

Estudo piloto dos efeitos da terapia hormonal sobre o tecido mamário normal de mulheres após a menopausa

A pilot study of the effects of hormone therapy on normal breast tissue of postmenopausal women

Simone Elias¹, Rita de Cássia Maio Dardes², Cláudio Kemp³, Angela Flavia Logullo⁴, Thais Heinke⁵, Edmund Chada Baracat⁶, Geraldo Rodrigues de Lima⁶

Resumo

Objetivos: avaliou-se o tecido mamário de mulheres antes e depois de seis meses de terapia estroprogestativa combinada contínua (0,625 mg de estrogênios conjugados equínos associados a 2,5 mg de acetato de medroxiprogesterona). **Métodos:** todas as pacientes foram avaliadas antes de se instituir o tratamento e consideradas aptas para este. Foram obtidos fragmentos de tecido mamário por meio de biópsia percutânea com agulha grossa (acoplada a um propulsor automático – “core-biópsia”). O material foi fixado e os cortes corados por hematoxilina-eosina. Avaliou-se a densidade epitelial e o volume nuclear do epitélio mamário antes e após a terapia hormonal. Esses parâmetros morfométricos foram analisados graficamente com auxílio do programa *Imagelab 2000*®, após captura da imagem microscópica pelo sistema *Vidcap 32*. Esse programa permite que sejam selecionadas as áreas de interesse, possibilitando o cálculo de área, volume ou a relação da área ocupada entre diferentes estruturas. **Resultados:** depois do uso da terapia, o volume nuclear nas mulheres em que o tratamento foi instituído em período mais tardio após a menopausa mostrou um aumento de cerca de 33% (de 103,6 para 138,1 μm^3). A densidade epitelial não se modificou de forma significativa: o valor médio antes da terapia hormonal foi de 0,08 e após de 0,10. **Conclusões:** a terapia estroprogestativa combinada contínua empregada por seis meses induziu à alteração no volume nuclear das células epiteliais das mamas, sugerindo aumento de sua atividade metabólica. Provavelmente, esse evento precede outros que confirmariam o estímulo da proliferação celular por esses hormônios.

PALAVRAS-CHAVE: Mama/efeito de drogas; Menopausa; Terapia de reposição hormonal

Abstract

Purpose: to analyze breast tissue of postmenopausal women before and after six months of continuous combined estrogen-progestin replacement therapy (0.625 mg conjugated equine estrogens associated with 2.5 mg medroxyprogesterone acetate). **Methods:** all patients were evaluated before treatment and considered eligible to receive the drug. The material was obtained from the upper outer left quadrant, through a percutaneous large-core breast biopsy. Epithelial density and nuclear volume on hematoxylin-eosin-stained plates were evaluated for the morphological study. Morphometry was graphically analyzed by optical microscopy (400X) after acquisition of image by a digital image-capturing system (*Vidcap 32*) and image analysis system (*Imagelab 2000 Software*®). **Results:** after six months of estrogen-progestin replacement therapy, there was a significant increase in nuclear volume in late postmenopausal women (103.6 to 138.1 μm^3). There was no difference in epithelial density with the treatment (before 0.08 and later 0.10). **Conclusions:** estrogen-progestin combined replacement therapy for six months induced an enhancement in nuclear volume of breast epithelial cells, suggesting an increase in their metabolic activity. However, it is important to emphasize that this finding was observed only in late postmenopausal women. The increased nuclear volume could precede other events that confirm the stimulation of cellular proliferation by these hormones.

