

Efeitos da terapia estro-raloxifeno sobre o endométrio de ratas

Effects of combined estrogen and raloxifene therapy on rat endometrium

Alexandre Vieira Santos Moraes¹, Ricardo Santos Simões², Ligia Furtado Fonzar³, Manuel de Jesus Simões⁴, José Maria Soares Junior⁵, Mauro Abi Haidar⁵, Edmund Chada Baracat⁶

RESUMO

Objetivo: avaliar os efeitos dos estrogênios conjugados equinos (Ece) e do raloxifeno (Ral), isoladamente ou associados, sobre o endométrio de ratas adultas. **Métodos:** foram utilizadas 56 ratas adultas, ooforectomizadas, divididas aleatoriamente em sete grupos: GCont (controle); GEce (Ece 50 µg/kg); GEce/25 (Ece 25 µg/kg); GRal/0,75 (Ral 0,75 mg/kg); GRal/0,4 (Ral 0,4 mg/kg); GEce-Ral (50/0,75) - (Ece 50 µg/kg + Ral 0,75 mg/kg) e GEce-Ral (25/0,4) - (Ece 25 µg/kg + Ral 0,4 mg/kg). As drogas foram administradas por gavagem durante 21 dias consecutivos. Ao final da administração todos os animais foram anestesiados e fragmentos dos úteros removidos, fixados em formol a 10% e processados para inclusão em parafina. Os cortes obtidos foram corados por HE e submetidos à avaliação histomorfométrica. Foram avaliados os seguintes parâmetros: espessura do epitélio superficial, número de glândulas endometriais/mm² e número de vasos sanguíneos presentes no miométrio/mm². Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística de ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer. **Resultados:** nos grupos controle (Gcont) e tratados isoladamente com raloxifeno (GRal/0,75 e GRal/0,4) o endométrio mostrou-se atrófico. Já nos grupos tratados com Ece isoladamente foi observado endométrio muito desenvolvido, sendo este efeito mais acentuado no grupo que recebeu 50 µg/kg, no qual encontramos aumento da espessura do epitélio superficial e da lâmina própria e no número de glândulas endometriais e de vasos sanguíneos. Notamos também proliferação endometrial nos grupos que receberam a associação de Ece e Ral (GEce-Ral - 50/0,75) e (GEce-Ral - 25/0,4). **Conclusão:** o raloxifeno parece bloquear parcialmente a ação do estrogênio no endométrio de ratas adultas castradas.

PALAVRAS-CHAVE: Raloxifeno; Estrogênios; Terapia de reposição hormonal; Endométrio

ABSTRACT

Purpose: to evaluate the effects of conjugated equine estrogens (CEE) and raloxifene (Ral), alone or combined, on the rat endometrium. **Methods:** fifty-six adult rats were ovariectomized and randomly divided into seven groups: GCont (control); GCEE (CEE 50 µg/kg); GCEE/25 (CEE 25 µg/kg); GRal/0.75 (Ral 0.75 mg/kg); GRal/0.4 (Ral 0.4 mg/kg); GCEE-Ral (50/0.75) - (CEE 50 µg/kg + Ral 0.75 mg/kg), and GCEE-Ral (25/0.4) - (CEE 25 µg/kg + Ral 0.4 mg/kg). The drugs were orally administered (gavage) for 21 consecutive days. At the end of the experiment, all animals were anesthetized and sacrificed. Fragments of uterus were removed, fixed in 10% formaldehyde and processed for paraffin inclusion. The histological sections were stained by HE and submitted to histomorphometric evaluation. The following parameters were analyzed: thickness of superficial epithelium and number of endometrial glands/mm² and of blood vessels/mm². The data were evaluated using ANOVA followed by the Turkey-Kramer test. **Results:** in the GCont and only Ral treatment (GRal/0.75 and GRal/0.4) the endometrium showed signals of atrophy. In the groups treated with only CEE signs of endometrial proliferation were observed, mainly in group GCEE/50. Also, there was endometrial proliferation in the groups that received combined CEE and Ral (Ral GCEE (50/0.75) and GCEE-Ral (25/0.4)), but it was more intensive in the animals treated with isolated estrogen than in those that received combined estrogen and raloxifene. **Conclusion:** raloxifene may partially block the action of estrogen on the castrated adult rat endometrium.

