



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo original

Avaliação de danos genéticos e apoptose em mulheres menopausadas que fazem uso da terapia de reposição hormonal



Polyanna Carôzo de Oliveira, Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira
e José Roberto Cardoso Meireles*

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 21 de julho de 2016

Aceito em 29 de agosto de 2016

On-line em 24 de novembro de 2016

Palavras-chave:

Estrógeno

Progesterona

Apoptose

Micronúcleo

Genotoxicidade

R E S U M O

Objetivo: Avaliar por meio do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral a genotoxicidade de hormônios empregados na terapia de reposição hormonal (TRH).

Material e métodos: Quarenta mulheres menopausadas foram selecionadas e distribuídas em quatro grupos de dez: G0 (não submetidas à TRH), G1 (TRH com estrógeno), G2 (TRH com estrógeno e progestágeno) e G3 (TRH com tibolona). Células esfoliadas da mucosa oral foram coletadas e processadas para análise, sob microscopia óptica, de danos cromossômicos (micronúcleos) e de apoptose, inferida pelo somatório de alterações nucleares degenerativas (picnose, cariorréxis e cromatina condensada). Duas mil células foram analisadas por participante. A análise estatística foi feita com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros.

Resultados: A frequência de micronúcleo não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$). As alterações nucleares indicativas de apoptose foram significativamente mais altas entre as mulheres do G0 em relação às dos demais grupos ($p < 0,01$). Os grupos submetidos à TRH não diferiram quanto à ocorrência de apoptose ($p > 0,05$).

Conclusões: Esses resultados indicam que, tal como avaliado neste estudo, a TRH não induz danos cromossômicos. Entretanto, devido ao efeito antiapoptótico, permite a proliferação de células geneticamente danificadas, está assim potencialmente associada ao processo de transformação maligna.

© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: jrcmeireles@gmail.com (J.R. Meireles).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2016.08.005>

1413-2087/© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Assessment of genetic damage and apoptosis in postmenopausal women under hormone replacement therapy

A B S T R A C T

Keywords:

Estrogen
Progesterone
Apoptosis
Micronucleus
Genotoxicity

Objective: To evaluate through the micronucleus test in exfoliated cells of oral mucosa the genotoxicity of hormones used in hormone replacement therapy (HRT).

Material and methods: Forty postmenopausal women were selected and divided into four groups of ten: G0 (not submitted to HRT), G1 (HRT with estrogen), G2 (HRT with estrogen and progestogen) and G3 (HRT with tibolone). Exfoliated cells of oral mucosa were collected and processed for analysis of chromosomal damage (micronuclei) and apoptosis, inferred by the sum of nuclear degenerative alterations (picnosis, cariorrhexis and condensed chromatin). Two thousand cells were analyzed by participant. Statistical analysis was performed using the conditional test to compare proportions in a situation of rare events.

Results: The frequency of micronuclei did not differ between groups ($p > 0.05$). Apoptotic cells were significantly higher among women from G0 when compared to the other groups ($p < 0.01$). The groups submitted to HRT did not differ in apoptosis occurrence ($p > 0.05$).

Conclusions: These results indicate that, as assessed in this study, TRH does not induce chromosomal damage, however, due to the anti-apoptotic effect, cells genetically damaged can proliferate, favoring the malignant transformation process

© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A terapia de reposição hormonal (TRH) por meio da administração de hormônios à base de estrógeno e progestágenos sintéticos é usada para amenizar os sintomas da menopausa. Além desses hormônios, a tibolona, esteroide sintético com propriedades estrogênicas, progestogênicas e androgênicas, constitui uma opção na TRH.¹ Segundo Guazzelli et al. (2014)² “postula-se que a tibolona constitua uma valiosa opção para o tratamento das queixas climatéricas, além de ter efeitos positivos sobre a sexualidade, o bem-estar e o humor”.

