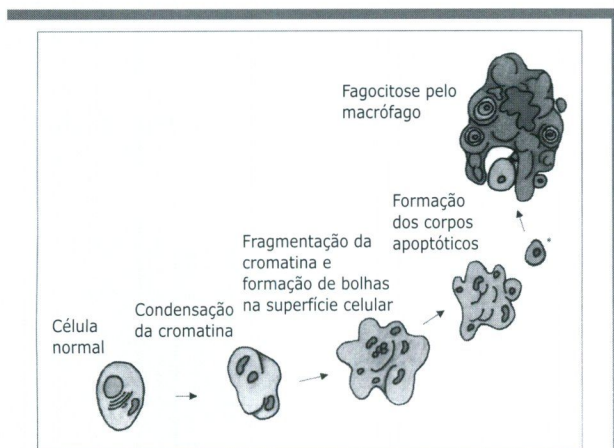


Figura 1: Esquema representativo do processo de apoptose

Normalmente, pouca proteína p53 é encontrada na célula; isso sugere que o p53 pode servir a uma função que é necessária ocasionalmente em circunstâncias especiais. Altos níveis de p53 bloqueiam a proliferação celular, atrasando a fase G1 do ciclo celular e não deixando que a célula passe para a fase S ou que as células morram por apoptose. Células expostas a irradiação danificadora e que não apresentam o gene p53 continuam dividindo-se e replicando o DNA sem pausa para o reparo de lesões no DNA⁽¹⁾. O papel do p53 em processos fisiológicos ainda é pouco estudado.

Na **Figura 2** podemos observar a presença de células em apoptose no ducto de glândula mamária, evidenciada pelo método TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*). Tal método de biologia molecular permite identificar as células que entraram em processo de apoptose com base na identificação da fragmentação do DNA⁽¹⁷⁾.

Fisiologia do desenvolvimento e involução da glândula mamária

Durante a gravidez, preparando-se para a amamentação, as glândulas mamárias passam por um processo de crescimento, com proliferação e ramificação dos ductos galactóforos, neoformações tubuloalveolares e diminuição considerável dos tecidos adiposo e conjuntivo. O crescimento das mamas dá-se pela ação de vários hormônios. O estrogênio age sobre os ductos galactóforos, estimulando seu crescimento e promovendo ramificações, e a progesterona estimula o crescimento da porção secretora (estruturas tubuloalveolares). Atuando sinergicamente com o estrogênio e a progesterona estão a prolactina, o hormônio do crescimento e o hormônio lactogênico placentário humano, promovendo hiperplasia e hipertrofia tubuloalveolares⁽¹⁸⁾.

A lactação, caracterizada pelo desencadeamento do processo de produção de leite, só aparece no final da gravidez, quando a ocitocina e a tiroxina estimulam a biossíntese e a liberação de prolactina. Após o parto há queda dos níveis de estrogênio e progesterona e aumento

do nível de prolactina⁽¹⁸⁾. Iniciada a lactação, ela é mantida pelo reflexo neuroendócrino da sucção do mamilo pelo lactente, que, via eixo hipotálamo-hipofisário, determina a liberação de prolactina. O estímulo do mamilo susta no hipotálamo a liberação do fator inibidor da prolactina (PIF), possibilitando a secreção de prolactina pela hipófise. A sucção repetida do mamilo, com esvaziamento contínuo dos alvéolos e ductos, resulta em intensificação da produção de leite⁽¹⁸⁾. A manutenção da diferenciação epitelial mamária e produção de leite durante a lactação é consequência da remoção do leite e também da presença de hormônios lactogênicos, particularmente glicocorticóides, insulina e prolactina^(7, 14).

A redução do número de mamadas leva à estase do leite e pode ativar um mecanismo intramamário, devido à distensão física do epitélio glandular, para o controle da produção de leite⁽²⁵⁾. Cessada a amamentação, a falta de estímulo mamilar reativa a produção de PIF, interrompe o estímulo para liberação de ocitocina para a ejeção do leite e o alvéolo diminui a produção de leite. Após o desmame, a queda dos hormônios lactogênicos e a estase de leite levam à involução da glândula, caracterizada por três eventos:

- diminuição da expressão do gene para produção de proteína do leite;
- perda de células por apoptose;
- remodelação e preparação do tecido glandular para nova gravidez.