KEYWORDS: Raloxifene; Estrogens; Hormone replacement therapy; Endometrium

Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

1 Pós-graduando do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - São Paulo (SP), Brasil.

2 Médico residente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - São Paulo (SP), Brasil.

3 Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - São Paulo (SP), Brasil.

4 Professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - São Paulo (SP), Brasil.

5 Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - São Paulo (SP), Brasil.

6 Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e da Disciplina de Ginecologia da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência: José Maria Soares Júnior

Rua Sena Madureira 1245, apto. 11 – 04151-021– São Paulo – SP – e-mail: jsoares415@hotmail.com

Recebido em: 20/2/2006

Aceito com modificações em: 27/3/2006

Introdução

Nos últimos anos, o interesse sobre os fatores psíquicos e fisiológicos da menopausa cresceu muito, principalmente no que tange ao tratamento dos sintomas associados a esta fase da vida da mulher. Esta preocupação levou ao surgimento de novas terapias para o tratamento das eventuais conseqüências do hipostrogenismo no organismo feminino. Deve-se salientar que o emprego da terapia hormonal na pós-menopausa apresenta benefícios, mas também alguns riscos, predominantemente os relacionados aos fenômenos trombo-embólicos, doenças cardiovasculares e câncer de mama^{1,2}.

A terapia hormonal (TH) estrogênica ou estroprogestativa é empregada em geral para aliviar os sintomas vasomotores e amenizar a atrofia genital, bem como para prevenir as fraturas oriundas da osteoporose³. Entretanto, a longa exposição aos estrogênios e aos progestagênios pode incrementar o risco de câncer ginecológico, principalmente mamário, embora haja também alguns relatos de câncer endometrial e ovariano^{4,5}.

Os estrogênios são esteróides sintetizados a partir do colesterol e exercem ação proliferativa sobre o endométrio, tanto no estroma quanto nos epitélios de revestimento e glandular⁶. Por esta razão, estes hormônios podem levar à proliferação das células endometriais e desenvolvimento gradual de hiperplasia, hiperplasia atípica e câncer endometrial⁷, bem como aumentar o risco para câncer de mama, por estarem associados com a proliferação e promoção de tumores responsivos aos estrogênios⁸.

Até o momento há poucas alternativas disponíveis para a TH que não seja o uso dos estrogênios. O surgimento dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (*selective estrogen receptor modulators*, SERMs) proporciona opções para um grande número de pacientes, principalmente para aquelas com risco aumentado para o câncer de mama⁹. Os SERMs são compostos que exercem simultaneamente atividades estrogênicas e antiestrogênicas, na dependência do órgão alvo⁹.

O raloxifeno é um SERM, derivado benzotiofeno não esteróide, que pode ter efeito estrogênico em alguns tecidos, como osso, preservando sua densidade mineral e diminuindo o risco de fratura vertebral, e também, ação antagonista aos estrogênios na mama e útero. Esta última propriedade é interessante, pois poderia proteger a mama e o endométrio de processos proliferativos¹⁰⁻¹².

Estudos mostraram que o raloxifeno bloqueia a concentração das proteínas PS2 e C3, parâmetros da expressão gênica induzida pelo estrogênio,

em cultura de células ECC1 (linhagem de adenocarcinoma endometrial humano bem diferenciado)¹³. Dardes et al.¹⁴ relataram que o raloxifeno diminui a expressão de proteínas do receptor alfa de estrogênio, o que pode justificar a ação antagonista deste SERM; além disso, mostraram também que o raloxifeno bloqueia parcialmente o efeito proliferativo dos estrogênios nas células ECC1 *in vitro*.

