

SELMA DO NASCIMENTO SILVA

**ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DE *Morus nigra* L., MORACEAE,
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges

São Luís
2012

Silva, Selma do Nascimento

Atividade Fitoestrogênica de *Morus nigra* L., Moraceae, em ratas ovariectomizadas/ Selma do Nascimento Silva, 2012.

126 f.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges

Tese (Doutorado em Biotecnologia - Rede Nordeste de Biotecnologia)- Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, 2012.

1. *Morus nigra* L. 2. Amora-preta 3. Terapia hormonal 4. Flavonoides. I Silva, Selma do Nascimento. I. Título

CDU 634.38

SELMA DO NASCIMENTO SILVA

**ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DE *Morus nigra* L., MORACEAE, EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Recursos Naturais.

Aprovada em 02/10/2012

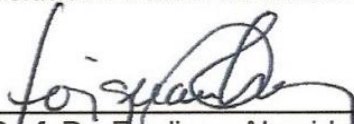
BANCA EXAMINADORA



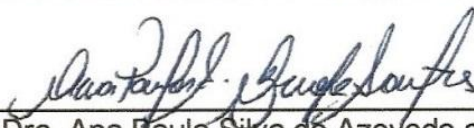
Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA



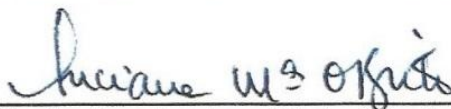
Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA



Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA



Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Universidade Federal do Maranhão-UFMA



Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito
Universidade Federal do Maranhão-UFMA



Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA

*“O importante é semear, produzir milhões de
sorrisos de solidariedade e amizade.
Procuro semear otimismo e plantar sementes de
paz e justiça.
Digo o que penso, com esperança.
Penso no que faço, com fé.
Faço o que devo fazer, com amor.
Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois
bondade também se aprende!”*

Cora Coralina

Dedico este trabalho.....

..... à minha família:

Olavo Oliveira Silva e Ednólia do Nascimento Silva, meus pais.

“Que nortearam e norteiam meus caminhos com seus próprios exemplos, que sempre deram importância à educação, permitindo-me dar mais um passo. Apoiaram-me e incentivaram-me a sempre poder melhorar. Tenho muito que agradecerê-los por isso”.

Simone, Sandro e Susane do Nascimento Silva, meus irmãos.

“Sempre presentes, meus queridos irmãos”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força em todos os momentos de fraqueza e desânimo, que guiou meus pensamentos e que sempre ilumina meus caminhos, escolhas e sonhos.

Ao meu orientador, professor *Dr. Antônio Carlos Romão Borges*, por esta oportunidade, pela confiança constante na realização deste trabalho, pelo incentivo e sabedoria, pela paciência e tranquilidade durante todo esse processo.

À minha eterna e sempre orientadora, “mãe científica”, *Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges*, não poderia deixar de agradecê-la pela sua valiosa orientação, pelo estímulo constante e por compartilhar os seus valiosos conhecimentos científicos na realização deste estudo. Entretanto, mais importante que seu significativo papel na obtenção dos títulos de Mestre e Doutor, foi a convivência ao longo dos últimos onze anos que me fizeram aprender o verdadeiro sentido das palavras pesquisa e obstinação e certamente contribuíram positivamente para a profissional que sou. Para mim e com certeza, para todas as gerações do Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia (LPPF) da UFMA, profa. Marilene é sinônimo de competência, garra, determinação e disciplina. Meu muito obrigada, professora Marilene!

À minha querida professora, também eterna orientadora, *Profa. Dra. Sônia Maria de Farias Freire*, que me iniciou nessa vida, da pesquisa, estando sempre presente, com muita disposição, boa vontade e com conselhos valiosos. “Ensinou que cativar a atenção das pessoas depende de nós mesmos”. “Mais que uma professora, é um exemplo”.

Às minhas amigas, professoras e companheiras de jornada, *Iracelle Carvalho Abreu* e *Maria do Socorro de Sousa Cartágenes*, que participaram conjuntamente das incertezas e dúvidas desse trabalho. Sempre presentes, são exemplos de profissionalismo, de compromisso e da verdade! Nesta caminhada, foram muitas manhãs, tardes, noites e finais de semana trabalhando, mas também se divertindo! Quantas discussões científicas, mas também quantas marocagens e gargalhadas! Adoro!

Aos amigos e colegas do LPPF da UFMA, do qual iniciei e farei eternamente parte, agradeço o carinho, a disponibilidade, as contribuições durante as manhãs, tardes, noites e fins de semanas. Ahirlan Castro, Rachel Melo, Débora Luana, Elaine

Mendes e outros colaboradores, cada um sabe como foram peça fundamental durante esta caminhada.

Aos alunos de IC dos laboratórios de Farmacologia e Fisiologia: Wermerson Barroso, Mariana Abreu, Rosa Helena, Jonas Sanches e Danylo Noletto e, em especial, à minha aluna Renata Ohana Benevides, pela dedicação, determinação e sempre com boa vontade e cuidado com o seu trabalho de pesquisa e também com tudo e com todos ao seu redor. Já pensou se todo IC fosse assim? Essa já mostrou para o que veio!

Ao amigo *Richard Dutra* pelos retoques, pelas “consultas” e pela valiosa contribuição nas interpretações cromatográficas. Sem seus conhecimentos químicos, e acima de tudo sem sua disponibilidade em ensinar-me, nada disso seria possível. Você foi demais! Serei eternamente grata!

