

# Histomorfometria da mama de ratas tratadas com estrogênio e/ou progestagênio

SUELI MARIA PEDA DOS SANTOS TORRES<sup>1</sup>, RICARDO SANTOS SIMÕES<sup>2</sup>, MARIA CÂNDIDA PINHEIRO BARACAT<sup>3</sup>, REGINA CÉLIA TEIXEIRA GOMES<sup>4</sup>, JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR<sup>5</sup>, ADRIANA APARECIDA FERRAZ CARBONEL<sup>4</sup>, EDMUND CHADA BARACAT<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Professora do Centro Universitário Lusiada — UNILUS; Mestrado pelo Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina — UNIFESP - EPM; Professora do Centro Universitário Lusiada — UNILUS, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Médico-assistente do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo — HU-USP; Doutorando da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo — FMUSP; Médico-assistente do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

<sup>3</sup> Aluna de Iniciação Científica da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da UNIFESP - EPM, São Paulo, SP

<sup>4</sup> Mestrado em Ciências da Saúde; Doutoranda do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP - EPM, São Paulo, SP

<sup>5</sup> Professor Associado e Livre-docente do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM, São Paulo, SP

<sup>6</sup> Professor Titular da Disciplina de Ginecologia da FMUSP, São Paulo, SP

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar as alterações histomorfométricas nas mamas de ratas tratadas com estrogênio e/ou progestagênio por curto período de tempo. **Métodos:** Foram divididas em quatro grupos 40 ratas ooforectomizadas: GC-recebeu veículo; GE-recebeu benzoato de estradiol (37,6 µg/animal); GP-recebeu acetato de medroxiprogesterona (11,28 mg/animal) e, GEP-recebeu benzoato de estradiol (37,6 µg/animal) e acetato de medroxiprogesterona (11,28 mg/animal). No grupo GE, o estradiol foi administrado durante sete dias, por via subcutânea. Já no grupo EP o estradiol foi administrado nos primeiros sete dias e o progestagênio por mais 23 dias, por via subcutânea. Vinte e quatro horas após a última administração dos hormônios, os animais foram anestesiados e o primeiro par de mamas inguinais removido, imerso em formaldeído a 10% e processado para inclusão em parafina, sendo os cortes corados pela Hematoxilina-Eosina. Foram avaliadas a morfologia e a área ocupada pelo parênquima mamário, sendo os dados submetidos à análise de variância complementado pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** As mamas no grupo-controle apresentaram-se atrofiadas, sendo que, nos animais dos grupos GE e GEP, nota-se a presença de alvéolos típicos contendo secreção no seu interior, já nos animais tratados somente com progestagênio (GP) notam-se alvéolos formados por células volumosas que ocupam praticamente todo o lúmen alveolar. A morfometria mostrou haver maior área de parênquima mamário nos animais tratados com hormônios ( $GE = GP > GEP > GC$ ;  $p < 0,05$ ). **Conclusão:** O estradiol e o progestagênio apresentaram efeito proliferativo no parênquima mamário. No entanto, a administração prévia de estradiol modifica a ação do progestagênio no tecido mamário da rata.

**Unitermos:** Mama; ratos; estradiol; 17-Acetato de medroxiprogesterona; terapia de reposição hormonal.

## SUMMARY

### Breast histomorphometry of rats treated with estrogen and/or progestogen

**Objective:** To evaluate the breast histomorphometric changes in rats treated with estrogen and/or progestogen for a short period of time. **Methods:** Forty oophorectomized rats were divided into four groups: GC, vehicle; GE, treated with estradiol benzoate (37.6 mg/animal); GP, treated with medroxyprogesterone acetate (11.2 mg/animal) and GEP, treated with estradiol benzoate (37.6 mg/animal) plus medroxyprogesterone acetate (11.28 mg/animal). In GE group, estradiol was administered subcutaneously for seven days; in GEP group, estradiol was administered once in a day for the first seven days and the progestogen over the next 23 days both subcutaneously. Twenty-four hours after the last hormone administration, the animals were killed upon deep anesthesia and the first inguinal breasts were removed, fixed in 10% formaldehyde and processed to be included in paraffin, with the sections being stained by hematoxylin-eosin. Morphology and the area occupied by mammary parenchyma were assessed, with the data undergoing analysis of variance followed by the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ). **Results:** The control group breasts were found atrophic and, in GE and GEP group animals, typical alveoli with secretion inside are present; in progestogen-treated animals (GP), alveoli formed by large cells occupying almost the entire alveolar lumen are noted. Morphometric analysis showed a larger mammary parenchyma area in hormone-treated animals ( $GE = GP > GEP > GC$ ;  $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Estradiol and progestogen had a proliferative effect on mammary parenchyma. However, prior estradiol administration changes the progestogen action on rat mammary tissue.

