

IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RECEPTOR DE PROLACTINA E APOPTOSE EM
GLÂNDULAS MAMÁRIAS DE CAMUNDONGOS *MUS MUSCULLUS*
(LINNAEUS) DURANTE A LACTAÇÃO*

A.R. de Souza, V.M. Peters, R.E. Farias, M. de O. Guerra, F.M. Aarestrup

Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental, CP 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: andrezzarsouza@bol.com.br

RESUMO

A lactação é indispensável para o crescimento e o desenvolvimento de recém-nascidos. Drogas administradas no período de lactação podem alterar o desenvolvimento da cria, ou lesar a glândula mamária alterando a produção de leite. Poucos estudos foram encontrados sobre a evolução da expressão de receptores de prolactina e de presença de células apoptóticas em ácinos da glândula mamária de fêmeas de camundongos, durante o processo de lactação, sendo este o objetivo do presente trabalho. Glândulas mamárias de fêmeas de camundongos foram obtidas no 19º dia de prenhez e em diferentes dias da lactação. Foram avaliados: o número de alvéolos por campo e o número de células por alvéolo. Identificou-se a expressão de receptores para prolactina através de imunohistoquímica, e a presença de células apoptóticas pelo método tunel. A presença de células prolactinas positivas, discreta no final da prenhez, aumenta significativamente já no 1º dia de lactação e permanece assim até o desmame. A involução da glândula mamária, indicada pelo aumento do número de células em processo de apoptose se inicia por volta do 8º dia pós-natal e prossegue até ao desmame.

PALAVRAS-CHAVE: Glândula mamária, lactação, prolactina, imunohistoquímica, apoptose.

ABSTRACT

PROLACTIN RECEPTORS IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND APOPTOSIS OF MAMMARY GLANDS FROM LACTATING MICE *MUS MUSCULLUS* (LINNAEUS). Lactation is essential for the growth and development of newborns. Drugs administered during lactation can alter the offspring development or damage the mammary glands changing the milk production. There are few studies about the evolution of prolactin receptors expression and on the presence of apoptotic cells in acinus of mammary glands from lactating mice, this is the aim of the present study. Mammary glands of female mice were obtained in the 19th day of pregnancy and in different days of lactation. It was evaluated: the number of acinus by microscopic field and number of cells by each acinus. The expression of prolactin receptors was identified through immunohistochemistry, and the presence of apoptotic cells by using the TUNEL method. The presence of prolactin positive cells, discreet in the end of pregnancy, significantly increases already on the 1st day of lactation and remains high until weaning. The mammary gland involution, indicated by the increase in the number of apoptotic cells, starts around the 8th postnatal day and continues until weaning.

KEY WORDS: Mammary gland, lactation, prolactin, immunohistochemistry, apoptosis.

INTRODUÇÃO

Comportamento materno em mamíferos é considerado como todo cuidado oferecido pelos pais aos descendentes, desde o nascimento até que eles desenvolvam características e habilidades que assegurem sua própria sobrevivência (CROWELL-DAVIS & HOUP, 1986; BROWN, 1998).

A lactação é um dos comportamentos maternos indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos (SILVA & VASCONCELLOS, 1988; TUCKER, 1994). As crias de ratas podem começar a mamar depois de 15 a 29min do nascimento. A mãe coloca os filhotes, um a um no ninho e debruça-se sobre eles, tomando a postura de amamentação, que facilita o acesso aos mamilos.

*Apoio Financeiro: Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos e FAPEMIG/EDT 1987/02

Nos primeiros oito a doze dias após o parto, a rata se aproxima dos filhotes e inicia a amamentação, lambendo-os e recolhendo-os, quando deixam o ninho (HAFEZ, 1995; BROWN, 1998). Quando os filhotes atingem 14 dias de idade a mãe raramente os recolhe e deixa de construir ou reparar o ninho; nesta idade eles já estão com olhos e ouvidos abertos, pêlos crescidos e podem caminhar facilmente. Após o 16^o dia de idade, a amamentação dá-se na maior parte do tempo fora do ninho. Dezoito dias após, a mãe começa a rejeitá-los nas suas tentativas de mamar e, gradualmente, os desmamam através da recusa da amamentação. As mudanças no comportamento materno mostram-se, assim, sincronizadas com o desenvolvimento dos filhotes, existindo um *feedback* na relação mãe-filhote que regula a intensidade de comportamento materno apresentado, quanto mais imatura a cria maiores são os cuidados maternos (BROWN, 1998).