KEYWORDS: Breast/drug effects; Menopause; Hormone replacement therapy

Trabalho desenvolvido na Sessão de Diagnóstico da Disciplina de Mastologia do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

1 Médica Mastologista da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

2 Professora Visitante do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

3 Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

4 Professora Adjunta do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

5 Pós-graduanda do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

6 Professores Titulares do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP) – Brasil.

Correspondência: Simone Elias

Rua Botucatu, 527 – Vila Clementino – 04023-061 – São Paulo – SP – Telefone: (11) 5575-3451 – Fax: (11) 3083-6755 – e-mail: simoneelias3@yahoo.com.br

Recebido em: 15/3/2006

Aceito com modificações em: 23/11/2006

Introdução

O câncer de mama, neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres do mundo ocidental, é um modelo clássico de neoplasia hormônio-dependente. Existem evidências substanciais que associam este tipo de câncer à exposição prolongada aos hormônios femininos por menarca precoce e menopausa tardia. A terapia hormonal (TH) e a obesidade após a menopausa estão também associadas ao incremento da incidência desta neoplasia¹. Entre as influências hormonais, um papel relevante é atribuído ao estrogênio: o câncer de mama não se desenvolve na ausência de ovários; a ooforectomia causa regressão da doença e modelos animais experimentais mostram que o estrogênio induz ao câncer mamário².

Os tecidos mamários normal e neoplásico são estimulados por hormônios endócrinos e parácrinos³. Estudos epidemiológicos têm demonstrado a importância do papel desses hormônios, fatores de crescimento e citocinas na promoção, progressão e recorrência do câncer da mama. Durante as fases evolutivas da mama, são observadas variações no ambiente hormonal, alterações cíclicas do período menstrual e ainda mudanças na proporção dos diferentes tecidos que compõem a glândula mamária³.

Modificações morfológicas indicam maior atividade mitótica e metabólica durante a fase lútea, quando estrogênio e progesterona estão presentes⁴. Ainda marcadores de proliferação e apoptose variam durante o ciclo menstrual e o índice de proliferação no epitélio mamário é maior na fase lútea⁵.

Uma metanálise de 51 estudos envolvendo mulheres na pós-menopausa usando TH (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997) avaliou o risco de câncer de mama e revelou resultados discordantes: alguns trabalhos mostraram aumento; outros, decréscimo, ou ainda nenhuma alteração no risco para esse câncer (essa revisão totalizou 52.705 mulheres com câncer e 108.411 sem câncer, entre 50 e 70 anos de idade). Concluíram que a TH aumentava o risco de câncer de mama em cerca de 2% ao ano⁶. Estudos subseqüentes confirmaram que o risco de câncer de mama está elevado em mulheres sob TH e o risco relativo é maior entre aquelas que utilizam terapia combinada (estrogênio-progesterona) do que apenas com estrogênio⁷⁻⁹. Recentemente, um estudo clínico aleatorizado e prospectivo, o Women's Health Initiative, patrocinado pelo National Institute of Health dos Estados Unidos, veio confirmar resultados de ensaios anteriores, entre eles o aumento do risco relativo do câncer de mama, dependente do tempo de uso e emprego concomitante e contínuo do estrogênio associado ao progestagênio após cinco anos¹⁰. Neste

mesmo estudo, o grupo submetido à terapia estrogênica isolada foi acompanhado por oito anos e não demonstrou maior freqüência de câncer de mama¹¹. Convém ressaltar que essas conclusões, embora inquestionáveis, são restritas ao regime terapêutico empregado e às pacientes desta faixa etária¹².

Estrogênio e progesterona promovem a secreção de fatores de crescimento no epitélio mamário. Alguns estudos mostram a associação de fatores de crescimento insulina-símile (IGFs) com risco de câncer de mama, indicando um papel potencial do IGFs na carcinogênese mamária¹³. Em estudos prospectivos tem-se observado também uma associação positiva entre níveis séricos elevados de IGF-I e risco de câncer de mama em mulheres na menopausa, além do padrão de densidade mamográfica elevado (mamas densas)¹⁴. Todos esses fatores estão relacionados à ação estrogênica.

Permanece desconhecido, portanto, o mecanismo da carcinogênese mamária nas mulheres que utilizam terapia hormonal. Tal fato instigou esse estudo, sobre a ação da terapia estroprogestativa contínua sobre o tecido mamário normal (epitélio e estroma) das mulheres após a menopausa.