Em estudo multicêntrico com mais de 1000 mulheres na menopausa durante seis meses, observou-se que o raloxifeno causou menor sangramento uterino e diminuição do volume do útero e do eco endometrial, em comparação com os estrogênios que modificaram esses parâmetros¹⁵. Assim, a associação do raloxifeno ao estrogênio poderia reduzir o risco de proliferação endometrial, por isso, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos da associação dos estrogênios ao raloxifeno, em doses convencionais e em baixas doses, sobre o endométrio de ratas adultas.

Métodos

Foram utilizadas 56 ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, pesando aproximadamente 250 gramas, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (projeto n° 0130/06).

Os animais foram mantidos confinados em gaiolas plásticas, no biotério da Disciplina de Histologia com temperatura ambiente controlada a 22°C e iluminação artificial, obtida com lâmpadas fluorescentes, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro (7:00-19:00 h) e 12 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*.

Após período de adaptação de aproximadamente duas semanas, todos os animais foram submetidos a ooforectomia bilateral, após anestesia prévia com cetamina e xilazina (0,1 mg/kg).

Após 28 dias do ato cirúrgico, todos os animais foram divididos, aleatoriamente, em sete grupos, a saber: G-Cont - ratas que receberam propilenoglicol (0,5 mL; G-Ece/50 - ratas que receberam estrogênios conjugados eqüinos (Ece) 50 µg/kg; G-Ece/25 - ratas que receberam Ece na dose de 25 µg/kg; G-Ral/0,75 - ratas que receberam raloxifeno (Ral) 0,75 mg/kg; G-Ral/0,4 - ratas que receberam Ral 0,4 mg/kg; G-Ece-Ral (50/0,75) - ratas que receberam Ece (50 µg/kg) e Ral (0,75 mg/kg); G-Ece-Ral (25/0,4) - ratas que receberam Ece (25 µg/kg) e Ral (0,4 mg/kg).

Tanto o Ece quanto o Ral foram dissolvidos em propilenoglicol, sendo o volume total adminis-

trado por gavagem de 0,5 mL durante 21 dias consecutivos, sempre no mesmo período do dia (das 16:00 às 17:00 horas).

Após o último dia da administração das drogas, todos os animais foram novamente anestesiados com cetamina e xilazina (0,1 mg/kg), sendo a seguir retirados fragmentos do terço médio do útero, os quais foram imersos em formol a 10% tamponado, para fixação por período de 24 horas. Em seguida foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina segundo as técnicas preconizadas para inclusão em parafina. A inclusão foi realizada de tal maneira que pudéssemos observar, nas lâminas histológicas, cortes transversais dos cornos uterinos. Na seqüência, os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4 μ m e as lâminas com os cortes submetidas ao método de coloração pela hematoxilina e eosina.

Análise morfométrica

A avaliação histológica e morfométrica foi realizada por captura de imagens e analisada pelo programa Axiovision 4 REL (Zeiss). Este processo consiste de um microscópio de luz (AxioLab Standard 20, Carl Zeiss) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (Zeiss), que transmite a imagem a um computador. Este procedimento foi realizado no Laboratório da Disciplina de Histologia da UNIFESP-EPM.

Para cada animal, foram feitas medições em cinco lâminas. Foram analisados os seguintes parâmetros: espessura do epitélio superficial, número de glândulas endometriais e número de vasos sanguíneos presentes no miométrio.

A espessura do epitélio superficial e do estroma endometrial foi obtida dividindo-se cada corte em quatro quadrantes e tomando-se uma medida em cada um deles. A medida do epitélio superficial foi obtida medindo-se a distância de uma linha paralela à superfície apical das células luminiais até outra linha paralela à lâmina basal; já o estroma, desde a lâmina basal até o limite do miométrio.

O número de glândulas endometriais e de vasos sanguíneos foi observado em área de 1 mm². A descrição morfológica foi baseada na observação realizada com objetivas de 4 a 100 vezes, para a caracterização do endométrio, assim como a presença de eventuais alterações. Já as medidas da espessura do endométrio (epitélio superficial e estroma) foram feitas com objetivas de 40 ou 100 vezes.

