

LUCIANA DE OLIVEIRA MARQUES<sup>1</sup>  
DAVID GOMES CORDEIRO JÚNIOR<sup>2</sup>  
VANESSA VIEIRA DAL LAGO<sup>2</sup>  
SHERON LUIZE COSTA DE CARVALHO<sup>2</sup>  
LUIZ MARTINS COLLAÇO<sup>3</sup>  
ANA CRISTINA LIRA SOBRAL<sup>4</sup>

# Efeito da trimegestona sobre o tecido mamário de ratas castradas

*Effect of trimegestone on mammary gland of castrated rats*

## Artigo original

### Palavras-chave

Mama  
Proliferação de células  
Estrogênios  
Progestinas  
Ratos

### Keywords

Breast  
Cells proliferation  
Estrogens  
Progestins  
Rats

### Resumo

**OBJETIVO:** Avaliar o efeito da trimegestona sobre a proliferação celular do tecido mamário de ratas castradas. **MÉTODOS:** Foram utilizadas 45 ratas adultas e virgens, da linhagem Wistar, submetidas à castração. Após o 60º dia da castração, confirmado o hipostrogenismo, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, conforme o tratamento proposto: controle (n=15) recebeu soro fisiológico 0,9%; estrogênio (n=15) recebeu 17 beta-estradiol; e combinado (n=15) recebeu 17 beta-estradiol associado à trimegestona, todos por 60 dias consecutivos. Após o término do tratamento, procedeu-se a exérese das mamas inguinais, destinadas a análise morfológica pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) e imuno-histoquímica pela quantificação do anticorpo anti-PCNA no tecido mamário, seguido de eutanásia. Os parâmetros morfológicos avaliados foram: proliferação celular epitelial, atividade secretora e alteração do estroma mamário. Ocorreram nove óbitos durante o experimento. As variáveis foram submetidas à análise estatística adotando-se como significante  $p < 0,05$ . **RESULTADOS:** Foram observadas alterações histológicas em 16/36 ratas, hiperplasia epitelial leve em 13/36, hiperplasia epitelial moderada em 3/36, não sendo encontrada hiperplasia epitelial severa. Encontrou-se fibrose no estroma em 10/36 e atividade secretora em 5/36 das ratas. Todas as variáveis do estudo morfológico foram significantes comparando-se os grupos controle e estrogênio ( $p=0,03$ ), e nenhuma foi significativa na comparação dos grupos controle e combinado ( $p=0,4$ ). A análise imuno-histoquímica não mostrou diferença entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Os hormônios usados em ratas castradas aumentaram a proliferação de células mamárias, tanto o 17 beta-estradiol isolado quanto associado à trimegestona, porém este efeito parece ser menor quando se emprega a associação, o mesmo ocorrendo em relação à fibrose do estroma mamário.

### Abstract

**PURPOSE:** To evaluate the effect of trimegestone on the histological changes of the mammary tissue of castrated rats. **METHODS:** Forty-five virgin female Wistar rats were used after oophorectomy. Sixty days after surgery, with hypoestrogenisms confirmed, the experimental rats were randomly assigned to three groups of 15 animals each, when then the specific treatment for each group was started. The control group (C) and experimental groups 1 and 2 respectively received 0.9% saline solution, 17-beta-estradiol and 17-beta-estradiol in combination with trimegestone for 60 consecutive days. After the end of treatment, the inguinal mammary glands were removed, stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphometry and examined by immunohistochemistry for the quantification of anti-PCNA antibody in the mammary tissue, followed by euthanasia. The morphometric parameters evaluated were: epithelium cell-proliferation, secretor activity and mammary stroma changes. There were nine deaths during the experiment. The variables were submitted to statistical analysis adopting the 0.05 level of significance. **RESULTS:** Histological changes were observed in 16/36 rats, mild epithelial hyperplasia in 13/36, moderate epithelial hyperplasia in 3/36, with no cases of severe epithelial hyperplasia. Stromal fibrosis was found in 10/36 and secretory activity in 5/36 rats. All morphometric variables were significant in the estrogen group compared to control ( $p=0.0361$ ), although there were no difference between the group receiving combined treatment and the controls ( $p=0.405$ ). The immunohistochemical analysis showed no difference between groups. **CONCLUSIONS:** The hormones administered to castrated rats, i.e., 17 beta-estradiol alone or in combination with trimegestone, increased the proliferation of breast cells, but this effect appeared to be lower in the combined treatment, the same occurring regarding fibrosis of the mammary stroma.