As diferentes etapas do desenvolvimento da cria exigem qualidade e quantidades diferentes de leite. Ao nascimento, o colostro provê defesas imunológicas adequadas à cria (TUCKER, 1994) e no decorrer do crescimento, a concentração dos componentes do leite varia. É possível supor, portanto, que os aspectos morfológicos, histológicos e fisiológicos das glândulas mamárias alterem-se no decorrer da lactação, simultaneamente com o desenvolvimento das crias. A prolactina tem papel central na proliferação alveolar e na indução da diferenciação celular do epitélio secretório mamário no fim do período gestacional. A ativação do receptor de prolactina expresso na membrana das células no epitélio secretório das glândulas mamárias codifica para a transcrição de genes que induzem a proliferação e a diferenciação destas células tornando-as capazes de sintetizar o leite (HENNIGHAUSEN *et al.*, 1997).

Após a lactação a glândula mamária involui, isto é, tende a voltar ao seu estado anterior à gestação. Esta involução ocorre por um fenômeno fisiológico denominado apoptose que é rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo. No caso da glândula mamária este a apoptose é desencadeada por decréscimo nos níveis de hormônios lactogênicos e estase de leite nos alvéolos, resultando em perda de células por apoptose e remodelação da matriz extracelular (QUARRIE *et al.*, 1996).

Nesse estudo correlacionamos o desenvolvimento morfológico da glândula mamária de fêmeas de camundongos com períodos específicos de desenvolvimento da cria. Adicionalmente, foi avaliado a cinética de expressão de receptores de prolactina e a porcentagem de células em processo de apoptose no parênquima da glândula mamária de fêmeas de camundongos durante a lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos

Foram utilizadas 35 fêmeas de camundongos suíços, *Mus musculus* (Linnaeus) nulíparas distribuídos, de acordo com estágios de desenvolvimento das crias, segundo referências clássicas (TESH, 1977; FAVE, 1971) em sete grupos:

Grupo 1 - Décimo nono dia de gestação;

Grupo 2 - 1^o dia de lactação (primeiras 24h após o parto);

Grupo 3 - quarto dia de lactação;

Grupo 4 - dia da evidência do despregamento do pavilhão auricular;

Grupo 5 - dia da evidência do aparecimento dos incisivos;

Grupo 6 - dia da evidência da abertura dos dois olhos da cria;

Grupo 7 - desmame.

Dentro das primeiras 24hs da ocorrência do parto, as ninhadas foram remanejadas, de maneira que cada mãe ficou com um mínimo de 6 e um máximo de 10 filhotes, para que houvesse homogeneidade na demanda por leite em todos os grupos (SILVA, 1991). As fêmeas foram sacrificadas, por excesso de anestésico com Ketamine (100 mg/kg) mais Xylazine (10 mg/kg) via intraperitoneal (WOLFENSOHN & LLOYD, 1998) nas datas em que ocorreram os eventos acima mencionados e, em seguida, removeram-se, de cada fêmea, um par de glândulas mamárias torácicas e outro abdominal.

Análise Histológica e Histomorfométrica

As glândulas mamárias foram removidas pelo procedimento de necropsia e foram fixadas em formol cálcio a 10%, posteriormente foram submetidas ao processamento histológico de rotina. O material embocado em parafina foi submetido à microtomia obtendo-se cortes com espessura de 5 mm. Os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (H.E.) e submetidos a análise microscópica.

O exame microscópio dos cortes foi realizado em aumento de 100X por dois observadores, em estudo de "duplo cego". Os dados de contagem foram obtidos pela média dos dados descritos pelos observadores. Foram analisados três campos microscópicos por glândula, determinando-se em cada campo o número de alvéolos.