Cada um destes eventos é dependente da atividade de um grupo de fatores de transcrição no epitélio e no estroma mamários⁽¹⁴⁾.

Alguns autores preferem dividir o processo de involução mamária em duas fases distintas. Inicialmente, a estase do leite resulta na indução de fatores locais que causam apoptose no epitélio alveolar. Durante este primeiro estágio da involução, sinais locais são suficientes para induzir a apoptose mesmo na presença de hormônios lactogênicos. Secundariamente, após longa ausência de sucção e conseqüente declínio da concentração de hormônios circulantes, inicia-se a remodelação da glândula mamária⁽¹⁶⁾.

Perda de células por apoptose

Quarrie *et al.* demonstraram a presença de apoptose dentro de 24h de estase de leite. A perda celular por apoptose é inibida e a secreção de leite é prontamente restaurada pela sucção se a estase de leite for de curta duração⁽¹⁰⁾.

Controle hormonal

A produção de leite durante a lactação é consequência do estímulo da sucção e da presença de hormônio do crescimento (GH), glicocorticóides, prolactina e insulina^(7, 8). Após o desmame, o nível de glicocorticóide cai, o epitélio secretório morre por apoptose e a glândula é preparada para nova gravidez. Estimulando-se a glândula mamária pela implantação de cápsulas contendo hormônios esteróides e prolactina separadamente pode-se observar o papel de cada



Figura 2: Células em apoptose no ducto

um deles. A desoxicorticosterona e a progesterona inibiram a involução glandular, enquanto que a prolactina somente foi inefetiva. A dexametasona inibiu a involução e a apoptose, acompanhada pela indução de ligante para AP-1 (proteína reguladora de gene ativada)⁽¹⁾. Vários genes-alvos da AP-1, como SL1 (estromelina 1) e SGP-2, que são induzidos durante a involução normal, são fortemente inibidos pela dexametasona. Isso sugere que uma interação entre receptores de hormônios esteróides e AP-1 leva a um prejuízo na atividade de AP-1 e inibição da involução da glândula mamária, implicando que a apoptose após lactação depende da função de AP-1⁽⁷⁾.

O hormônio do crescimento (GH) e a prolactina estimulam consideravelmente a produção de leite. Embora os efeitos diretos da prolactina sobre o epitélio mamário sejam bem documentados, os efeitos do GH parecem ser mediados indiretamente pelo fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) produzido no fígado. Por considerarem a prolactina e o GH fatores de sobrevivência da glândula mamária, os autores propuseram um mecanismo de interação através do sistema IGF. O GH estimularia a produção de IGF-1 pelo parênquima mamário. O IGF-1 atuaria, então, como um fator de sobrevivência para a glândula mamária. No processo de involução, a glândula secreta uma proteína que se liga ao IGF (IGFBP-5). O IGFBP inibiria a ação do IGF-1 e levaria à morte celular. A prolactina tem o importante papel de suprimir a secreção de IGFBP-5⁽⁸⁾.

Nguyen e Pollard observaram que imediatamente após o desmame ocorre rápida indução do RNA-m do fator transformador do crescimento $\beta 3$ (TGF $\beta 3$) e sua proteína no epitélio mamário, precedendo o início da apoptose. Inibindo-se a sucção unilateral e mantendo-se normal o nível de hormônio, mostrou-se que a indução de TGF $\beta 3$ é regulada pela estase do leite, e não pela concentração de hormônio circulante. Camundongos TGF $\beta 3$ *null* mostraram significativa inibição da apoptose quando comparados com camundongos normais submetidos à estase do leite. Os resultados evidenciam que TGF $\beta 3$ é um fator local induzido por estase do leite e que causa apoptose no epitélio mamário durante a involução⁽¹⁶⁾.

Considerando-se ainda o primeiro estágio da involução mamária com perda de células por apoptose, observou-se o rompimento da adesão interepitelial precedendo a apoptose⁽²³⁾. Caderinas são as principais moléculas de ligação intercelular, e as E-caderinas estão presentes principalmente em células epiteliais⁽¹⁾. A dissolução da ligação célula-célula dependente de E-caderina inicia a morte celular programada durante a involução mamária. Em cultura de células epiteliais mamárias, a inibição da adesão dependente de E-caderina resulta em morte celular por apoptose. Um potente alvo da ação hormonal durante a involução mamária é a junção intercelular do epitélio secretório⁽²³⁾.