### Correspondência:

Luciana de Oliveira Marques  
Rua Padre Anchieta, 2.770 – Bairro Bigorilho  
CEP: 80730-000 – Curitiba (PR), Brasil

### Recebido

16/03/2011

### Aceito com modificações

25/04/2011

Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR – Curitiba (PR), Brasil.

<sup>1</sup>Professora Assistente da Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR – Curitiba (PR), Brasil.

<sup>2</sup>Acadêmicos do 6º ano do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR – Curitiba (PR), Brasil.

<sup>3</sup>Professor Titular da Disciplina de Patologia da Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR – Curitiba (PR), Brasil.

<sup>4</sup>Professora Assistente da Disciplina de Patologia da Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR – Curitiba (PR), Brasil.

## Introdução

A menopausa é um tema relevante na área clínica, epidemiológica e de saúde pública, pois com o aumento da expectativa de vida prevê-se que as mulheres possam viver um terço de suas vidas após a menopausa<sup>1</sup>. Menopausa é o cessar permanente da menstruação, conseqüente da perda da função folicular ovariana ou da retirada cirúrgica dos ovários<sup>2</sup>. O hipostrogenismo, característico desta fase, ocasiona alterações fisiológicas e clínicas<sup>1,3</sup> tais como: sintomas vasomotores, atrofia urogenital, aumento do risco de doenças crônicas degenerativas<sup>1,3-5</sup>. A terapia de reposição hormonal (TH) é uma alternativa para se diminuir estes sintomas<sup>3,4</sup>, promovendo melhor qualidade de vida<sup>6</sup>. Em mulheres com útero intacto, no esquema de TH, deve-se associar estrogênio e progestágeno, este para equilibrar o efeito proliferativo do estrogênio no endométrio<sup>7</sup>. A TH pode apresentar alguns aspectos indesejáveis como aumento do risco de neoplasias dependentes de hormônio, como a do endométrio<sup>3,8</sup> e da mama<sup>3,4,6,8,9</sup>, além do aumento do risco de tromboembolismo<sup>3,6,8</sup>.

Os primeiros relatos sobre o aumento do risco de câncer de mama, em usuária de estrogênio, supunham que o aumento ocorria apenas pelo uso do estrogênio e que a progesterona teria efeito protetor para esta neoplasia<sup>10</sup>. Estudos posteriores relataram que a TH aumentaria o risco de câncer de mama, sendo este maior quando utilizado estrogênio associado à progesterona em comparação ao estrogênio isolado<sup>11,12</sup>.

Sabe-se que o epitélio mamário normal apresenta receptores para estrogênio e progesterona, e o risco de câncer de mama seria proporcional ao número de ciclos ovulatórios<sup>9,13,14</sup>. Dentre os possíveis mecanismos da carcinogênese mamária relacionada à TH, estariam a existência de pequenos cânceres preexistentes que cresceriam mais rápido com a estimulação hormonal, e também a tumores *de novo* causados por aumento das mutações<sup>15</sup>.

No desenvolvimento mamário normal, os ductos são estimulados por estrogênios e os lóbulos, por progesterona, mediados por receptores nucleares. Na pós-menopausa, o número de células lobulares com receptor estrogênio positivo aumenta cerca de 50%, e observa-se uma maior proporção de carcinoma lobular nestas pacientes, principalmente com TH combinada<sup>15</sup>.

Entre as novas drogas para TH da menopausa, tem-se empregado a trimegestona (TMG), uma progesterona potente e seletiva, derivada do 19-norpregnano, com alta afinidade relativa pelo receptor de progesterona e alta seletividade para o endométrio. Sabe-se que não tem afinidade por receptores androgênicos, glicocorticóides e mineralocorticóides. Um esquema de TH contendo estrogênio com TMG deveria evitar a hiperplasia endometrial e provocar mínimo efeito antagonista sobre os efeitos benéficos do

estrogênio<sup>7,16</sup>. As informações disponíveis sobre o comportamento do tecido mamário frente à progesterona, referem-se àquelas de antigas gerações e sintéticas, não havendo muitos dados sobre as de nova geração como a TMG, além de não estar claro se a carcinogênese mamária varia conforme a classe da progesterona<sup>12</sup>.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da trimegestona sobre a proliferação celular do tecido mamário em ratas castradas.