**Keywords:** Breast; rats; estradiol; medroxyprogesterone 17-acetate; hormone replacement therapy.

Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia da UNIFESP e no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP, São Paulo, SP

Artigo recebido: 29/09/2010  
Aceito para publicação: 25/01/2011

Suporte Financeiro:  
CAPES e CNPq

Correspondência para:  
Adriana Aparecida Ferraz Carbonel  
Rua Botucatu 740  
Disciplina de Histologia e Biologia  
Estrutural  
CEP: 04023009  
São Paulo – SP  
Tel/Fax: (11) 5576-4268  
adricarbonelfisio@hotmail.com

Conflito de interesses: Não há.

## INTRODUÇÃO

A passagem do período reprodutivo para o não reprodutivo nas mulheres, conhecido como climatério, é marcada por importantes alterações endócrinas, somáticas e psíquicas, devido à diminuição da produção de hormônios ovarianos. Esse período tem como marco a menopausa, isto é, a data da última menstruação por mais de 12 meses<sup>1,2</sup>.

Para a maioria das mulheres, nessa fase podem ocorrer sintomas como as ondas de calor, sintomas neuropsíquicos e secreta vaginal, dentre outros<sup>3,4</sup>.

A terapia hormonal (TH) substitutiva pode proporcionar diversos benefícios para as mulheres, sobretudo na pós-menopausa, mostrando-se eficaz para aliviar os principais sintomas resultantes do hipoestrogenismo<sup>5-7</sup>.

Contudo, há relatos de ocorrência de efeitos adversos a longo prazo com o emprego da terapia estroprogestativa, em especial quanto ao aumento do risco de câncer mamário<sup>8</sup>. De fato, vários estudos epidemiológicos têm relatado risco aumentado de câncer de mama, sendo o risco maior com o uso de estrogênios associados aos progestagênios do que com estrogênios isolados<sup>9</sup>.

A mama é uma estrutura que apresenta respostas variáveis aos hormônios esteroides. Sua interação hormonal é complexa; os esteroides sexuais podem atuar por via autócrina, parácrina e endócrina. Sob ação desses hormônios esteroides, o tecido mamário atinge seu desenvolvimento máximo<sup>10,11</sup>. A ação dos hormônios nos órgãos-alvo é decorrente da sua ligação com os receptores intracelulares, modulando a expressão dos genes e, consequentemente, a síntese de proteínas específicas<sup>12</sup>.

Há evidências de que os estrogênios estimulam o crescimento ductal<sup>13,14</sup>. No entanto, para alguns, os estrogênios produzem atrofia do epitélio mamário<sup>15</sup>. A adição de progestagênios à terapia estrogênica não reduz o risco de câncer de mama. Há evidências de que essa associação poderia aumentar a proliferação celular epitelial da mama<sup>16</sup>.

Contudo, questiona-se se o tratamento agudo com estrogênios ou progestagênios isolados ou associados altera o padrão de proliferação mamária. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos histomorfológicos e morfométricos da terapia com estrogênios e/ou progestagênios no tecido mamário de ratas adultas castradas.

## MÉTODOS

Foram utilizadas 40 ratas da linhagem EPM-1 Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultas, com 90 dias de idade, virgens, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (parecer nº 0820/07).