Efeitos adversos da TRH, entretanto, têm sido relatados, entre eles o desenvolvimento de câncer.^{3,4} Uma vez que o câncer é uma doença genética decorrente de alterações em genes envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular, no reparo do DNA e na apoptose, a avaliação dos efeitos genotóxicos dos hormônios usados na TRH é necessária para maior segurança desse tratamento.

Joosten et al.,⁵ em revisão bibliográfica que incluiu estudos que objetivaram avaliar o potencial genotóxico de esteroides, alguns dos quais usados na TRH, concluíram que efeitos dessa natureza estavam associados principalmente aos estrógenos naturais estrona e estradiol e aos progestágenos sintéticos acetato de ciproterona e medroxiprogesterona.

Liehr³ observou que o 17 β -estradiol estimula a proliferação celular e quando metabolizado é convertido em compostos que podem causar danos ao DNA. Efeitos genotóxicos desse hormônio não foram, contudo, observados por Casella et al. (2005).⁶ Genotoxicidade de progestágenos foi observada nos estudos de Dhillon & Dhillon⁷ e Martelli et al.⁸ que avaliaram, respectivamente, o acetato de noretisterona em linfócitos humanos e o acetato de ciproterona em hepatócitos de ratas.

Danos ao DNA induzidos pela tibolona não foram observados em linfócitos de mulheres menopausadas que faziam uso exclusivo desse hormônio.⁹

Nesse contexto, testes de genotoxicidade se constituem em valiosos métodos para inferir a capacidade de determinado agente de induzir danos no material genético. Dentre esses, o teste de micronúcleo em células esfoliadas tem sido amplamente usado na avaliação de populações humanas expostas a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos.^{10,11} Micronúcleos são estruturas formadas por cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que, durante a divisão celular, falharam na ligação ao fuso e assim não foram incluídos no núcleo das células filhas. Refletem, portanto, a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos.

Na feitura do teste de micronúcleo, Tolbert et al.¹² e Thomas et al.¹³ propõem adicionalmente o cômputo de alterações nucleares indicativas de apoptose: picnose, cromatina condensada e cariorrhexis. Apoptose é um mecanismo de morte celular geneticamente programado responsável pela homeostase tecidual e pela eliminação de células com alterações no DNA que poderiam vir a lhes conferir vantagens sobre suas contrapartes normais.¹⁴

Diante do exposto, foi objetivo deste estudo avaliar, com o uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral, o potencial genotóxico da terapia de reposição hormonal em mulheres menopausadas.

Material e métodos

Tipo de estudo

O desenho experimental caracteriza um estudo individualizado e observacional de corte transversal que permite

identificar possível associação entre o uso de terapia hormonal e efeitos genotóxicos evidenciados pela ocorrência de danos cromossômicos (micronúcleos) e apoptose, inferida pelo somatório de alterações nucleares degenerativas (picnose, cariorréxis e cariólise).

Amostra

A amostra foi composta por 40 mulheres menopausadas distribuídas em quatro grupos de dez: G0, não submetidas à TRH; G1, que recebem estrógeno isoladamente; G2, tratadas com estrógeno combinado com progestágeno e G3, em uso de tibolona.

A caracterização da amostra foi feita com aplicação de questionário de entrevista sobre idade, hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, exposição à radiação e a genotóxicos químicos. Foram incluídas no estudo mulheres em menopausa havia pelo menos seis meses e, exceto no G0, em uso de TRH por igual período. As fumantes e aquelas que informaram exposição a agentes genotóxicos de qualquer natureza havia menos de seis meses foram excluídas.

Obtenção do material e preparações para o estudo citológico

Células da mucosa bucal foram coletadas com uso de escova endocervical e transferidas, por esfregaço, para lâmina de microscopia com duas gotas de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Após secagem à temperatura ambiente, as preparações foram submersas por dez minutos em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação. Vinte e quatro horas depois foram coradas com reativo de Shift e contracoradas com *fast green* a 1% em álcool absoluto por um minuto.