Controle genético

A complexa involução da glândula mamária possui vários fenômenos reguladores e executores da morte celular, como demonstrado pelo número de enzimas expressas durante a involução. Entender a cascata de expressão

genética e subseqüentes interações protéicas que resultam na morte de células do epitélio mamário secretor, remodelação e renovação da glândula para uma nova lactação é um verdadeiro desafio⁽²¹⁾.

Os sinais recebidos na superfície celular ativam vários fatores de transcrição⁽⁴⁾ que coordenam a expressão de mediadores da apoptose (p. ex.: caspases) e reguladores da remodelação tissular (metaloproteinases)⁽¹⁴⁾. A involução da glândula mamária é caracterizada por extensa apoptose das células epiteliais e ativação de Stat 3. Camundongos Stat 3 *null* mostraram diminuição da apoptose e importante atraso na involução mamária após desmame forçado, acompanhado de ativação precoce de Stat 1 e aumento dos níveis de expressão dos genes p53 (gene supressor de tumor) e p21 (gene regulador do ciclo e diferenciação celular). Este pode ser um mecanismo compensatório para iniciar a involução mamária na ausência de Stat 3⁽³⁾.

A detecção de RNA-m de p53 mostrou ser este um dos primeiros genes a serem expressos no tecido mamário após desmame. Dados contraditórios são apresentados sobre o papel do gene p53 na involução da glândula mamária. Alguns autores demonstraram que o RNA-m de p53 e sua proteína são detectados no epitélio glandular 48h após desmame. Na ausência do gene p53 houve atraso na involução da glândula mamária em comparação com tecido glandular normal em involução⁽⁹⁾. A detecção da apoptose pelo método Tunel mostrou haver relação entre alterações na expressão de p53 e bax e degeneração estrutural característica da involução mamária⁽¹⁹⁾. Outro estudo mostrou não haver atraso na involução da glândula mamária na ausência do gene p53, além de não se alterar o padrão de expressão do gene bax (indutor de apoptose) nem dos genes bcl-xS (indutores de morte) e bcl-xL (indutor de sobrevivência)⁽¹¹⁾. A ausência do gene p53 não afetou a expressão de SL1 (estromelina 1), sugerindo que a resposta estromal permanece intacta⁽⁹⁾.

No estudo da involução de glândulas mamárias de ovinos, a expressão de bcl 2 e bax foi examinada por imunistoquímica do último dia de lactação ao oitavo dia após desmame. A regressão da glândula mamária por apoptose foi identificada dois dias após o término da lactação e aumentou até o oitavo dia, concomitante com a expressão de bax. A reação positiva para bcl 2 foi observada somente no primeiro e oitavo dias após a lactação. Pôde-se concluir, portanto, que o caminho para a involução da glândula mamária envolve a morte celular por apoptose e que os genes da família bcl 2 estão implicados neste processo⁽¹⁵⁾.

Remodelação na involução

A relação entre epitélio glandular e mesênquima adjacente possui papel importante na diferenciação das células glandulares. A perturbação desta interação altera a diferenciação celular específica (p. ex.: para produção de leite) e faz parte do mecanismo de involução mamária, podendo participar do processo de apoptose⁽²¹⁾.

A remodelação da MEC, envolvida na involução glandular, implica em degradação de várias macromoléculas^(1, 24). Os componentes da matriz são degradados por enzimas proteolíticas extracelulares secretadas localmente⁽²⁴⁾.

A remodelação da MEC é de fundamental importância na reorganização da estrutura mamária em involução. A MEC não provê somente a organização estrutural para os tecidos, mas também tem importante papel na proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular, fenômenos aos quais a proteólise e, conseqüentemente, a remodelação da MEC estão intimamente ligadas^(1, 24).

Há duas classes gerais de proteases: metaloproteases (MMPs) e serinoproteases⁽¹⁾. Essas proteases atuam na remodelação tissular de eventos como ovulação, implantação, cicatrização de feridas e involução de glândula mamária, útero e próstata. Podem também participar em vários estados patológicos com inflamação e estágios de progressão tumoral, como crescimento, invasão, metástases e angiogênese. As MMPs são as principais responsáveis pela degradação da MEC⁽¹⁾.