Métodos

O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Após serem esclarecidas sobre todas as etapas do estudo, concordarem com os procedimentos previstos (inclusive a realização de duas biópsias de fragmento) e assinarem o termo de consentimento pós-informado, as pacientes submeteram-se aos exames físico geral e ginecológico, além de exames subsidiários pertinentes.

Foram incluídas no estudo mulheres que desejavam fazer terapia hormonal (devido a sintomas vasomotores); as que apresentavam amenorréia de no mínimo um ano e no máximo cinco anos; níveis séricos de hormônio folículo-estimulante superiores a 30 UI/mL; negavam uso de qualquer medicamento hormonal (inclusive fitohormônios) para tratamento de síndrome do climatério nos últimos 12 meses; apresentavam ultra-sonografia transvaginal normal e mamografia classificada como categoria 1 ou 2 pelo sistema BI-RADS[®] (Breast Imaging Reporting and Data System – American College of Radiology).

As 48 pacientes inicialmente incluídas tinham média de idade de 52,5 anos (variando entre 48 e 56 anos). A idade média da menopausa foi de 49,1 anos. Não havia diferenças significativas quanto aos antecedentes pessoais e familiares ou história reprodutiva na população estudada.

As pacientes foram orientadas a ingerir diariamente e sem interrupção um comprimido contendo 0,625 mg de estrogênios conjugados eqüinos associados a 2,5 mg de acetato de medroxiprogesterona (Premelle®) pelo período de seis meses.

Foram coletadas amostras de tecido mamário no início e ao final da terapia. O material foi obtido por meio de biópsia percutânea com agulha grossa com propulsor automático e cinco a oito fragmentos foram obtidos utilizando-se agulha de calibre 14 e cursor de 2,2 cm. Após a coleta, o material foi fixado em formol a 10% por no máximo 24 horas e, em seguida, foi embebido em parafina. Procedeu-se ao preparo de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina, que foram utilizadas primeiramente para verificar a presença de epitélio mamário e detectar eventuais alterações. A seguir, dois observadores avaliaram a morfometria do tecido mamário antes e após a terapia hormonal, por meio da densidade epitelial e determinação do volume nuclear.

A observação da densidade epitelial foi realizada em microscópio óptico com ocular de 40X e, para a medida do volume nuclear, usou-se uma ocular de 80X. Os observadores estabeleceram a relação entre a área ocupada pelo componente epitelial e a área total com o auxílio de um sistema de captura de imagem. Também a média dos volumes nucleares foi determinada com o auxílio do mesmo sistema.

Tabela 1 - Densidade epitelial média e volume nuclear médio obtidos antes e depois da terapia hormonal nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina.

Caso	Densidade epitelial média		Volume nuclear médio (*)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
1	0,12	0,21	113,9	106,9
2	0,05	0,05	97,9	113,3
3	0,28	0,35	94,9	124,5
4	0,01	0,18	99,9	103,3
5	0,03	0,05	82,5	187,3
6	0,04	0,04	110,1	117,3
7	0,11	0,09	146,3	174,7
8	0,01	0,01	111,1	168,3
9	0,00	0,06	73,3	106,5
10	0,08	0,02	140,9	92,9
11	0,18	0,12	114,7	113,5
12	0,11	0,14	88,8	124,9
13	0,04	0,04	106,2	86,9
14	0,02	0,01	109,5	117,2
15	0,14	0,09	131,0	162,7
Média	0,08	0,10	108,1	126,7

Teste de Wilcoxon: $p = 0,363$ (não significativo) para densidade epitelial; * $p = 0,041$ (significativo) para volume nuclear.

Esse programa, denominado Imagelab 2000®, permite que sejam selecionadas as áreas de interesse em um campo previamente determinado e, a seguir, fornece a área ocupada pelo elemento escolhido, possibilitando o cálculo de área, volume ou a relação da área ocupada entre diferentes estruturas (Figura 1).

No decorrer do estudo foram excluídas as pacientes que apresentaram apenas tecido gorduroso na primeira biópsia (seis casos) ou na segunda biópsia (nove casos), efeitos colaterais importantes e possivelmente relacionados ao tratamento (como sangramento vaginal, dor em membros inferiores, cefaléia e distúrbio visual - oito casos) ou interrupção ou abandono (10 casos), restando 15 casos.