Análise citológica

A análise de micronúcleo e alterações nucleares indicativas de apoptose foi feita em teste cego com relação aos dados do questionário. Foram analisadas 2.000 células de cada mulher. Os critérios adotados para identificação de micronúcleo (fig. 1C) e alterações nucleares indicativas de apoptose (fig. 1A, B e D) foram os descritos por Sarto et al.¹⁵ e Tolbert et al.,¹² respectivamente. Apoptose foi inferida pelo somatório de cariorréxis, picnose e cromatina condensada.

Análise estatística

A comparação entre as médias de idade dos grupos foi feita com uso da análise de variância (Anova). O teste condicional para comparação de proporções em situação de eventos raros¹⁶ foi usado para avaliação da ocorrência de micronúcleos e apoptose. Esse é um teste opcional ao qui-quadrado, similar ao de Fisher,¹⁷ apropriado para avaliar eventos citogenéticos quando um grande número de células é necessário para detectar marcadores que ocorrem em baixa frequência.

Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi elaborado de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008 e obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (CAAE 0083.0.059.000-09). Todas as pessoas da amostra foram esclarecidas a respeito e tiveram liberdade para não participar ou desistir no momento que lhes fosse conveniente. Aquelas que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Resultados

Características da amostra

As médias de idade em anos $\pm$ desvio padrão das participantes, $51,7 \pm 6,53$ (G0), $56,2 \pm 7,00$ (G1), $57,8 \pm 8,75$ (G2) e $58,6 \pm 5,23$ (G3), não foram significativamente diferentes ($p > 0,50$). Duas mulheres em G0 e três em cada um dos demais grupos informaram ingestão de bebidas alcoólicas em frequência baixa (82% bebiam ocasionalmente).

O uso de TRH foi relatado evidentemente pelas mulheres do G1, G2 e G3. Em G1 o tempo de terapia foi de seis meses a dez anos, em G2 de um a dez anos e G3 entre seis meses e oito anos. Algumas mulheres (cinco) declararam ter usado ao longo do tempo de TRH mais de um tipo de hormônio, entretanto para este estudo foi considerada a terapia instituída nos últimos de seis meses. Nove mulheres do G1 faziam uso de estradiol e apenas uma de estriol. No G2 cada uma fazia uso do estradiol, combinado a um dos quatro progestágenos: acetato de noretisterona, didrogesterona, drospirenona, acetato de ciproterona.

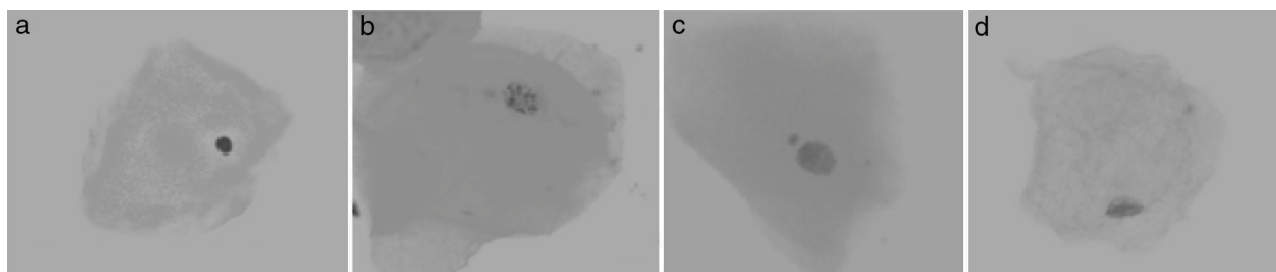


Figura 1 – Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa oral que apresenta picnose (a), cariorréxis (b), micronúcleo (c), cromatina condensada (d). Aumento: 1.000X. Microscópio Zeiss Axioscop.

Tabela 1 – Ocorrência de micronúcleo na mucosa oral de mulheres menopausadas submetidas (G1, G2 e G3) ou não (G0) à terapia de reposição hormonal

Grupo amostral	Micronúcleos observados	Micronúcleos esperado	Parâmetros estatísticos
G0	5	4,75	$\chi^2 = 2,2632$
G1	6	4,75	GL= 3
G2	6	4,75	$p > 0,05$
G3	2	4,75	

χ^2 , valor de qui-quadrado; GL, graus de liberdade.