## Métodos

O projeto de pesquisa adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais de experimentação da Faculdade Evangélica do Paraná (FEPAR) sob o nº 4.690/08.

Foram utilizadas 45 ratas virgens (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), convencionais, da linhagem Wistar, com idade variando de 90 a 120 dias, oriundas do biotério da própria instituição. Todos os animais receberam os cuidados preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

Na primeira fase do estudo, os animais foram submetidos à pesagem (peso inicial) e anestesiados até plano cirúrgico com a associação quetamina/xilazina, por via intraperitoneal, nas dosagens de 10 mg e 1mg para cada 100g de peso, respectivamente, para retirada cirúrgica e bilateral dos ovários. Após a recuperação anestésica, os animais foram mantidos no biotério da instituição, em número de cinco por gaiola identificada, recebendo água e ração padrão para a espécie (Nuvilab<sup>®</sup>) à vontade.

Na segunda fase do estudo, que corresponde ao 60º dia pós-operatório, os animais foram submetidos à nova pesagem (peso intermediário) e coleta de secreção vaginal para análise citológica pela coloração de Papanicolau, como método indireto de confirmação do hipostrogenismo, ou seja, atrofia.

Ainda nesta fase do estudo, a amostra foi separada de forma aleatória, em 3 grupos de 15 animais, que receberam diariamente a medicação designada para cada grupo por 60 dias ininterruptos. As dosagens das medicações foram determinadas segundo cálculo halométrico, que converte a dose utilizada em humano para a dose correspondente na espécie animal utilizada, sendo que: o grupo controle recebeu 1 ml de soro fisiológico 0,9% (SF); o grupo estrogênio recebeu 6,5 µg de 17 beta-estradiol diluído em 1mL de SF e o grupo combinado recebeu 6,5 µg de 17 beta-estradiol associado a 1,625 µg de trimegestona, diluídos em 1 ml de SF.

Na terceira fase do estudo, após o término da medicação, os animais foram submetidos à pesagem (peso final) e anestesiados como na primeira fase do estudo, tendo então retiradas as quatro mamas inguiniais, que foram

fixadas em formalina tamponada e destinadas à confecção de lâminas de histologia para as análises morfológica e imuno-histoquímica do tecido mamário. Nesta ocasião, foi coletada novamente secreção vaginal para a segunda análise citológica do trofismo vaginal, semelhante à primeira. A seguir, procedeu-se a eutanásia dos animais mediante *overdose* anestésica, com mesmos anestésicos e vias antes utilizados.

Os pesos inicial, intermediário e final serviram para avaliação ponderal no decorrer do estudo. Durante o estudo ocorreram nove óbitos por acidente anestésico, sendo cinco no grupo controle durante a castração, dois no grupo estrogênio e dois no combinado, ambos na primeira coleta de secreção vaginal, todos excluídos da análise estatística.