A comparação entre as variáveis quantitativas medidas “antes” e “depois” foi realizada a partir do teste não-paramétrico de Wilcoxon¹⁵. Adotou-se o nível de significância de 5% para a conclusão de todos os testes realizados.

Resultados

As Tabelas 1 e 2 mostram os valores médios da densidade epitelial e do volume nuclear nas 15 pacientes antes e depois da terapia estroprogestativa por seis meses.

A densidade epitelial não mostrou diferença significativa (Tabela 1): o valor médio antes da terapia hormonal foi de 0,08 e após, de 0,10. No entanto, observou-se diferença significativa para o volume nuclear, que foi maior após a TH. A média do volume nuclear antes da TH foi 108,1 μm^3 ($\pm 20,2$) e depois foi de 126,7 μm^3 ($\pm 31,2$) (Tabela 1). Nota-se que após seis meses de terapia estroprogestativa, as pacientes mostraram um aumento médio de 17,2% no volume nuclear. Essa diferença pode ser

Tabela 2 - Volume nuclear médio obtidos antes e depois da terapia hormonal nas pacientes, segundo o tempo de menopausa (maior ou menor que 36 meses).

Caso	Volume nuclear (μm^3)				
	Maior que 36 meses*		Caso	Menor que 36 meses*	
	Antes	Depois		Antes	Depois
1	113,9	106,9	3	94,4	124,5
2	97,9	113,3	6	110,1	117,3
4	99,9	103,3	7	146,3	174,7
5	82,5	187,3	9	73,3	106,5
8	111,1	168,3	10	140,9	92,9
12	88,8	124,9	11	114,7	113,5
15	131,0	162,7	13	106,2	86,9
			14	109,5	117,2
Média	103,6	138,1		112,0	116,7

Teste de Wilcoxon: * $p = 0,043$ (significativo) para pacientes com mais de 36 meses de menopausa; $p = 0,484$ (não significativo) para pacientes com menos de 36 meses de menopausa.

também observada graficamente (Figura 2). Essa diferença também foi analisada de acordo com o tempo de menopausa: pacientes com mais e menos de 36 meses de menopausa (Tabela 2) mostraram média de volume nuclear antes da TH, respectivamente, de $103,6 \mu\text{m}^3 (\pm 16,5)$ e $112,0 \mu\text{m}^3 (\pm 25,3)$, o que foi muito semelhante. Após seis meses de TH, apenas as pacientes com mais de 36 meses de menopausa mostraram um aumento significativo no volume nuclear de cerca de 33% ($138,1 \mu\text{m}^3$). Observa-se que o aumento no volume nuclear dependeu do momento da introdução da TH. Esse comportamento também pode ser analisado no gráfico de dispersão (Figura 3).

Assim, neste trabalho, a terapia estroprogestativa não modificou a densidade epitelial e aumentou o volume nuclear, no grupo no qual a TH foi introduzida mais tardiamente em relação à menopausa.

Discussão

Refere-se que um denominador comum na patogênese de muitos cânceres é o incremento da divisão celular induzida por estimulação exógena ou endógena. Esse aumento da proliferação celular poderia implicar maior atividade mitótica, além da reposição celular necessária ou a divisão de um subclone de células que habitualmente não se dividiria¹⁶.

Sabe-se que o DNA celular é objeto de danos freqüentes devido a inúmeros fatores, os quais são constantemente reparados. Um agente que acione a atividade metabólica conseqüentemente aumenta a probabilidade de converter um DNA danificado em mutação¹⁷.

Embora sejam pouco conhecidos os mecanismos exatos de danos ao DNA causados pelos estrogênios e seus metabólitos, existem evidências dessa associação¹⁸. Consideram-se três mecanismos responsáveis pelo estímulo carcinogênico dos estrogênios na mama humana: a) atividade hormonal mediada pelo receptor, a qual estimularia a proliferação celular, resultando em maior número de oportunidades para acumular danos genéticos; b) uma ativação metabólica, ação mediada pelo citocromo P450, a qual levaria a efeitos genotóxicos diretos pelo aumento da taxa de mutação; c) indução direta da aneuploidia pelo estrogênio.