Tabela 2 – Ocorrência de apoptose (Σ cariorréxis, cromatina condensada e picnose) na mucosa oral de mulheres menopausadas submetidas (G1, G2 e G3) ou não (G0) à terapia de reposição hormonal

Grupo amostral	Apoptose observada	Apoptose esperada	Parâmetros estatísticos	Partições do χ^2 ; GL= 1
G0	298	240,25	$\chi^2 = 19,43$	G0 x G1 = 15,24; $p < 0,05$
G1	210	240,25	GL = 3	G0 x G2 = 11,10; $p < 0,05$
G2	222	240,25	$p < 0,01$	G0 x G3 = 8,48; $p < 0,05$
G3	231	240,25		G1 x G2 = 0,33; $p > 0,05$
				G1 x G3 = 1,00; $p > 0,05$
				G2 x G3 = 0,18; $p > 0,05$

χ^2 , valor de qui-quadrado; GL, graus de liberdade.

Análise citogenética

Foram analisadas 80.000 células (20.000 em cada grupo). A análise estatística que comparou a ocorrência de micronúcleos observada entre os grupos não revelou diferença significativa (tabela 1).

Diferença significativa foi observada na ocorrência de apoptose (Σ cariorréxis, cromatina condensada e picnose) entre os grupos. As partições do qui-quadrado revelaram que as mulheres que não estavam sob TRH apresentaram frequência significativamente maior de apoptose em relação àquelas submetidas à TRH, independentemente do tipo de terapia. Em função do tipo de TRH, não foram observadas diferenças nas frequências de apoptose entre os grupos. Os dados referentes à ocorrência de apoptose são apresentados na tabela 2.

Discussão

Os efeitos adversos da menopausa, a exemplo de suores noturnos, secura vaginal, riscos de doença cardiovascular e osteoporose, podem ser minimizados com a TRH.¹⁸ Apesar dos benefícios que se traduzem em melhoria da qualidade de vida, Caufriez¹⁹ ressaltou que uma série de estudos tem revelado que os riscos potenciais da TRH poderiam exceder os benefícios esperados. Segundo este autor, entre os principais efeitos adversos estariam: problemas cardiovasculares, tromboembólicos e o risco de câncer, principalmente o câncer de mama. Nesse contexto, a análise de danos cromossômicos e alterações nucleares indicativas de apoptose, com uso do teste de micronúcleos, em mulheres sob TRH se faz importante, uma vez que na iniciação e no desenvolvimento do câncer danos de natureza diversa ao DNA ocorrem antes dos sintomas clínicos.

A ocorrência de micronúcleo observada neste estudo não foi estatisticamente diferente entre as mulheres sob TRH e aquelas não submetidas a essa terapia. Esse resultado

corroborar os descritos por Casella et al.⁶ em estudo no qual avaliaram a ocorrência de micronúcleo em linfócitos de 16 mulheres submetidas a TRH à base de dihidrogesteron combinada com 17- β - estradiol. Martelli et al.²⁰ e Reimann et al.²¹ avaliaram em modelos animais os efeitos genotóxicos de hormônios usados na TRH e também não identificaram maior ocorrência de micronúcleos.

A associação entre ocorrência de micronúcleo e hormônios usados na TRH foi, por outro lado, relatada em estudos *in vitro*.²²⁻²⁵ Kayani & Parry²² avaliaram o efeito genotóxico de 17- β -estradiol e progesterona em linfoblastos humanos e identificaram aumento na frequência de micronúcleos após exposição. Fisher et al.²³ e Stopper et al.,²⁵ em avaliação dos efeitos genotóxicos do estradiol, relataram resultados similares possivelmente devido ao efeito desse hormônio em estimular a proliferação celular. Maior ocorrência de micronúcleos em hepatócitos de ratos induzida pelo acetato de ciproterona (progestágeno sintético) foi descrita por Martelli et al.⁸

Apesar de não terem sido encontrados na literatura estudos que relacionem a frequência de micronúcleos com a administração de tibolona, Ozcagli et al.⁹ avaliaram o potencial genotóxico desse composto com o uso do ensaio cometa e não observaram diferença significativa na ocorrência de danos ao DNA entre um grupo de mulheres controle e outro em TRH com tibolona.