As médias e desvios-padrão das médias foram calculados em cada grupo. Após a análise de variância (ANOVA), realizou-se o pós-teste de Tukey-Kramer quando houve diferença entre os grupos. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5%.

Resultados

Morfológicos

No grupo controle (GCont) o útero de forma geral apresentou-se atrofiado. O endométrio achava-se revestido internamente por epitélio constituído por células pavimentosas ou cúbicas contendo núcleos esféricos, pequenos e heterocromáticos. A lâmina própria mostrava inúmeras células com núcleos pequenos, heterocromáticos, poucas glândulas endometriais e escassa substância intercelular (Figura 1A). Os demais grupos, exceto o GEce-Ral (25/0,4), apresentaram-se mais desenvolvidos do que o grupo controle, ou seja, epitélio superficial do tipo cilíndrico simples, contendo células volumosas, lâmina própria rica em substância intercelular e inúmeras glândulas (Figura 1B). O endométrio (epitélio superficial e a lâmina própria) apresentou-se bem desenvolvido nos grupos tratados com estrogênios isoladamente (GEce/50 e GEce/25) e no tratado com a maior dose de raloxifeno (GRal/0,75) (Figura 1C). Nos grupos nos quais ocorreu a associação do Ral e do Ece observamos endométrio, em especial a lâmina própria, pouco desenvolvido (Figura 1D).

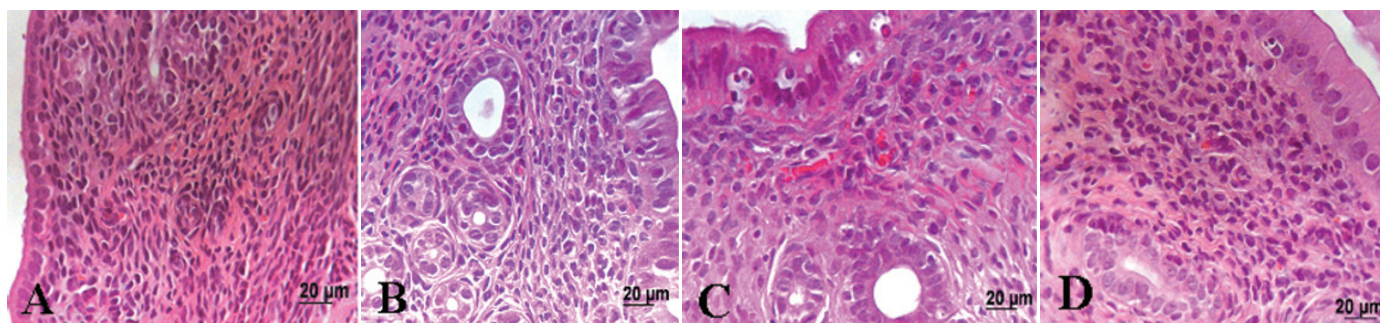


Figura 1 -Fotomicrografias mostrando partes de cortes de endométrios das ratas pertencentes aos vários grupos de estudo. Em A observar útero de rata pertencente ao grupo controle; em B útero de rata tratada com estrogênios eqüinos conjugados (50 μ g/kg), em C útero de rata tratada com raloxifeno (0,75 mg/kg) e em D útero de rata tratada com a associação de estrogênios eqüinos conjugados (50 μ g/kg) e raloxifeno (0,75 mg/kg).

Morfometria

Nossos resultados morfométricos estão expressos na Tabela 1, onde notamos que a administração de Ece ou Ral isolados ou em conjunto

aumentou a espessura do epitélio superficial (μm), ou seja, $\text{GCont} < \text{GEce}/25$, $\text{GRal}/0,75$, $\text{GRal}/0,4$, $\text{GEce-Ral} (50/0,75)$ e $\text{GEce-Ral} (25/0,4) < \text{GEce}50$.