Esse aparente potencial carcinogênico do estrogênio é mais freqüentemente atribuído ao estímulo da proliferação celular mediada pelo receptor. Na mama, vários mecanismos são mediados por receptores esteroídicos: fatores de crescimento

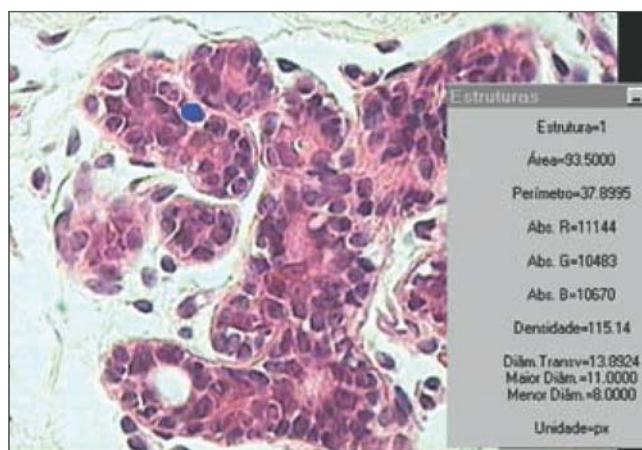


Figura 1 - Fotografia de corte histológico de tecido mamário normal após captura por sistema digital (sistema VIDCAP 32). Em azul, um núcleo de célula epitelial selecionado com auxílio do programa de análise de imagens – Imagelab®. No canto direito da tela, as medidas fornecidas pelo programa em unidade pixel (hematoxilina-eosina – 400X).

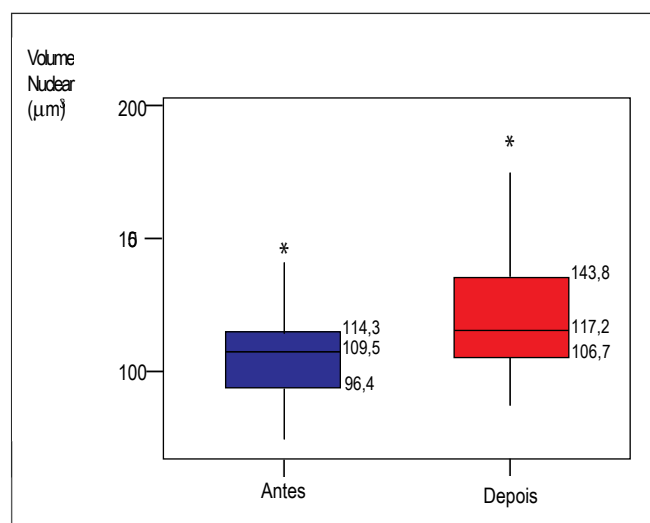


Figura 2 - Gráfico tipo box plot mostrando mediana e quartis do volume nuclear médio dos grupos de pacientes antes e depois da terapia hormonal.

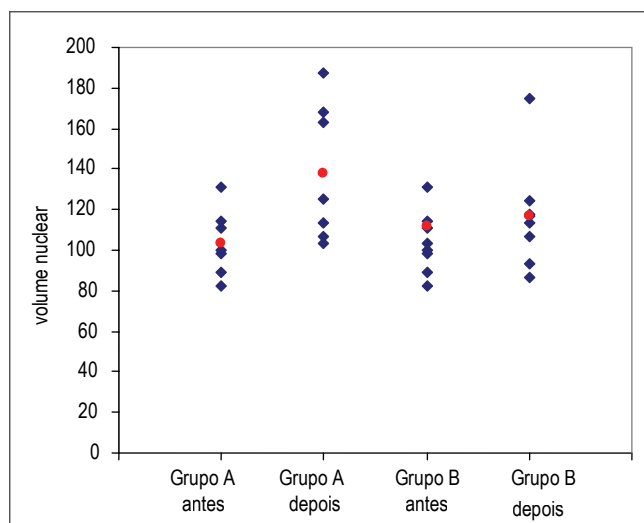


Figura 3 - Gráfico de dispersão do volume nuclear médio das pacientes antes e depois da terapia hormonal de acordo com o tempo de menopausa – grupo A (maior que 36 meses) e grupo B (menor que 36 meses).