A apoptose é um processo que tem papel essencial como mecanismo de proteção contra a carcinogênese por eliminar células geneticamente danificadas.²⁶ Neste estudo a ocorrência dessas alterações foi significativamente maior no grupo controle (G0) quando comparado com qualquer um dos grupos que usavam a TRH. Esse resultado sugere que os hormônios da TRH podem estar relacionados ao processo de transformação maligna devido à inibição da apoptose, o que permitiria a proliferação de células geneticamente danificadas.

Efeito antiapoptótico do estradiol foi relatado por Gompel et al.,²⁷ Teixeira et al.²⁸ e Lee et al.²⁹ Hissom e Moore³⁰ também

observaram esse efeito em relação aos progestágenos, porém, segundo esses autores, os progestágenos tanto inibem a morte celular quanto à proliferação, resultados esses confirmados em outros estudos.^{31,32}

Franke e Vermes³³ mostraram que nem todos os progestágenos agem igualmente em células de câncer de mama *in vitro*. Alguns estimulam a proliferação, enquanto outros induzem a apoptose. Acetato de medroxiprogesterona, acetato de noretisterona, isolados ou combinados ao estradiol, estimulam a proliferação; dihidroprogesterona não induz a proliferação nem a apoptose, enquanto que a progesterona induz a apoptose.

Em relação ao uso combinado de estradiol e progestágeno, Moore et al.³² sugeriram que os progestágenos são inibidores de morte celular mais potentes do que os estrógenos. Esse acentuado efeito antiapoptótico dos progestágenos poderia explicar por que a TRH que combina progestágeno e estrógeno está mais relacionada com o risco de câncer de mama do que a terapia à base de estrógeno.³⁴

Em relação à tibolona, no presente estudo não foi observada diferença significativa na ocorrência de apoptose entre o grupo sob TRH com esse composto e aqueles que usam estrógeno isoladamente ou estrógeno combinado com progestágeno. Além disso, a ocorrência de apoptose foi também maior no G0 em relação ao G3. Esse resultado revela que a tibolona também está relacionada à inibição da apoptose. Entretanto, outros estudos são necessários para avaliar o efeito da tibolona na apoptose, uma vez que Gompel et al.³⁵ e Kloosterboer³⁶ relataram que esse hormônio tem efeito indutor desse processo, e não inibidor.