Os animais foram mantidos confinados em gaiolas plásticas, no biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural (UNIFESP/EPM), com temperatura ambiente con-

trolada a 22°C e iluminação artificial, obtida com lâmpadas fluorescentes, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro (7 h - 19 h) e 12 horas escuro (19 h - 7 h), com alimentação e água *ad libitum*.

Após um período de sete dias, todos os animais foram submetidos à ooforectomia bilateral e, após 30 dias, divididos aleatoriamente em quatro grupos constituídos por 10 ratas cada, a saber: GC - animais que receberam óleo de milho (veículo); GE - animais que receberam benzoato de estradiol (37,6 µg/animal), por via subcutânea, durante sete dias consecutivos; GP - animais que receberam acetato de medroxiprogesterona (11,28 mg/animal), por via subcutânea, durante 23 dias consecutivos; GEP - animais que receberam benzoato de estradiol (37,6 µg/animal) durante sete dias e, em seguida, acetato de medroxiprogesterona (11,28 mg/animal), por mais 23 dias consecutivos. Os hormônios foram administrados em doses análogas às usadas em mulheres pós-menopáusicas<sup>17</sup>.

Vinte e quatro horas após a última administração, todos os animais foram anestesiados com mistura de xilazina (20 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg), por via intraperitoneal e removidas as mamas do primeiro par da região inguinal. Em seguida, as mamas foram imersas em formaldeído a 10% e após fixação (24 horas) processados para inclusão em parafina segundo os métodos histológicos de rotina. Dos blocos foram obtidos cortes seriados de 4 µm (micrótomo LEICA - RM 2145) que foram corados pela hematoxilina e eosina para posterior análise histomorfológica e morfométrica. Para a análise morfométrica, foi determinada a área ocupada pelo tecido mamário e pelo adiposo. Foi utilizado sistema de captura de imagens, constituído por microscópio de luz (Carl Zeiss), adaptado a uma câmera de alta resolução (AxioCam - MRC da Carl Zeiss) e monitor de vídeo colorido (Samsung). As imagens obtidas foram avaliadas pelo programa de análise de imagens AxionVision REL 4.6 da Carl Zeiss. Para tanto, foi delimitada a área ocupada pelo parênquima mamário e pelo tecido adiposo em uma área de 380.10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup> em cada corte. Foram avaliados quatro cortes semiseriados em cada animal do experimento, sendo avaliada uma área total 152 x 10<sup>5</sup> µm<sup>2</sup> em cada grupo de estudo.

Para a análise dos resultados obtidos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste Kruskal-Wallis. As análises foram efetuadas empregando-se o programa de computador Prizma® (Califórnia, Estados Unidos da América) e Excel® (Microsoft). Em todos os testes estatísticos foram utilizados níveis de significância igual a 5% ( $\alpha \leq 0,05$ ).

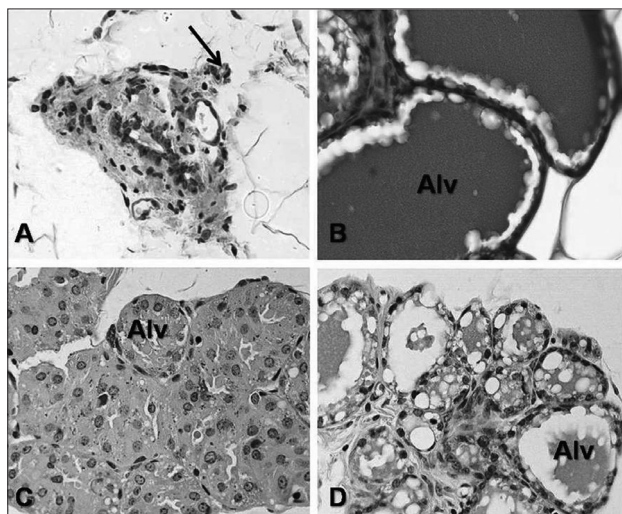
## RESULTADOS

A) Histomorfológicos: a mama dos animais pertencentes ao grupo-controle (GC) mostrou grande concentração de tecido adiposo e parênquima escasso onde foi possível identificar raros ductos e alvéolos rudimentares (Figura 1A). No interior destes últimos, podem-se identificar macrófagos contendo pigmento amarelado no seu interior. Já no

grupo tratado com estradiol (GE), observou-se parênquima bem mais desenvolvido, com a presença de ductos e alvéolos bem dilatados, a maioria apresentando material eosinófilo (secreção) em seu interior (Figura 1B).