Imunohistoquímica

A expressão de prolactina foi investigada em cortes histológicos de glândulas mamárias utilizando o método avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase (VIEIRA, 2003) descrita a seguir:

Os cortes foram previamente submetidos ao método de recuperação antigênica em banho maria por 40 minutos a 99° C com RETRIEVAL da marca DAKO Carpinteria, EUA.

O método utilizado compreende as seguintes etapas:

- desparafinização em xilol (10min);
- reidratação em álcool a 100%, 90%, 80% e 70%;
- bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ a 3% (20min);
- incubação com o anticorpo primário anti-receptor de prolactina humana (NovoCastra, Newcastle, UK) em temperatura ambiente, para realização da fase 1 (1h);
- incubação com o anticorpo secundário biotilado em temperatura ambiente, fase 2 (30min);
- incubação com reagente estrepto-avidina, fase 3 (30min);
- revelação utilizando substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-DAB (DAKO, Carpinteria EUA), (5min);
- contracoloração com hematoxilina de Harris (1min);
- lavagem em água destilada;
- desidratação em série crescente de álcool;
- montagem da lâmina com Entellan (Merck) e lamínula.

Por análise semiquantitativa foi determinado o índice de células prolactina positivas. Foram avaliados 10 campos microscópicos, com aumento de 400X, utilizando a convenção de contagem para imunohistoquímica (VAKKALA & LÄHTEENMÄKI, 1999).

Detecção do Processo de Apoptose

A presença de células em processo de apoptose foi investigada "in situ", pelo método TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) (PARTON *et al.*, 2001) descrita a seguir:

Este método compreende as seguintes etapas:

- desparafinização em xilol (10min);
- reidratação em álcool a 100%, 90%, 80% e 70%;
- proteinase K, na diluição de 1/100 usando Tris em pH = 8.0 como diluente - 30min;
- inativação da peroxidase endógena, em H₂O₂ com metanol P.A. (5 min.);
- equilíbrio da reação com "TdTEquilibration Buffer", incubando em temperatura ambiente (20min).
- marcação da reação com "TdT Labeling Reactoin Mix" e "TdT enzyme", incubando em estufa a 37° C (1h30min);
- parar a reação com "Stop Buffer", incubando em temperatura ambiente (5min);
- cobrir os cortes com "Block Buffer", incubando em temperatura ambiente (10min);
- para detecção, aplicar o "50X Conjugate" na concentração 1/50, diluído na solução "Block Buffer" (30min);

- revelação, utilizando substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) da marca DAKO, Carpinteria EUA (5min);
- contracoloração com hematoxilina de Harris;
- desidratar em álcool em séries crescentes e montar.

Os resultados de contagem foram expressos em porcentagem de células em apoptose, utilizando-se 10 campos microscópicos com aumento de 400X.

Análise Estatística

Os dados histomorfométricos foram analisados em glândulas mamárias torácicas e abdominais, procedendo-se à comparação entre ambas glândulas pelo teste Mann-Whitney (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1993). Não tendo sido obtidas diferenças significativas, os dados foram agrupados. Compararam-se então os diferentes grupos experimentais através dos testes de análise de variância de uma via, seguido do teste "post hoc" de Bonferroni (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1993) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1993), dependendo da distribuição dos dados e da homogeneidade da variância. O nível de significância dos testes foi de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

A análise da glândula mamária no 19º dia da prenhez teve como objetivo estabelecer um "marco zero" para avaliar o desenvolvimento ao longo do período da lactação, neste período observa-se a presença de alvéolos secretores nas extremidades dos ductos (Fig. 1). O número de alvéolos por campo no 19º dia de prenhez (Fig. 2) foi maior que na fase mais avançada do período de lactação na data de aparecimento dos incisivos e na data de aberturas dos olhos. O número de células em processo de apoptose é pequeno inicialmente e aumenta significativamente entre o 10º e 18º dia de lactação, data de abertura dos olhos das crias (Fig. 3 e 4). A involução da glândula é continuada até o período de desmame onde a porcentagem de células em processo de apoptose mantém-se elevado (Fig. 5 e 6). No 19º dia de prenhez já podem ser observadas células positivas para receptores de prolactina nos alvéolos embora poucas quando comparadas aos outros grupos, (Fig. 7 e 8), indicando o início do processo de produção do leite. O aumento de células positivas para receptor de prolactina é dramático quando se compara a glândula no final de prenhez com o primeiro dia de lactação. Depois disso permanece em patamares constantes e elevados até o desmame (Fig. 9). Neste período a glândula mamária mostra-se ainda ativa para a produção de leite (Fig. 10).