Nas condições em que o estudo foi feito é possível concluir que em longo prazo a TRH pode contribuir para o desenvolvimento neoplásico por permitir a proliferação de células geneticamente danificadas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Ao Centro de Pesquisa e Assistência em Reprodução Humana (CEPARH) de Feira de Santana e às médicas Adenilda Martins e Ednalva Menezes, que propiciaram a coleta do material usado neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Pardini D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58:172-81.
- Guazzelli RM, Lima SMRR, Postigo S, Martins CPB, Yamada SS. Estudo dos efeitos do *Tribulus terrestris* e da tibolona em mulheres com disfunção do desejo sexual após a menopausa. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo.* 2014;59:20-6.
- Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen. *Endocr Rev.* 2000;21:40-5.
- Mense SM. Estrogen-induced breast cancer: Alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicol Appl Pharm.* 2008;232:78-85.
- Joosten HFP. Genotoxicity of hormonal steroids. *Tox Lett.* 2004;151:113-34.
- Casella M, Manfredi S, Andreassi MG, Vassale C, Prontera C, Simi S, et al. Hormone replacement therapy: one-year follow up of DNA damage. *Mutat Res.* 2005;585:14-20.
- Dhillon VS, Dhillon IK. Genotoxicity evaluation of norethisterone acetate. *Mutat Res.* 1996;367:1-10.
- Martelli A, Brambilla Campart G, Ghia M, Allavena A, Mereto E, Brambilla G. Induction of micronuclei and initiation of enzyme-altered foci in the liver of female rats treated with cyproterone acetate, chlormadinone acetate or megestrol acetate. *Carcinogenesis.* 1996;17:551-4.
- Ozcagli E, Sardas S, Biri A. Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. *Maturitas.* 2005;51:280-5.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659:93-108.
- Cerqueira EMM, Meireles JRC. The use of the micronucleus test to monitor individuals at risk of oral cancer. In: *The research and biology of cancer II.* Hong Kong: iConcept Press Ltd; 2014. p. 36-58.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271:69-77.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4:825-37.
- Weinberg RA. Uma célula renegada: como o câncer começa. Rio de Janeiro: Rocco; 2000.
- Sarto F. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987;2:11-7.
- Bragança-Pereira CA. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R, editors. *Mutagenese, carcinogenese e teratogenese: métodos e critérios de avaliação.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética; 1991. p. 113-21.
- Kalbfleisch JG. *Probability and Statistical Inference.* New York: Springer-Verlag; 1979.
- Weismiller DG. Menopause. *Prim Care Clin Office Pract.* 2009;36:199-226.
- Caufriez A. Hormonal replacement therapy (HRT) in postmenopause: a reappraisal. *Ann Endocrinol (Paris).* 2007;4:241-50.
- Martelli A, Mereto E, Ghia M, Orsi P, Allavena A, De Pascalis CR, et al. Induction of micronuclei and of enzyme-altered foci in the liver of female rats exposed to progesterone and three synthetic progestins. *Mutat Res.* 1998;419:33-41.
- Reimann R, Kalweit S, Lang R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes *in vitro* and the mouse bone marrow micronucleus test *in vivo*. *Environ Mol Mutagen.* 1996;28:133-44.
- Kayani MA, Parry JM. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the *in vitro* cytokinesis blocked micronucleus assay. *Mutat Res.* 2008;651:40-5.
- Fischer WH, Keiwan A, Schmitt E, Stopper H. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis.* 2001;16:209-12.

24. Kabil A, Silva E, Kortenkamp A. Estrogens and genomic instability in human breast cancer cells – Involvement of Src/Raf/Erk signaling in micronucleus formation by estrogenic chemicals. *Carcinogenesis*. 2008;29:1862–8.
25. Stopper H, Schmitt E, Gregor C, Mueller SO, Fischer WH. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis*. 2003;18:243–7.
26. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK, Siddiqi M. Anticlastogenic antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res*. 2003; 523-524:33-41.
27. Gompel A, Somai S, Chaouat M, Kazem A, Kloosterboer HJ, Beusman I, et al. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids*. 2000;65:10–1.
28. Teixeira C, Reed JC, Christine PMA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1995;55:3902–7.
29. Lee Y, Renaud RA, Friedrich TC, Gorski J. Estrogen causes cell death of estrogen receptor stably transfected cells via apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998;67:327–32.
30. Hissom JR, Moore MR. Progestin effects on growth in the human breast cancer cell line T-47D—possible therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;145:706–11.
31. Moore MR, Conover JL, Franks KM. Progestin effects on longterm growth, death, and bcl-xL in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277:650–4.
32. Moore MR, Spence JB, Kiningham KK, Dillon JL. Progestin inhibition of cell death in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;98:218–27.
33. Franke HR, Vermes I. Differential effects of progestogens on breast cancer cell lines. *Maturitas*. 2003;46:55–8.
34. Women's Health Initiative Steering Committee. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: The Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *J Am Med Assoc*. 2004;291: 1701–12.
35. Gompel A, Chaouat M, Jacob D, Perrot JY, Kloosterboer HJ, Rostene W. In vitro studies of tibolone in breast cells. *Fertil Steril*. 2002;78:351–9.
36. Kloosterboer HJ. Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;76:231–8.