Tabela 1 - Dados histomorfométricos do miométrio de ratas ooforectomizadas, controle (GCont) ou tratadas uma vez ao dia, a partir do 28º dia da ooforectomia, com raloxifeno (Ral) e/ou estrógenos conjugados eqüinos (Ece) durante 21 dias consecutivos, no seguinte esquema: GEce/50 - 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; GEce/25 - 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$; GRal/0,75 - Ral 0,75 mg/kg; GRal/0,4 - Ral 0,4 mg/kg; GEce-Ral (50/0,75) e GEce-Ral (25/0,4). Os dados são média \pm DP de observações em 5 lâminas para cada animal. Em cada grupo, n = 8.

	Grupos de Estudo						
	GCont	GEce/50	GEce/25	GRal/0,75	GRal/0,4	GEce-Ral (50/0,75)	GEce-Ral (25/0,4)
Espessura do epitélio superficial (μm)	17,4 \pm 1,9 ^a	38,8 \pm 1,4 ^b	25,2 \pm 1,7	30,1 \pm 3,4	27,4 \pm 4,1	29,5 \pm 3,0	26,1 \pm 1,8
Espessura da lâmina própria (μm)	291,9 \pm 38,6 ^c	622,1 \pm 72,3 ^d	543,6 \pm 47,5 ^d	393,5 \pm 69,1	361,3 \pm 45,4	358,7 \pm 35,9	302,1 \pm 49,4
Número de glândulas endometriais/mm ²	7,3 \pm 3,0	18,7 \pm 4,4 ^e	8,7 \pm 1,5	11,5 \pm 2,1	10,3 \pm 3,2	12,5 \pm 0,7	11,7 \pm 2,5
Número de vasos sanguíneos/mm ²	9,2 \pm 2,2	24,0 \pm 5,7 ^f	17,3 \pm 4,9 ^f	18,3 \pm 6,6 ^f	8,7 \pm 2,1	8,3 \pm 3,1	8,1 \pm 3,5

Epitélio superficial: ^a - p < 0,01 comparado com todos os outros grupos e ^b - p < 0,01 comparado aos outros grupos; espessura da lâmina própria: ^c - p < 0,01 comparado com todos os outros grupos; ^d - p < 0,01 comparados aos outros grupos; número de glândulas endometriais: ^e - p < 0,01 comparado com todos os outros grupos; número de vasos sanguíneos: ^f - p < 0,01 comparados aos outros grupos.

Com relação à espessura da lâmina própria (μm), obtivemos maiores valores nos grupos tratados isoladamente com estrogênios e com a maior dose de raloxifeno, ou seja: $\text{GCont} < \text{GEce}/50$, $\text{GEce}/25$ e $\text{GRal}/0,75$.

O número de vasos sanguíneos contados numa área de 1 mm² mostrou-se aumentado nos grupos tratados com estrogênios isoladamente e no que recebeu raloxifeno na dose de 0,75 mg/kg. ($\text{GCont} < \text{GEce}/50$, $\text{GEce}/25$ e $\text{GRal}/0,75$).

Já o número de glândulas endometriais por mm² foi maior no grupo tratado com estrogênios conjugados eqüinos na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($\text{GEce}50 > \text{GCont}$, $\text{GEce}25$, $\text{GRal} 0,75$, $\text{GRal} 0,4$, $\text{GEce-Ral} (50/0,75)$ e $\text{GEce-Ral} (25/0,4)$).

Discussão

O Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer¹⁶ combinou dados originais de 51 estudos que mostraram acréscimo no risco de câncer de mama em mulheres usuárias de TH. Esses estudos, junto com o estudo HERS e WHI, relacionam o progestagênio como fator envolvido neste risco. Além disso, a ministração isolada de estrogênios está relacionada com maior incidência de neoplasia endometrial¹⁷. Assim, procura-se a substituição do progestagênio por outro agente que possa bloquear a ação proliferativa endometrial, sem interferir com os benefícios do estrogênio. Por este motivo, pode-se escolher o raloxifeno (modulador seletivo do receptor de estrogênio), que bloqueia a ação estrogênica *in vitro*¹³. Contudo, os efeitos da combinação estro-raloxife-

no no endométrio ainda são pouco conhecidos. Por este motivo, investigamos esta ação com diferentes doses da associação de estrogênios e de raloxifeno.