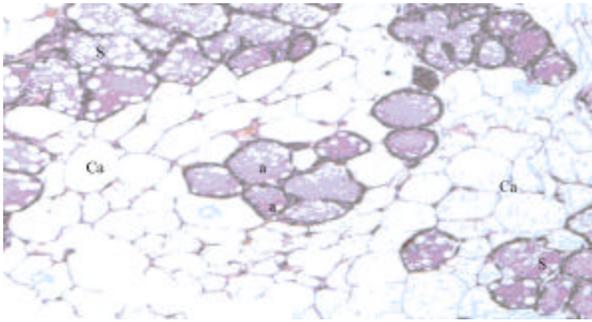


Fig.1 - Fotomicrografia de cortes corados por H.E. Glândula mamária de fêmeas de camundongos. a: alvéolos, ca: células adiposas, S: secreção. Aumento microscópico de 100X. Grupo 1 – 19^a dia de gestação.

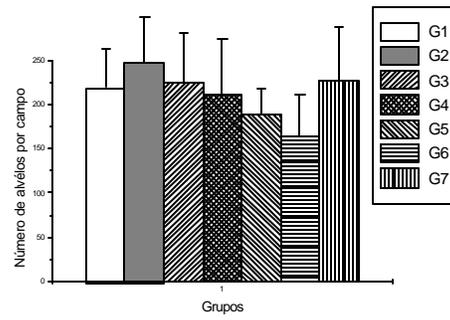


Fig.2 - Número de alvéolos por campo microscópico em glândulas mamárias de fêmeas de camundongos. Foram contados três campos microscópicos com aumento de 100X por glândula.

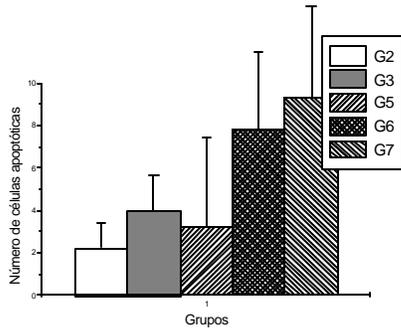


Fig.3 - Porcentagem de células em processo de apoptose nos alvéolos de glândulas mamárias de fêmeas de camundongos. Foram contados 10 campos microscópicos com aumento de 400X por glândula. Foram avaliados os grupos 2, 3, 5, 6 e 7.

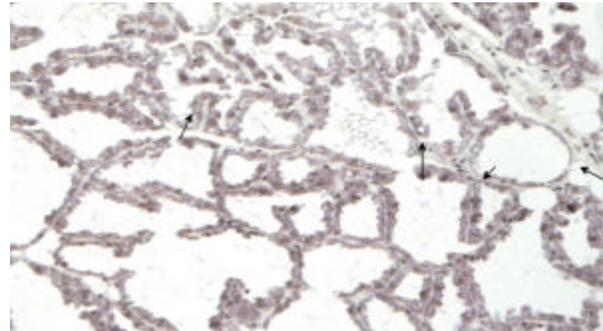


Fig.4 - Fotomicrografia de cortes corados pelo método TUNEL. Glândula mamária de fêmeas de camundongos. Setas: células apoptóticas. Aumento microscópico de 100X. Grupo 6 - Dia da evidência da abertura dos dois olhos.

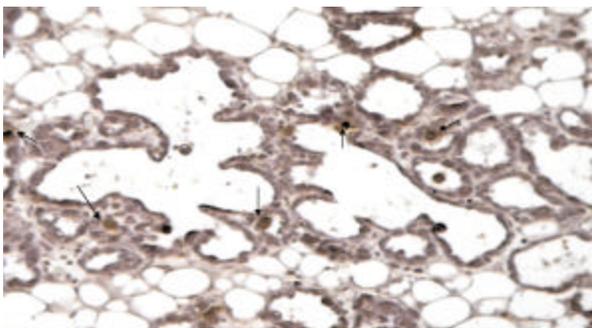


Fig.5 - Fotomicrografia de cortes corados pelo método TUNEL. Glândula mamária de fêmeas de camundongos. Setas: células apoptóticas. Aumento microscópico de 100X. Grupo 7 – Desmame.