A expressão das MMPs é controlada por fatores de crescimento, hormônios, oncogenes e citocinas. A família das MMPs pode ser dividida em quatro grupos: collagenases intersticiais, gelatinases, estromelisinases e proteinases ativadas da família das furinas. As estromelisinases (SL) são subdivididas em SL1, SL2, matrilisina e metaloelastase. Elas possuem substratos específicos catalisando a degradação de vários componentes da MEC, como proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina, entactina, galectina, e colágenos tipos IV, V, IX e X, e molécula precursora do TNF- α . A atividade das estromelisinases pode ser inibida pelos inibidores de MMPs (TIMP)⁽¹²⁾. As MMPs e seus inibidores parecem estar altamente expressos em tumores invasivos, porém em algumas alterações celulares benignas somente as MMPs estão expressas⁽²²⁾.

Outra protease que atua na remodelação da MEC é o ativador de plasminogênio tipo urocinase (U-PA) da família das serinoproteases, que tem como alvo o plasminogênio. O plasminogênio abundante na corrente sanguínea acumula-se também nos locais de remodelação de tecidos, como cortes, tumores e inflamação. O U-PA ativa o plasminogênio, originando a protease ativa, plasmina. A plasmina cliva várias proteínas da MEC que contribuem tanto para a organização da matriz quanto para a ligação das células a ela, incluindo a fibrina, a fibronectina e a laminina⁽¹⁾.

Demonstrou-se que a membrana basal abaixo das células epiteliais e mioepiteliais da glândula mamária em involução é amorfa e descontínua comparada com a alta organização da lâmina basal em glândulas mamárias controles⁽²⁶⁾. A SL1 tem importante papel no desenvolvimento da glândula mamária, e sua ação tem sido estudada durante a morfogênese, proliferação celular e apoptose celular. O RNA-m para SL1 foi localizado nos fibroblastos^(24, 26) do estroma ao longo dos ductos e ao redor dos botões de crescimento mamários⁽²⁴⁾. A SL1 é altamente expressa durante a degradação da membrana basal que ocorre no período de involução da glândula mamária após o desmame. Quando células epiteliais mamárias são cultivadas com MEC apropriada e a expressão de β -caseína é induzida, a apoptose é suprimida. Porém, quando há superexpressão de SL1, a MEC é degradada, levando à indução da apoptose.

Isso sugere que a produção de SL1 pelas células do estroma mamário pode regular a sobrevivência e a função celulares através da interação com a MEC⁽²⁴⁾. Em camundongos BALB/c não ocorre apoptose durante a lactação, mas ela se evidencia aos dois dias do desmame, quando o gene de β -caseína ainda é elevado, e prossegue até oito dias, quando o gene de β -caseína não mais se expressa⁽¹²⁾.

O U-PA (fator ativador de plasminogênio), envolvido na organização da MEC, está baixo durante a lactação e eleva-se quatro dias após o desmame, coincidindo com o colapso da estrutura lobuloalveolar e intensa remodelação tissular⁽¹²⁾.

Comentários finais

A **Figura 3** representa esquematicamente o mecanismo de involução na mama. Após desmame, a produção de leite continua por um ou dois dias; então os alvéolos ficam ingurgitados e um sinal local instrui as células alveolares, mioepiteliais e fibroblastos a secretarem MMPs (Figura 3A). A degradação da membrana basal altera a interação entre as células e MEC. Isso leva à geração de fragmentos bioativos e ao destacamento das células da membrana basal adjacente e das células vizinhas dentro dos alvéolos (Figura 3B). Ao mesmo tempo, as células perdem a capacidade de expressar proteínas do leite. O destacamento das células pode ser um sinal para iniciar a morte celular programada (Figura 3C). O balanço entre MMPs e TIMP regula a função e a morfologia celulares durante a involução. Ao final, a involução resulta em uma rede de pequenos alvéolos com membrana basal contínua. Ainda não está claro como esses eventos são regulados e por que algumas células são destinadas a morrer e outras não⁽²⁴⁾.