Os SERMs são compostos que exercem simultaneamente atividades estrogênicas e antiestrogênicas, na dependência do tecido-alvo. O raloxifeno é um derivado do benzotiofeno, não esteróide, que pode ter efeito estrogênico em alguns tecidos, como no osso, preservando a densidade mineral óssea e diminuindo o risco de fratura vertebral, e também, ação antagonista dos estrogênios na mama e no útero¹⁸. Esta última propriedade protegeria as mamas e o endométrio de processos proliferativos^{10,11}.

O efeito proliferativo do estrogênio é parcialmente devido aos fatores de crescimento, como o fator insulinóide tipo I (IGF-I), epidérmico (EGF) e o vaso-endothelial (VEGF)¹⁹⁻²¹. Outros estudos mostraram que o raloxifeno não aumenta a expressão do IGF-I²² e EGF-I²³. Contudo, pode estimular a expressão de VEGF no útero de ratas²⁰. Este fato pode justificar as alterações dos vários parâmetros morfométricos por nós estudados (espessuras do epitélio superficial e da lâmina própria e o número de glândulas endometriais e de vasos sanguíneos presentes no miométrio) na maior dose de raloxifeno (0,75 mg/kg) ministrada neste estudo (Tabela 1). Alguns autores relatam que o raloxifeno apresenta efeito trófico no tecido epitelial (superficial e glandular). No entanto, relatam pouca ação no estroma uterino em ratas e camundongas^{24,25}.

Quando se ministraram concomitantemente os estrogênios e o raloxifeno em ratas castradas, não houve somatório dos efeitos obtidos, visto

que alguns dos parâmetros estudados (espessura do estroma endometrial e vasos sanguíneos) mostraram valores inferiores aos que dos grupos que receberam isoladamente estrogênios ou raloxifeno. Uma possível explicação seria o bloqueio da ação dos estrogênios conjugados eqüinos pelo raloxifeno, interferindo na função dos receptores endometriais. O raloxifeno atua sobre a expressão do RNA mensageiro dos receptores de estrogênio, alterando a distribuição do tipo alfa e beta no endométrio de ratas, proporcionando predomínio do beta. Alguns autores relacionam este efeito com ação antagonista do raloxifeno no endométrio²⁶.

Salienta-se ainda que o estrogênio aumentaria a concentração da enzima p38 MAPK nas células endometriais humanas (proteína quinase ativada por mitogênios) por mecanismos do sinal celular independentes da ativação genômica. Esta enzima é importante reguladora de múltiplas vias do metabolismo celular, sobretudo da proliferação celular. Em cultura de células, o raloxifeno também eleva esta enzima²⁷. Este fato gera questionamentos para as conseqüências a longo prazo da associação estro-raloxifeno.

Neste estudo preliminar notamos que o raloxifeno inibiu parcialmente a ação trófica do estrogênio no endométrio. Este efeito foi maior no estroma endometrial e no número de vasos sanguíneos. Apesar disto, a interação estrogênio-raloxifeno parece ser promissora e interessante. Contudo, há necessidade de estudos complementares e a longo prazo em animais antes de considerar esta combinação para mulheres como alternativa ao esquema terapêutico na pós-menopausa.