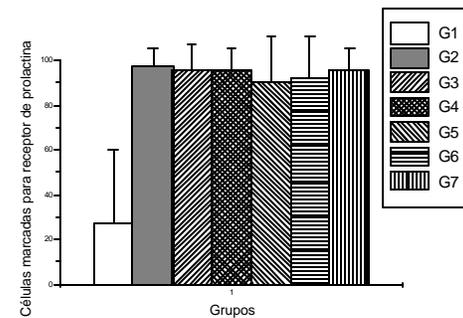


Fig.6 - Porcentagem de células positivas para receptor de prolactina, nos alvéolos de glândulas mamárias de fêmeas de camundongos. Foram contados 10 campos microscópicos com aumento de 400X por glândula.

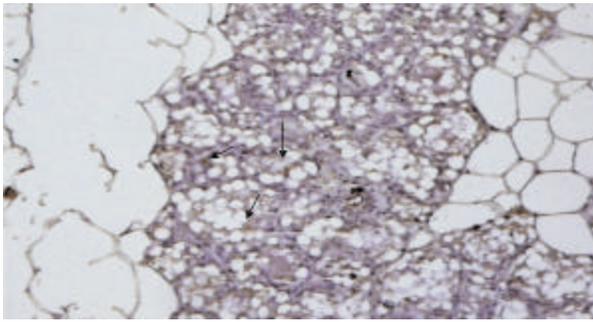


Fig.7- Fotomicrografia de cortes corados pela técnica de imunohistoquímica para receptor de prolactina. Glândula mamária de fêmeas de camundongos. Seta: células marcadas. Aumento microscópico 100X. Grupo 1 - 19º dia de gestação.

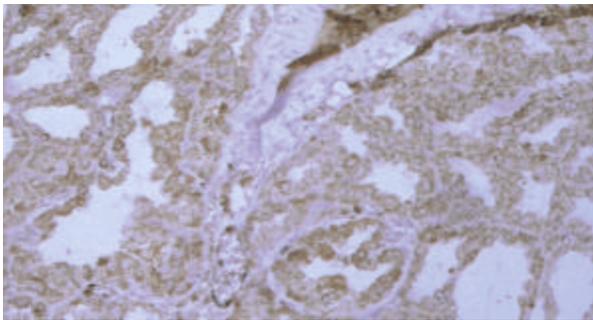


Fig.8 - Fotomicrografia de cortes corados pela técnica de imunohistoquímica para receptor de prolactina. Glândula mamária de fêmeas de camundongos. Aumento microscópico 100X. Grupo 7 - Desmame.

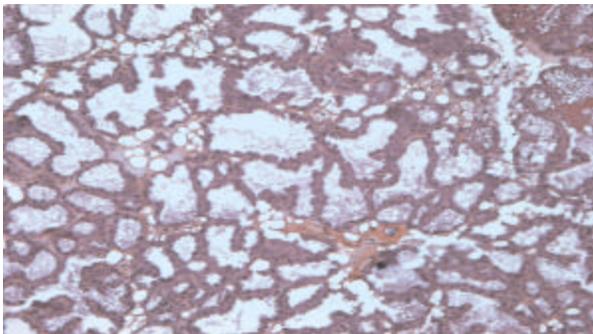


Fig.9 - Fotomicrografia de cortes corados por H.E. Glândula mamária de fêmeas de camundongos. a: alvéolos, ca: células adiposas, S: secreção. Aumento microscópico de 100X. Grupo 7 - Desmame.