(como TGF-beta e TGF-alfa), enzimas (catepsina D), proto-oncogenes (c-fos, c-myc e HER-2/neu), ciclinas e outras substâncias reguladoras de divisão e diferenciação celular¹⁹.

A progesterona associada ao estrogênio pode ser a chave da influência do risco de câncer de mama, já que o pico da atividade mitótica na mama ocorre durante a fase lútea do ciclo menstrual. Dados recentes mostram que a estrogenerioterapia isolada não aumenta o risco para o câncer da mama em mulheres após a menopausa, enquanto que a terapia combinada estroprogestativa aumenta o risco em 26% comparado ao placebo⁷⁻⁹.

Além disto, outros estudos têm demonstrado que a densidade mamográfica está associada ao aumento do risco para câncer de mama e que pode ser influenciada pelo uso do estrogênio e/ou da progesterona. Embora seja uma avaliação indireta, isso mostra o efeito proliferativo da TH *in vivo*. A densidade mamográfica também aumenta de acordo com o tempo de uso e do esquema terapêutico utilizado: é maior em usuárias de terapia estroprogestativa cíclica, seguida do esquema contínuo, e, finalmente, estrogenerioterapia isolada¹⁴. Esses resultados foram endossados por vários outros estudos.

O efeito da TH sobre o epitélio mamário é pouco conhecido, principalmente pelas dificuldades de estudar a glândula mamária normal. A proposta de avaliar o volume nuclear no lóbulo da mulher após a menopausa antes e após a TH é observar os efeitos do estrogênio e da progesterona na glândula normal. Observa-se que esses hormônios aumentaram o volume nuclear na população estudada. Resultados semelhantes foram observados em amostras de epitélio mamário obtidas por citologia aspirativa de mamas de mulheres submetidas a TH (o que não foi observado naquelas que não fizeram o tratamento – grupo controle)²⁰. O aumento do volume nuclear reflete um aumento da síntese protéica, ou seja, uma importante atividade metabólica.

A variação do volume nuclear em células do epitélio mamário em resposta a tratamento hormonal também foi observada em outros estudos^{21,22} com tamoxifeno, um antagonista estrogênico. Este reduziu o volume nuclear e também a proliferação celular (mensurada por meio do marcador Ki-67) no epitélio mamário humano e em células de câncer de mama²³.

Na literatura, poucos autores avaliaram a densidade epitelial. Seus resultados demonstraram que os estrogênios aumentaram a taxa de proliferação celular, o número de células presentes na unidade ducto-lobular terminal e ainda a porcentagem de tecido glandular sobre o tecido adiposo e estromal (densidade epitelial). Notaram, também, que a adição de progestagênio ao estrogênio incrementou ainda mais essa resposta^{24,25}.

Nesse estudo, a avaliação da densidade epitelial não mostrou haver modificação significativa após a TH. Esse achado foi atribuído ao pequeno intervalo de TH (seis meses). De fato, a densidade mamográfica aumenta apenas ao final do primeiro ano de tratamento¹⁴.