No grupo medicado com progesterona isoladamente (GP), notamos no parênquima mamário inúmeras figuras de mitose, sendo que as células achavam-se dispostas em arranjos irregulares. Os ductos apresentavam-se revestidos por epitélio cilíndrico simples ou estratificado, sendo rodeados por tecido conectivo denso. Já os alvéolos estavam revestidos por epitélio cúbico simples, cujos núcleos esféricos encontravam-se deslocados para a região basal, e com citoplasma eosinófilo. Não foi identificada a presença de secreção no interior dos ductos e/ou dos alvéolos (Figura 1C).

**Figura 1** – Fotomicrografias mostrando porção do tecido mamário das ratas ooforectomizadas (A), tratadas com estradiol (B), com medroxiprogesterona (C) ou com a associação de estradiol e medroxiprogesterona (D). Observar em A presença de ducto mamário e alvéolo rudimentar (seta). Já em B e D notar que o estradiol induz a formação de alvéolos contendo secreção no seu interior, sendo que a medroxiprogesterona isoladamente (C) induz proliferação sem alvéolos típicos (Alv). H.E. 400X.



No grupo tratado com estradiol e medroxiprogesterona (GEP), o aspecto histológico era muito parecido com o do grupo tratado apenas com estrogênio, ou seja, achavam-se constituídas por ductos e alvéolos dilatados contendo secreção no seu interior. Nesse grupo (GEP), notamos que os

alvéolos possuíam menor tamanho e a secreção presente no lúmen dos alvéolos era mais rarefeita (Figura 1D).

B) Morfometria: os dados obtidos com relação à área dos parênquimas mamários das ratas pertencentes aos vários grupos de estudo estão expressos na Tabela 1.

## DISCUSSÃO

As informações quanto aos riscos e benefícios da reposição hormonal na pós-menopausa geram dúvidas e inseguranças. Apesar das pesquisas quantitativas sobre os sinais e sintomas, os aspectos psicossociais e do uso do tratamento hormonal, há poucas informações sobre o significado pessoal e a visão da experiência de mulheres brasileiras sobre esses temas.

O presente trabalho tentou reproduzir os efeitos dessa terapia hormonal usando doses de estrogênio e de progestagênio equivalentes às habitualmente utilizadas na reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa. Para tanto, foi realizado um cálculo halométrico, equacionando a dose de acordo com o peso e o metabolismo animal dos ratos<sup>17</sup>.

Com as dosagens hormonais utilizadas, nossos resultados mostraram haver menor área de parênquima mamário e de proliferação nos animais ooforectomizados e que não receberam hormônios. No entanto, foi detectada maior quantidade de parênquima mamário nos animais tratados com estradiol ou medroxiprogesterona isoladamente com relação ao grupo que recebeu, no início, estradiol e, posteriormente, medroxiprogesterona.

Nos animais que receberam estradiol (por todo o período do experimento ou nos primeiros dias do tratamento hormonal), notamos a presença de alvéolos contendo secreção no seu interior. Tal fato decorreria da liberação de prolactina pela hipófise sob ação estrogênica; haveria ainda inibição da secreção de gonadotrofinas<sup>18-20</sup>.

De fato, nossos resultados corroboram estudos de biópsias de mamas de mulheres na pós-menopausa, que demonstraram haver maior proliferação no epitélio em usuárias da TH, quando comparadas a um grupo de não usuárias de hormônios<sup>21,22</sup>. Nesses mesmos estudos, verificou-se que a maioria das alterações localizava-se na unidade ductolobular terminal, onde se desenvolve a maior parte dos tumores de mama.