DISCUSSÃO

O primeiro dia de vida pós-natal é uma fase crítica do desenvolvimento. Logo após o parto, ratos, seres humanos e outros mamíferos são absolutamente dependentes dos cuidados parentais e do leite materno

para sua sobrevivência. O leite produzido no primeiro dia de vida pós-natal denomina-se colostro e por ele, são transferidos anticorpos da mãe para o recém-nascido (SILVA & VASCONCELLOS, 1988; TUCKER, 1994). Seres humanos e, também camundongos recém-nascidos, são imunologicamente deficientes (JAKOI *et al.*, 1985; AHOUSE *et al.*, 1993).

Considera-se que quando as crias abrem os olhos elas tornam-se relativamente independentes das mães por que começam a se alimentar de sólidos (SHIPMAN *et al.*, 1987). Iniciada a alimentação sólida, o número de mamadas diminui, conseqüentemente o estímulo da sucção que é indispensável para a manutenção da produção de prolactina e ocitocina começa a reduzir, levando à baixa dos níveis de prolactina e ao começo da involução da glândula mamária (FUCHS *et al.*, 1984) que conforme QUARRIE *et al.* (1996) começa antes do final da lactação .

No presente estudo no 19º dia de prenhez já é observada a presença de alvéolos secretores nas extremidades dos ductos, parênquima composto por grande quantidade de tecido adiposo, entremeando-se com septos de tecido conjuntivo frouxo. Tais resultados são condizentes com dados de literatura que se referem ao aspecto da glândula mamária no final de prenhez (SEAGROUES & ROSEN, 2001). Semelhante ao relatado por Tucker, (1994) a partir do 19º dia de prenhez os alvéolos estão bem dilatados e apresentam secreção, embora, habitualmente, a glândula mamária inicie a secreção apenas após o parto.

Há controvérsia sobre o papel da prolactina na indução de apoptose. PERK *et al.* (2003) relatam ação antiapoptótica da prolactina na sobrevivência das células humanas do corpo lúteo. A prolactina também está relacionada a regulação do pool de linfócito T, inibindo o mecanismo de morte celular. (BUCKLEY & BUCLEY, 2000). Neste estudo foi observado a permanência em níveis constantes e elevados até o desmame de células positivas para receptor de prolactina pode estar envolvido no índice de apoptose.

Os nossos resultados sugerem que existem dois fatos relevantes que devem ser considerados, o primeiro é um percentual elevado de células positivas para receptor de prolactina nos alvéolos mamários desde o primeiro dia de lactação até o período de desmame. O segundo, de importância para os estudos sobre toxicologia, diz respeito ao momento de início da involução da glândula, que parece acontecer algum tempo depois do aparecimento dos incisivos. Os estudos para avaliação de toxicidade pós-natal pressupõem que substâncias administradas às mães passam para o leite, são levadas ao lactante e exerçam nele seu efeito tóxico (SILVA & VASCONCELLOS, 1988). De acordo com os nossos resultados apresentados a glândula mamária inicia o processo de involução ainda na lactação, deste é necessário

reavaliar o período adequado para o tratamento materno.

A avaliação do processo de apoptose nas glândulas mamárias de fêmeas de camundongo durante a lactação demonstrou que o número de células em apoptose aumenta significativamente quando comparamos o início do período lactacional e a época do desmame. Estes resultados confirmam que a indução de apoptose está inversamente relacionada com o processo de sucção, atuando deste modo para a involução da glândula mamária após o desmame.