Em nossa casuística, após a terapia estroprogestativa, observou-se aumento significativo dos valores do volume nuclear. O estímulo da atividade metabólica, demonstrado em nosso estudo por meio do aumento do volume nuclear, constitui indício celular da ação direta do estrogênio e do progestagênio sobre o epitélio mamário humano. Esse achado foi melhor observado na resposta da glândula mamária em função do momento da introdução da hormonioterapia. Ao avaliarmos dois subgrupos, divididos de acordo com o tempo de menopausa (maior ou menor que 36 meses), observamos que foi o grupo de maior período de menopausa que apresentou aumento significativo do volume nuclear, evidenciando ser esse epitélio mais responsivo ao estímulo hormonal. Essa relação entre o momento da introdução da hormonioterapia e diferentes respostas na atividade proliferativa também foi observada em estudo em modelo animal. A terapia introduzida mais tardiamente promoveu uma resposta morfológica similar à da glândula mamária no período puberal, fase na qual, em roedores, a susceptibilidade à carcinogênese induzida é maior^{25,26}.

Assim, existem indícios de que o momento da introdução da terapia hormonal é um fator a ser considerado, e isto é de veras importante sobre o ponto de vista terapêutico.

Referências

1. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993; 15(1):17-35.
2. Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998; 3(1):49-61.
3. Reid SE, Murthy MS, Kaufman M, Scanlon EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br J Surg.* 1996; 83(8):1037-46.
4. Nazario AC, Simoes MJ, de Lima GR. Morphological and ultrastructural aspects of the cyclical changes of human mammary gland during the menstrual cycle. *Sao Paulo Med J.* 1994; 112(2):543-7.
5. Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, et al. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices

- of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(3):R306-13.
6. 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.
 7. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA.* 2000; 283(4):485-91.
 8. Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen vs. estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(4):328-32.
 9. Ismail PM, Amato P, Soyol SM, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW, Lydon JP. Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis - as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids.* 2003; 68(10-13):779-87.
 10. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002; 288(3):321-33.
 11. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 291(14):1701-12.
 12. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(6):545-60.
 13. Hankinson SE, Schernhammer ES. Insulin-like growth factor and breast cancer risk: evidence from observational studies. *Breast Dis.* 2003; 17: 27-40.
 14. Greendale GA, Reboussin BA, Slone S, Wasilauskas C, Pike MC, Ursin G. Postmenopausal hormone therapy and change in mammographic density. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(1):30-7.
 15. Conover WJ. Practical nonparametric statistics. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1980.
 16. Drinkwater NR, Sugden B. Mecanismos de carcinogênese. In: Hossfeld DR, Sherman CD, Love RR, Bosch SX, editores. Manual de oncologia clínica. 2a ed. Berlin: Springer Verlag; 1993. p. 7-20.
 17. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 1990; 50(23):7415-21.
 18. Russo J, Russo IH. Genotoxicity of steroidal estrogens. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15(5):211-4.
 19. Barry JB, Giguere V. Epidermal growth factor-induced signaling in breast cancer cells results in selective target gene activation by orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Cancer Res.* 2005; 65(14):6120-9.
 20. Carter N, Stephenson TJ, Silcocks PB, Shorthouse AJ. Effects of hormone replacement therapy on fine needle aspiration cytology of the breast. *Acta Cytol.* 1995; 39(4):689-92.
 21. Uehara J, Nazario AC, Rodrigues de Lima G, Simoes MJ, Juliano Y, Gebrim LH. Effects of tamoxifen on the breast in the luteal phase of the menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet.* 1998; 62(1):77-82.
 22. de Lima GR, Facina G, Shida JY, Chein MB, Tanaka P, Dardes RC, et al. Effects of low dose tamoxifen on the normal breast tissue of premenopausal women. *Eur J Cancer.* 2003;39(7):891-8.
 23. Dardes RC, Horiguchi J, Jordan VC. A pilot study of the effects of short-term tamoxifen therapy on Ki-67 labelling index in women with primary breast cancer. *Int J Oncol.* 2000; 16(1):25-30.
 24. 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.
 25. Raafat AM, Hofseth LJ, Haslam SZ. Proliferative effects of combination estrogen and progesterone replacement therapy on the normal postmenopausal mammary gland in a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184(3):340-9.
 26. Haslam SZ, Osuch JR, Raafat AM, Hofseth LJ. Postmenopausal hormone replacement therapy: effects on normal mammary gland in humans and in a mouse postmenopausal model. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7(1):93-105.