A análise morfológica dos ductos e alvéolos mamários corados pela técnica hematoxilina-eosina (HE) foi realizada em quatro campos por corte histológico, sob um aumento de 400 vezes, e pelo mesmo patologista. A análise foi baseada em um “sistema de graduação histopatológico para anomalias epiteliais, induzidas por 7,12- dimetil-benzantraceno (DMBA), em tecido mamário de fêmeas de ratos”<sup>17</sup>. Tal graduação refere-se à hiperplasia epitelial e à atividade secretora nas células epiteliais, seguindo a seguinte classificação: normal, atipia sem proliferação epitelial, hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular leve (HEB1), hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular moderada (HEB2), hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular severa (HEB3), hiperplasia alvéolo-nodular (HAN), atividade secretora nas células epiteliais e análise do estroma mamário<sup>17</sup>. Esta descrição, apesar de ser graduada por um modelo baseado em anomalias de tecido mamário de ratas induzidas por DMBA<sup>17</sup>, tem sido adotada em outros estudos que utilizam rato como modelo experimental<sup>4,18</sup>. Fez-se uma analogia entre as alterações descritas na graduação adotada com as observadas na mama humana, HEB1 corresponderia à hiperplasia ductal típica (HDT) leve; HEB2 à HDT moderada; e HEB3 à hiperplasia ductal atípica (HDA). A HDT leve é considerada sem risco para câncer invasor, HDT moderada é considerada de risco leve (duas vezes) para o câncer invasor e HDA é considerada lesão associada a risco cinco vezes aumentado para o câncer invasor da mama<sup>4</sup>. Na imuno-histoquímica para avaliação da proliferação celular mamária, utilizou-se o anticorpo primário anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) clone PC10 m0879 (Dako®) na diluição 1/800. A proliferação celular foi quantificada através da contagem de núcleos de células ductais e alveolares, marcadas pelo anticorpo anti-PCNA, onde foram considerados positivos somente os núcleos em coloração castanho escuro, realizando-se a contagem de 100 núcleos por campo no corte histológico, no aumento de 400X.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizado-se o *software* GraphPad e adotando-se como significante  $p < 0,05$ . Empregou-se o teste exato de Fisher para análise morfológica, a análise de variância ANOVA para avaliação ponderal, e os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para imuno-histoquímica.

## Resultados

O peso inicial médio dos animais foi de 255,8 g ( $p > 0,05$ ) entre os grupos, o que demonstra a homogeneidade da amostra. O mesmo ocorrendo em relação ao peso intermediário (média de 302,5 g) e final (média de 324,9 g). O peso médio de cada fase do estudo, para cada grupo, está demonstrado na Tabela 1.

Observou-se progressivo aumento de peso nos três grupos, durante as fases do estudo ( $p < 0,05$ ), estes de 3 e 11,7% no grupo controle, 18,1 e 5,2% no grupo estrogênio, e 24 e 5,2% no grupo conjugado, sendo primeira, segunda e terceira fases, respectivamente.

Na primeira análise de citologia vaginal, observou-se que todas as ratas apresentavam padrão atrófico, confirmando o hipoestrogenismo decorrente da castração. Na segunda análise realizada antes da eutanásia, todas as ratas do grupo controle permaneciam atróficas; três do grupo estrogênio (3/13) e seis do grupo combinado (6/13) estavam atróficas. Ainda, uma do grupo estrogênio (1/13) e duas do grupo combinado (2/13) foram classificadas como hipotróficas, ou seja, apresentavam tanto células superficiais quanto células profundas. Isto demonstra que a associação de 6,5 µg de 17 beta-estradiol a 1,625 µg de trimegestona causa mais trofismo vaginal do que o uso isolado de 6,5 µg de 17 beta-estradiol.

### ■ Análise morfológica

Observou-se alterações epiteliais mamárias em 16/36 da amostra, sendo HEB1 em 13/36 e HEB2 em 3/36. Não foi encontrado HEB3 nem HAN. Nas ratas que tiveram alterações epiteliais mamárias, foi observada atividade secretora em 5/13, não sendo encontrada esta alteração em ratas classificadas com epitélio mamário normal. Analisando as alterações histológicas de acordo com o esquema terapêutico usado, o grupo estrogênio demonstrou mais alterações, ocorrendo HEB1 em 6/13 e HEB2 em 3/13, existindo microcalcificação intraductal em um

**Tabela 1.** Médias da avaliação ponderal (em gramas) dos animais em cada grupo e em cada momento do estudo

Grupo	Peso		
	Inicial	Intermediário	Final
Controle	265,4	300,0	335,3
Estrogênio	253,8	299,8	315,5
Conjugado	248,2	307,8	323,9

animal. No grupo combinado, encontrou-se HEB1 em 5/13, e no grupo controle, foi observada atividade secretora em 1/10 e HEB1 em 2/10 ratas (Figura 1).