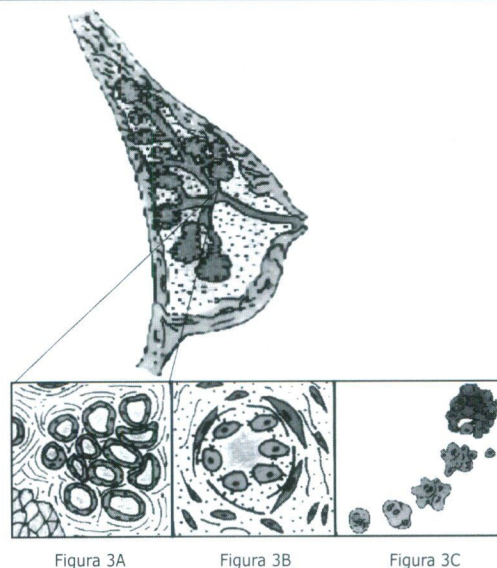


Figura 3: Esquema representativo de mama após a lactação. Em detalhe, alvéolos ingurgitados (3A), desorganização da estrutura alveolar (3B) e morte celular programada (3C)

Referências bibliográficas

1. ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J *et al.* Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.
2. Apoptose. Disponível em <<http://www.usp.br/medicina/departamento/patologia/patologia/apostila.htm>>.
3. CHAPMAN RS, LOURENÇO P, TONNER E *et al.* The role of STAT 3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of STAT 3. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480: 129-38.
4. CHIN YE, KITAGAWA M, KUIDA K, FLAVELL RA, FU XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17(9): 5328-37.
5. COHEN JJ. Apoptosis. *Immunology Today* 1993; 14(1).
6. COSULICH SC, SAVORY PJ, CLARKE PR. Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr Biol* 1999; 9(3): 147-50.
7. FENG Z, MARTI A, JEHN B, ALTERMATT HJ, CHICAIZA G, JAGGI R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol* 1995; 131(4): 1095-103.
8. FLINT DJ, KNIGHT CH. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2(1): 41-8.
9. JERRY DJ, PINKAS J, KUPERWASSER C, DICKINSON ES, NABER SP. Regulation of p53 and its targets during involution of the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4(2): 177-81.
10. LI F, STRANGE R, FRIIS RR *et al.* Expression of stromelysin-1 and TIMP-1 in the involuting mammary gland and in early invasive tumors of the mouse. *Int J Cancer* 1994; 15; 59(4): 560-8.
11. LI M, HU J, HEERMEIER K, HENNIGHAUSEN L, FURTH PA. Apoptosis and remodeling of mammary gland tissue during involution proceeds through p53-independent pathways. *Cell Growth Differ* 1996; 7(1): 13-20.
12. LUND LR, ROMER J, THOMASSET N *et al.* Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 1996; 122(1): 181-93.
13. KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR *et al.* The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 21; 275(5303): 1132-6.
14. MARTI A, LAZAR H, RITTER P, JAGGI R. Transcription factor activities and gene expression during mouse mammary gland involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4(2): 145-52.
15. METCALFE AD, GILMORE A, KLINOWSKA T *et al.* Developmental regulation of Bcl-2 family protein expression in the involuting mammary gland. *J Cell Sci* 1999; 112(Pt 11): 1771-83.
16. NGUYEN AV, POLLARD JW. Transforming growth factor beta 3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development* 2000; 127(14): 3107-18.
17. PARTON M, DOWSETT M, SMITH I. Studies of apoptosis in breast cancer. *JBM* 2001; 322: 1528-32.
18. PORTO CC. Semiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.
19. QUARRIE LH, ADDEY CV, WILDE CJ. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J Cell Physiol* 1996; 168(3): 559-69.
20. REED JC, JURGENSMEIER JM, MATSUYAMA S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998; 10; 1366 (1-2): 127-37.
21. STRANGE R, FRIIS RR, BEMIS LT, GESKE FJ. Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol* 1995; 46: 355-68.
22. SUTINEN M, KAINULAINEN T, HURSKAINEN T *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *J Cancer* 1998; 77(12): 2239-45.
23. VALLOROSI CJ, DAY KC, ZHAO X *et al.* Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution. *J Biol Chem* 2000; 4; 275(5): 3328-34.
24. WERB Z. Stromelysin-1 as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. Disponível em <<http://mammary.nih.gov/reviews/development/Werb001/>>.
25. WILDE CJ, KNIGHT CH, FLINT DJ. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4(2): 129-36.
26. WITTY JP, WRIGHT JH, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Mol Biol Cell* 1995; 6(10): 1287-30.

Endereço para correspondência

Fernando M. Aarestrup
Universidade Federal de Juiz de Fora
Centro de Biologia da Reprodução
Caixa Postal 328
CEP 36001-970 - Juiz de Fora-MG
e-mail: fmaarestrup@odonto.ufjf.br