Referências

1. Clapauch R, Meirelles RMR, Julião MASG, Loureiro CKC, Giarodoli PB, Pinheiro SA, et al. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(6):679-95.
2. Kaari C, Haidar MA, Soares Júnior JM, Nunes MG, Quadros LG, Kemp C, et al. Randomized clinical trial comparing conjugated equine estrogens and isoflavones in postmenopausal women: a pilot study. *Maturitas.* 2006;53(1):49-58.
3. Baracat EC, Soares Júnior JM, Haidar MA, Rodrigues de Lima G. Aspectos reprodutivos no climatério. In: Fernandes CE, coordenador. Consenso brasileiro multidisciplinar de assistência à saúde da mulher climatérica. São Paulo: SOBRAC; Rio de Janeiro: FEBRASGO; 2003. p. 251-3.
4. Hale GE, Hughes CL, Cline JM. Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk", and isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(1):3-15.
5. Barakat RR, Bundy BN, Spirtos NM, Bell J, Mannel RS; Gynecologic Oncology Group Study. Randomized double-blind trial of estrogen replacement therapy versus placebo in stage I or II endometrial cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2006;24(4):587-92.
6. Azevedo GD. Terapia com raloxifeno na pós-menopausa: efeitos sobre o sistema hemostático. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2002;24(1):67.
7. Persson I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers-evidence and hypotheses form epidemiological findings. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74(5):357-64.
8. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Colditz GA, Hunter DJ, Spiegelman D, et al. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(17):1292-9.
9. Jordan VC, Gapstur S, Morrow M. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(19):1449-57.
10. Cohen FJ, Lu Y. Characterization of hot flashes reported by healthy postmenopausal women receiving raloxifene or placebo during osteoporosis prevention trials. *Maturitas.* 2000;34(1):65-73.
11. Fugere P, Scheele WH, Shah A, Strack TR, Glant MD, Jolly E. Uterine effects of raloxifene in comparison with continuous-combined hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(3):568-74.
12. Vogelvang TE, van der Mooren MJ, Mijatovic V, Kenemans P. Emerging selective estrogen receptor modulators: special focus on effects on coronary heart disease in postmenopausal women. *Drugs.* 2006;66(2):191-221.
13. Gielen SC, Burger CW, Kühne LC, Hanifi-Moghaddam P, Block LJ. Analysis of estrogen agonism and antagonism of tamoxifen, raloxifene, and ICI182780 in endometrial cancer cells: a putative role for the epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(7):e55-67.
14. Dardes RC, Schafer JM, Pearce ST, Osipo C, Chen B, Jordan VC. Regulation of estrogen target genes and growth by selective estrogen-receptor modulators in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2002;85(3):498-506.
15. Neven P, Quail D, Marin F, Creatsas G, Depypere H, Rechberger T, et al. Comparing raloxifene with continuous combined estrogen-progestin therapy in postmenopausal women: review of Euralex 1. *Maturitas.* 2005;52(2):87-101.

16. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*. 1997;350(9084):1047-59.
17. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1995;85(2):304-13.
18. Azevedo GD. Efeitos da terapia com raloxifeno na pós-menopausa sobre a espessura endometrial, volume uterino e perfusão nas artérias uterinas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2001;23(4):261.
19. Mukku VR, Stancel GM. Receptors for epidermal growth factor in the rat uterus. *Endocrinology*. 1985;117(1):149-54.
20. Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol*. 1987;1(7):445-50.
21. Norstedt G, Levinovitz A, Eriksson H. Regulation of uterine insulin-like growth factor-I mRNA and insulin-like growth factor-II mRNA by estrogen in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1989;120(4):466-72.
22. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 2002;295(5564):2465-8.
23. Zheng H, Kangas L, Harkonen PL. Comparative study of the short-term effects of a novel selective estrogen receptor modulator, ospemifene, and raloxifene and tamoxifen on rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;88(2):143-56.
24. Carthew P, Edwards RE, Nolan BM. Uterotrophic effects of tamoxifen, toremifene, and raloxifene do not predict endometrial cell proliferation in the ovariectomized CD1 mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;158(1):24-32.
25. Simões MJ, Simões RS, Soares Jr JM, Bonciani HN, Dietrich CP, Baracat EC. Histomorphological analysis and characterization of glycosaminoglycans of adult castrated rat uteri treated with estrogen, progesterone and raloxifene. *Climacteric*. 2002;5 Suppl 1:144.
26. Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:40.
27. Seval Y, Cakmak H, Kayisli UA, Arici A. Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar 7; [Epub ahead of print]