O estudo morfométrico do tecido mamário mostrou diferença significativa ( $p=0,03$ ) entre os grupos controle e estrogênio, sendo que o 17 beta-estradiol causou mais HEB1 e HEB2. Não se observou diferença quando se comparou os grupos controle e combinado ( $p=0,4$ ), ou seja, a associação de 17 beta-estradiol e trimegestona não promoveu alterações significativas no tecido mamário em comparação aos achados do grupo controle.

Comparando-se os grupos estrogênio e combinado, não foi encontrada diferença estatística ( $p=0,2$ ), possivelmente pelo pequeno número da amostra, porém foi

observado ocorrência mais frequente do padrão proliferativo nas ratas que receberam o 17 beta-estradiol isolado em comparação às que receberam 17 beta-estradiol associado à trimegestona (Tabela 2).

Em relação às influências sobre o estroma, ocorreu fibrose em 7/13 do grupo estrogênio e 3/13 do grupo combinado, esta alteração não foi identificada no grupo controle, impossibilitando sua análise comparativa com os outros grupos. Na comparação entre os grupos estrogênio e combinado observou-se maior alteração do estroma no grupo estrogênio, porém esta não foi significativa ( $p=0,2$ ), talvez também pela pequena amostra.

#### ■ Análise imuno-histoquímica

Na avaliação da proliferação celular, não se verificou diferenças na porcentagem de células PCNA positivas entre os grupos (controle *versus* estrogênio  $p=0,8$ ; controle *versus* combinado  $p=0,7$ ; estrogênio *versus* combinado  $p=0,3$ ).

## Discussão

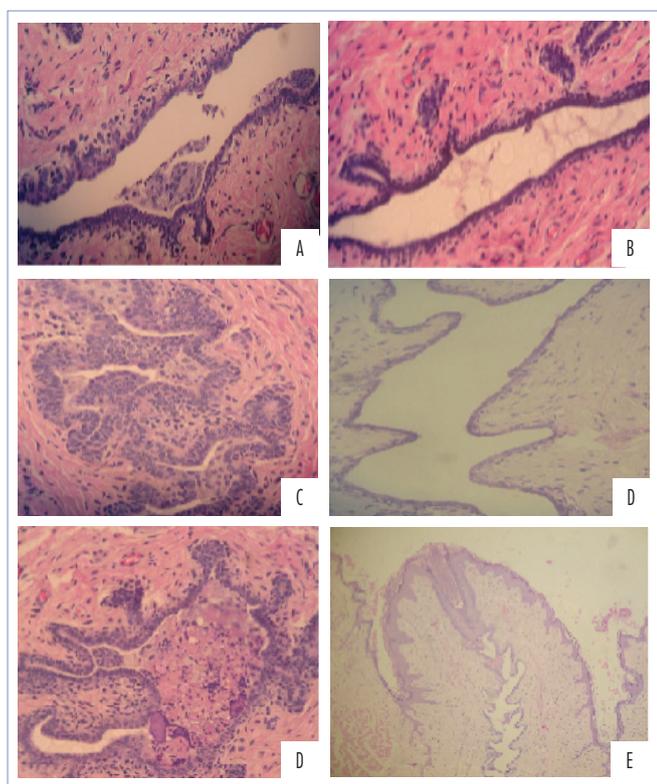
Modelos animais são uma ferramenta importante para elucidação de mecanismos de ação da terapia hormonal<sup>19</sup>. Com o modelo de estudo em ratas, é possível fazer uma analogia entre as alterações descritas nas mamas destas com as observadas na mama humana, embora se saiba que existam diferenças entre as espécies<sup>4</sup>. Uma diferença importante é que os ratos mantêm a capacidade reprodutiva ao longo da vida, portanto não há menopausa natural<sup>20</sup>, mas o hipoestrogenismo pode ser induzido por castração<sup>20</sup>.

Os medicamentos ditos progestagênios de nova geração, dentre estes a trimegestona, um dos mais potentes, foram desenvolvidos para se ligar muito especificamente ao receptor de progesterona e não a outros receptores, como receptores de androgênios, mineralocorticóides e glicocorticóides, justamente para se evitar ao máximo os seus efeitos colaterais<sup>19</sup>.