Finalmente nossos dados possibilitam sugerir que a glândula mamária de fêmea de camundongo tem um perfil histológico e imunohistoquímico característico na fase final da prenhez e em períodos específicos da lactação. Neste último caso há uma correlação entre os aspectos histológicos e imunohistoquímicos da glândula e fases do desenvolvimento das crias. Portanto, os estudos de histofisiologia, as avaliações toxicológicas e farmacológicas durante o período da lactação devem levar em consideração as particularidades específicas dos diferentes momentos do processo de lactação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHOUSE, J.J.; HAGERMAN, C.L.; MITTAL, P.; GILBERT, D.J.; COPELAND, G.; JENKINS, N.A.; SIMISTER, N.E. Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *J. Immunol.*, v.151, n.11, p.6076-6088, 1993.
- BROWN, R.E. Hormônios e comportamento parental. In: COSTA, M.J.R.P. & CROMBERG, V.U. (Eds.). *Comportamento materno em mamíferos: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia, 1998. p.53-99.
- BUCKLEY, A.R. & BUCKLEY, D.J. Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.917, p.522-523, 2000.
- CROWELL-DAVIS, S.L. & HOUP, K.A. Maternal behavior. *Vet. Clin. North Am.*, v.2, n.3, p.557-579, 1986.
- DAWSON-SAUNDERS, B. & TRAPP, R.G. *Bioestatística médica*. Santafé de Bogotá: Manual Moderno, 1993. 384p.
- FAVE, A. Techniques du controle toxicologique dans le domaine de la reproduction. In: TUCHMANN-DUPLESSIS, H. (Ed.). *Malfomations congénitas des mamifères*. Paris: Masson, 1971. p.293-314.
- FUCHS, A.R.; CUBILE, L.; DAWOOD, M.Y.; JORGENSEN, F.S. Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. *Endocrinology*, v.114, n.2, p.462-469, 1984.
- HAFEZ, E.S.E. Comportamento reprodutivo. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.). *Reprodução animal*. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. p.241-262.
- HENNIGHAUSEN, L.; GERTRAUD, W.R.; KAY-UNE, W.; LIU, X., Prolactin signaling in mammary gland development. *J. Biol. Chem.*, v.272, n.12, p.7567-7569, 1997.
- JAKOI, E.R.; CAMBIER, J.; SASLOW, S. Transepithelial transport of maternal antibody: purification of IgG receptor from newborn rat intestine. *J. Immunol.*, v.135, n.5, p.3360-3364, 1985.
- PARTON, M.; DOWSETT, M.; SMITH, I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ.*, v.322, p.1528-1532, 2001.
- PERKS, C.M.; NEWCOMB, P.V.; GROHMANN, M.; WRIGHT, R.J.; MASON, H.D.; HOLLY, J.M. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum. Reprod.*, v.18, n.12, p.2672-2677, 2003.
- QUARRIE, L.H.; ADDEY, C.V.; WILDE, C.J. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J. Cell Physiol.*, v.168, p.559-569, 1996.
- SEAGROVES, T.N. & ROSEN, M.J. Knockout and transgenic mouse models that have contributed to the understanding of normal mammary gland development. In: MUTZUK, M.; BROWN, W.C.; KUMAR, R.T. (Eds.). *Contemporary Endocrinology: Transgenics in Endocrinology*. Totowa: Humana Press Inc., 2001. p.205-229.
- SHIPMAN, L.J.; DOCHERTY, A.H.; KNIGHT, C.H.; WILDE, C.J. Metabolic adaptations in mouse mammary gland during a normal lactation cycle and in extended lactation. *Q. J. Exp. Physiol.*, v.72, p.303-311, 1987.
- SILVA, S.Z.C. & VASCONCELLOS, A.C. A lactação. In: BEDRAN, J.N. (Ed.). *O uso de drogas na gravidez e na lactação*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.14-23.
- SILVA, V.A. Métodos experimentais utilizados na avaliação de efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento. In: RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R.M. (Eds.). *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese (métodos e critérios da avaliação)*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.219-241.
- TESH, J.M. An approach to the assessment of postnatal development in laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, H.-J.; KWASIGROCH, T.E. *Methods in prenatal toxicology*. Massachusetts: PSG Publishing Company, 1977. p.186-201.
- TUCKER, H.A. Lactation and its hormonal control. In: KNOBILE, E. & NEILL, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.1064-1098.
- VAKKALA, M. & LÄHTEENMÄKI, K. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin. Cancer Res.*, v.5, p.319-324, 1999.
- VIEIRA, J.B.; RODRIGUES, S.A.; AARESTRUP, M.F. Tumor necrosis factor-alpha expression and detection of apoptosis at the site of chronic periodontitis in AIDS patients. *J. Periodont. Res.*, v.38, p.606-610, 2003.
- WOLFENSOHN, S. & LLOYD, M. *Handbook of laboratory animal management and welfare*. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1998. 334p. Chapter 6: Anaesthesia.

Recebido em 30/9/04

Aceito em 30/12/04