Estudos experimentais também comprovaram alterações proliferativas nas mamas de camundongos tratadas com 17-betaestradiol<sup>23</sup>. Sabe-se que parte das pacientes

**Tabela 1** – Médias, desvios-padrão e percentagem da área ocupada pelo parênquima mamário de ratas ooforectomizadas e tratadas com estradiol, medroxiprogesterona ou a associação de estradiol e medroxiprogesterona

	Grupos de estudo			
	GC	GE	GP	GEP
Área total ocupada 10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup>	1.915,20 ± 133,30	11.948,72 ± 287,28	10.488,00 ± 342,21	7.546,80 ± 260,52
% de área ocupada	12,16	78,61	69,00	49,65

GC, grupo-controle; GE, grupo estradiol; GP, grupo medroxiprogesterona; GEP, grupo tratado com estradiol e medroxiprogesterona (GE = GP > GEP > GC; p < 0,05).

refere sintomas relacionados à glândula mamária na fase pré-menstrual, como mastalgia, aumento de volume da consistência das mamas à palpação, resultantes da ação dos estrogênios. Esses fenômenos devem-se, provavelmente, ao estímulo trófico que ocorre no tecido fibroglandular atrófico da pós-menopausa<sup>24</sup>. As mulheres na pré-menopausa têm tendência a apresentar maior quantidade de tecido ductoglandular e fibroso nas mamas, comparativamente ao tecido adiposo. Essa relação se inverte com o transcorrer do tempo, chegando a uma substituição por tecido adiposo quase que completa na pós-menopausa<sup>25</sup>.

Em nosso experimento, o que chamou a atenção foi o fato de a mama de ratas ter comportamento morfológico diferente nos animais que receberam no início estradiol e posteriormente medroxiprogesterona, diferentemente dos animais tratados somente com medroxiprogesterona. O progestagênio isoladamente induziu ao aumento do parênquima mamário, sem, no entanto, a formação de alvéolos típicos. Já nos animais previamente tratados com estradiol, esse comportamento foi bem diferente, pois os alvéolos mostraram-se mais regulares. Esses dados estão em consonância com os obtidos com as técnicas de biologia molecular e proteômica, que mostram a necessidade de haver uma ativação sequencial na sinalização hormonal sobre o epitélio mamário para a progressão da morfogênese, ou seja, da formação dos alvéolos mamários<sup>26</sup>.

No que diz respeito à associação dos hormônios sexuais e câncer de mama antes da menopausa, sua pesquisa é extremamente difícil e acha-se prejudicada pela grande flutuação dos níveis hormonais que ocorre durante o ciclo menstrual. Não se demonstrou claramente haver relação entre o risco de câncer de mama e os níveis de estrogênio em mulheres pré-menopáusicas, possivelmente porque estão constantemente acima do limite necessário para estimular o crescimento do câncer de mama<sup>27</sup>. Já a relação de reposição hormonal, em mulheres na pós-menopausa, em curto prazo, com o desenvolvimento do câncer de mama é incerta com base em vários estudos com resultados inconsistentes. Entre os estudos que indicam aumento do risco, o risco é essencialmente limitado a longo prazo (> 5-10 anos), e o risco é relativamente pequeno (RR 1,2-1,5)<sup>28</sup>.

Assim, novas pesquisas nessa linha devem ser realizadas com a finalidade de esclarecer a relação do câncer de mama com a dose e a duração do tratamento hormonal na pós-menopausa.

## CONCLUSÃO

O estradiol e a medroxiprogesterona apresentam efeito proliferativo no parênquima mamário; no entanto, a administração prévia de estradiol modifica a ação do progestagênio no tecido mamário de ratas adultas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Associado Manuel de Jesus Simes do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