Em relação à variação ponderal, um estudo com medroxiprogesterona<sup>9</sup> mostrou perda de peso após a terapia hormonal, o que não ocorreu neste estudo com o uso da trimegestona, sugerindo pouca atividade antiminerlocorticóide<sup>19</sup>.

O aumento da incidência de câncer de mama na pós-menopausa pode ser simplesmente uma coincidência com idade avançada<sup>5</sup>, mas também é possível que haja fatores promotores. Uma interpretação a respeito seria que o câncer de mama poderia surgir a partir de células sensíveis aos efeitos estrogênicos. A TH é feita justamente nesta fase de maior sensibilidade hormonal, aumentando a chance de câncer mamário<sup>5</sup>.

O papel da progesterona sobre o tecido mamário tem sido controverso nas últimas três décadas.



**Figura 1.** Fotomicrografias de tecido mamário nos grupos de estudo. A – atividade secretora em rata do grupo estrogênio (100X); B – HEB1 em rata do grupo combinado (100X); C – HEB2 em rata do grupo estrogênio (100X); D – tecido mamário mostrando ducto normal de rata do grupo controle (100X); E – HEB 2 em rata do grupo estrogênio (100X), a seta indica ducto mamário com microcalcificação; F – tecido mamário mostrando ducto normal em rata do grupo controle (40X).

**Tabela 2.** Percentagem de alterações histológicas do tecido mamário em cada grupo de estudo

Grupo	Classificação histológica					
	Normal	x/Z (%)	HEB1	x/Z (%)	HEB2	x/Z (%)
Controle	8/10	80,0	2/10	20,0	0	
Estrogênio	4/13	30,8	6/13	46,1	3/13 (23,1)	
Conjugado	8/16	61,5	5/13	38,5	0	

A ação desses hormônios sobre as células do tecido mamário variam de acordo com a estrutura molecular do hormônio, dose e duração do uso, e do saldo resultante de proliferação celular e apoptose no tecido mamário<sup>19</sup>.

Há relatos de alterações no ciclo celular de células mamárias induzidas pela progesterona. As células da mama em fase tardia da atividade do ciclo celular são inicialmente conduzidas para a fase S de síntese do DNA; porém este efeito é transitório, sendo que posteriormente esse hormônio suprimiria as ciclinas, suspendendo a divisão de células em fase G1 precoce<sup>21</sup>.

Alguns autores citam alterações celulares da mama com benzoato de estradiol, acetado de medroxiprogesterona e tibolona, encontrando exposição ao efeito mais acentuado com a associação de estrogênio com progesterona<sup>4</sup>. Em contradição, no presente estudo, as alterações celulares ocorreram tanto com uso do 17 beta-estradiol isolado quanto ao associado à trimegestona, sendo menor, porém, com o uso da associação, provavelmente devido ao tipo de progesterona usada.

Em uma revisão de literatura sobre o componente progestagênico em TH no risco de câncer de mama, evidenciou-se risco maior em pacientes recebendo combinação de estrogênios e progesterona do que nas que receberam apenas estrogênio. Além disso, observou-se diferença entre os diversos tipos de progesterona utilizados. Estudos que utilizaram as progesteronas provenientes de derivados de androgênios mostraram que estas estão associadas a um

aumento do risco, enquanto progesterona micronizada não tem ligação com a carcinogênese<sup>22</sup>.

Um estudo utilizando anticorpo anti-PCNA demonstrou que tanto estrogênio isolado quanto associado à progesterona, em mulheres, está associado com o aumento no nível de proliferação celular mamária<sup>23</sup>. Porém, em outro estudo retrospectivo, com 185 mulheres, no qual se utilizou o anticorpo Ki67 como marcador de proliferação celular mamária, não foi encontrado resultado significativo quanto a associação de estrogênio e progesterona, ou apenas estrogênio, sobre a proliferação epitelial<sup>24</sup>, concordante com os resultados do atual trabalho. As controvérsias nos relatos podem ser devido aos diferentes hormônios utilizados, sendo importante salientar que nem todos os progestagênios têm os mesmos efeitos sobre as células mamárias<sup>20,22</sup>. Outra consideração importante seria o tempo de TH utilizado, que variou entre os trabalhos, e ainda a idade de início da TH.

Concluimos que os hormônios usados em ratas castradas aumentaram a proliferação de células mamárias, tanto o 17 beta-estradiol isolado quanto associado à trimegestona, porém este efeito parece ser menor na associação; o mesmo ocorrendo em relação à fibrose do estroma mamário.

## Agradecimentos

À Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR – por disponibilizar suas dependências físicas e colaboradores, viabilizando a realização deste estudo.

## Referências

1. Spritzer PM, Wender MCO. Terapia hormonal na menopausa: quando não usar. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(7):1058-63.
2. World Health Organization. Research on the menopause in the 1990s: report of WHO Scientific Group. Geneva: WHO; 1994. (WHO technical report series, 866).
3. Piovesan AC, Soares Júnior JM, Mosquette R, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(4):204-9.
4. Vicelli JT, Gurgel MSC, Alvarenga M. Histologia mamária após o uso de esteróides sexuais – estudo em ratas. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(5):369-74.
5. Raafat AM, Hofseth LJ, Li S, Bennett JM, Haslam SZ. A mouse model to study the effects of hormone replacement therapy on normal mammary gland during menopause: enhanced proliferative response to estrogen in late postmenopausal mice. *Endocrinology*. 1999;140(6):2570-80.
6. Pardini D. Terapia hormonal da menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(6):938-42.
7. Koninckx PR, Spielmann D. The Trimegestone 302 Study Group. A comparative 2-year study of the effects of sequential regimens of 1 mg 17β-estradiol and trimegestone with a regimen containing estradiol valerate and norethisterone on the bleeding profile and endometrial safety in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*. 2005;21(2):82-9.
8. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. 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.
9. Santos LOM, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Efeito dos estrógenos conjugados e da medroxiprogesterona sobre a mama: estudo experimental. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2001;23(8):507-13.
10. Cuzick J. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44(16):2344-9.
11. Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Egan KM, Trentham-Dietz A, Baron JA, Storer BE, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(7):593-600.

12. Opatrny L, Dell’Aniello S, Assouline S, Suissa S. Hormone replacement therapy use and variations in the risk of breast cancer. *BJOG*. 2008;115(2):169-75.
13. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum Reprod Update*. 2005;11(6):545-60.
14. Harvell DM, Strecker TE, Tochacek M, Xie B, Pennington KL, McComb RD, et al. Rat strain-specific actions of 17beta-estradiol in the mammary gland: correlation between estrogen-induced lobuloalveolar hyperplasia and susceptibility to estrogen-induced mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(6):2779-84.
15. Yeh T. Postmenopausal hormone replacement therapy: endometrial and breast effects. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(1):17-24.
16. Gambacciani M, Spielmann D, Genazzani AR. Efficacy on climacteric symptoms of a continuous combined regimen of 1 mg 17beta-estradiol and trimegestone versus two regimens combining 1 or 2 mg 17beta-estradiol and norethisterone acetate. *Gynecol Endocrinol*. 2005;21(2):65-73.
17. Alvarenga M, Cavalcanti TC, Tahin QS. Histopathologic grading system for epithelial abnormalities induced by 7,12 – dimethylbenza anthracene (DMBA) in female rat mammary tissue. *Breast Dis*. 1989;2(2):71-9.
18. Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998;3(1):49-61.
19. Sitruk-Ware R. New progestagens for contraceptive use. *Hum Reprod Update*. 2006;12(2):169-78.
20. Haslam SZ. Experimental mouse model of hormonal therapy effects on the postmenopausal mammary gland. *Breast Dis*. 2005-2006;24(1):71-8.
21. Musgrove EA, Lee CS, Sutherland RL. Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol*. 1991;11(10):5032-43.
22. Gadducci A, Biglia N, Cosio S, Sismondi P, Genazzani AR. Progestagen component in combined hormone replacement therapy in postmenopausal women and breast cancer risk: a debated clinical issue. *Gynecol Endocrinol*. 2009;25(12):807-815.
23. Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathack 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.
24. Hargreaves DF, Knox F, Swindell R, Potten CS, Bundred NJ. Epithelial proliferation and hormone receptor status in the normal post-menopausal breast and the effects of hormone replacement therapy. *Br J Cancer*. 1998;78(7):945-9.