## REFERÊNCIAS

1. Belkis T, Santos CG. Menopausa ou menopausas? *Saúde Soc.* 2005;14(1):91-100.
2. Chedraui P, Pérez-López FR, Aguirre W, Calle A, Hidalgo L, León-León P *et al.* Perceived control over menopausal hot flushes in mid-aged women. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(8):607-11.
3. Eskes GA, Longman S, Brown AD, McMorris CA, Langdon KD, Hogan DB *et al.* Contribution of physical fitness, cerebrovascular reserve and cognitive stimulation to cognitive function in postmenopausal women. *Front Aging Neurosci.* 2010;2(1):137.
4. Galhardo CL, Soares JM Jr, Simões RS, Haidar MA, Rodrigues de Lima G, Baracat EC. Estrogen effects on the vaginal pH, flora and cytology in late postmenopause after a long period without hormone therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2006;33(2):85-9.
5. Genazzani AR, Nicolucci A, Campagnoli C, Crosignani P, Nappi C, Serra GB *et al.* Assessment of the QoL in Italian menopausal women: comparison between HRT users and non-users. *Maturitas* 2002;42(2):267-80.
6. Lóránd T, Vigh E, Garai J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. *Curr Med Chem.* 2010;17(30):3542-74.
7. Chen CL, Weiss NS, Newcomb P, Barlow W, White E. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA* 2002;287(6):734-41
8. Kerlikowske K, Cook AJ, Buist DS, Cummings SR, Vachon C, Vacek P *et al.* Breast cancer risk by breast density, menopause, and postmenopausal hormone therapy use. *J Clin Oncol.* 2010;28(24):3830-7.
9. Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, Archer DF, Boyd N, Braunstein GD *et al.* Endocrine Society. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7 Suppl 1):s1-s66.
10. Nair R, Junankar S, O'Toole S, Shah J, Borowsky AD, Bishop JM *et al.* Redefining the expression and function of the inhibitor of differentiation 1 in mammary gland development. *PLoS One* 2010;5(8):e11947.
11. Varas SM, Muñoz EM, Hapon MB, Aguilera Merlo CI, Giménez MS, Jahn GA. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. *Reproduction* 2002;124(5):691-702.
12. Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol.* 2000;21(1):57-94.
13. Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Gompel A. Estradiol/progesterone interaction in normal and pathologic breast cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;464(2):152-67.
14. Chang KJ, Lee TT, Linares-Cruz G, Fournier S, de Lignières B. Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle in vivo. *Fertil Steril.* 1995;63(4):785-91.
15. Silva BB, Gebrim LH, Simões MJ, Baracat EC, Lima GR. Efeitos do tamoxifeno e dos estrogênios conjugados no epitélio mamário de ratas em estro permanente. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2000;22(1):33-6.
16. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ *et al.* The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995;332(24):1589-93.
17. Vicelli JT, Gurgel MSC, Alvarenga M. Histologia mamária após uso de esteróides sexuais - estudo em ratas. *Rev Assoc Med Bras.* 2006;52(5):369-74.
18. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG. Role of estrogen receptoralpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol.* 1997;11:674-81.
19. Gordon A, Garrido-Gracia JC, Aguilar R, Sánchez-Criado JE. Ovarian stimulation with FSH in the rat reduces proestrous GnRH-dependent LH secretion through a dual mechanism: inhibition of LH synthesis and release. *Neurosci Lett.* 2009;460(3):219-22.

20. Jean A, Gutierrez-Hartmann A, Duval DL. A Pit-1 threonine 220 phosphomimic reduces binding to monomeric DNA sites to inhibit Ras and estrogen stimulation of the prolactin gene promoter. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):91-103.
21. Valadares AL, Pinto-Neto AM, Conde DM, Osis MJ, Sousa MH. Depoimentos de mulheres sobre a menopausa e o tratamento de seus sintomas. *Rev Assoc Med Bras*. 2008; 54(4):299-304.
22. Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathak DR, Slomski CA, Haslam SZ. Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(12):4559-65.
23. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 102(1-5):89-96.
24. McNicholas MM, Heneghan JP, Milner MH, Tunney T, Hourihane JB, Mac Erlaine DP. Pain and increased mammographic density in women receiving hormone replacement therapy: a prospective study. *AJR Am J Roentgenol*. 1994;163 (2):311-5.
25. Simões BM, Piva M, Iriondo O, Comaills V, López-Ruiz JA, Zabalza I *et al*. Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Sep 22. Epub ahead of print.
26. Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(10):a003178.
27. Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2003;5(5):239-47.
28. Humphrey LL. Hormone replacement therapy and breast cancer. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality; 2002.