À profa. *Maria do Rosário Oliveira dos Anjos* (Departamento de Patologia-UFMA) pelas análises histopatológicas.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF-UFMA) e em especial à profa. *Dra Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos*, que não hesitou em ajudar-me quando a procurei em busca de ajuda com a cultura de células. Diferente de muitos outros professores e laboratórios, prontamente estava ela com tudo para iniciarmos. Dispôs do seu tempo e de seus conhecimentos, com muita boa vontade e sem “blá blá blá” ou “se”, “mas”, etc. Ela realmente me fez repensar na minha postura enquanto professora e na maioria dos meus colegas! Foi excelente!

Ao prof. *Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira* por disponibilizar e orientar nas análises microscópicas (Lab. Imunofenotipagem-CEPEC). Exemplo de professor! Sempre nos incentivando para a excelência do profissionalismo! É o tipo de professor que não se esquece e tomamos como referência. Está sempre dando choque nos seus alunos...no bom sentido! Chamando o aluno para a realidade, do seu jeito meio tosco, mas com muita paixão pelo que faz!

Ah, essa aqui não existe! Tudo o que eu disser será pouco. Mas, vamos lá! À profa. *Maria José Luna dos Santos da Silva*, por estar sempre presente na minha caminhada e fazer questão disso. Por ser exemplo de pessoa, de profissional e por sua eterna disponibilidade em ajudar a todos. É por essas e muitas outras razões que me sinto sempre segura ao seu lado. Pode vir o que vier, que Maria José está sempre firme! Não teme e não nos deixa temer! É uma mãezona! Leciona, incentiva e briga por uma boa causa como ninguém. Acredito que todos os alunos que

passaram por ela tem esse mesmo pensamento, pois não é à toa que todos os anos é homenageada! Apesar de um pouco mais distante, pois agora não ficamos mais de testa lendo lâminas, serei eternamente grata! E por último, e o de menos, obrigada também por deixar o laboratório de citologia clínica e o seu ultramicroscópio a meu dispor!

À toda a minha família ***pela compreensão e estímulo presentes durante todos os momentos.***

Não poderia deixar de agradecer aos amigos e colegas (são muitos, não poderia descrever em apenas uma página...) que entre uma conversa ou ajuda, me fizeram chegar até o fim...

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação do RENORBIO, que contribuíram intensamente na minha formação objetivando o êxito deste trabalho.

À *FAPEMA* – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (Processo APP - 01086/10) e ao *CNPq* – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 555140/2010), pelo apoio fornecido por estas instituições de fomento que visam o aperfeiçoamento tecnológico e científico do país, sempre auxiliando no desenvolvimento de novas pesquisas de qualidade.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, o meu muito obrigada. Quero deixar claro que os agradecimentos são meus!

RESUMO

O hipoestrogenismo no climatério associa-se com sintomas vasomotores, doenças cardiovasculares, osteoporose e alterações urogenitais. Nesta fase da vida da mulher, a reposição hormonal pode amenizar algumas consequências da diminuição estrogênica ocasionada pela falência ovariana. Porém, a terapia estrogênica pode ocasionar efeitos adversos como mastalgia, sangramentos uterinos, além de aumentar o risco relativo para neoplasias de mama e endométrio. *Morus nigra* L. (amora) é uma das espécies vegetais mais utilizadas no Brasil para o tratamento dos sintomas do climatério. Assim, o presente estudo objetiva avaliar os prováveis efeitos fitoestrogênicos do extrato hidroalcoólico (EH) das folhas de *M. nigra* em ratas Wistar ovariectomizadas. Para tanto, as folhas secas foram pulverizadas e maceradas em etanol a 70% na proporção 1:3 (v/v), para obtenção do EH (rendimento=21,90%). O EH foi submetido à avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, analisado por cromatografia líquida acoplada ao espectro de massa (LC-MS/MS) para identificação de composto e, em seguida, particionado com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol/água. A segurança do extrato foi determinada pelo teste de toxicidade aguda em camundongos, nas doses de 0,1–10,0g/kg, por via oral (v.o.). Para avaliar a atividade estrogênica do extrato das folhas de *M. nigra*, as ratas foram divididas em dois grupos controle: falso-operados (SHAM) e ratas ovariectomizadas (OVX), que receberam 0,1mL/100g de solução salina; e dois grupos teste: ovariectomizadas e tratadas com solução estroprogestativa (OVX-EP-50µg/Kg) e ovariectomizadas e tratadas com EH de *M. nigra* 500mg/kg (OVX-EH500), n=8-10, diariamente, por v.o., durante 14 semanas. Durante todo o período de tratamento foram analisadas a frequência das fases do ciclo estral, a ingestão de alimentos e o peso corporal. Ao final do tratamento foram avaliados os parâmetros bioquímicos e hormonais, histomorfometria do útero, vagina e mama. Além disso, a influência de *M. nigra* sobre a proliferação de células tumorais de mama da linhagem MCF-7 foi determinada pelo método MTT. O EH apresentou alta atividade antioxidante quando comparada ao padrão quercetina. Na análise do EH por LC-MS/MS em comparação com dados da literatura permitiu a identificação de flavonoides (caempferol e quercetina) e derivados do ácido quínico (ácido cafeoilquínico e isômeros de ácido dicafeoilquínico). Na análise do ciclo estral, o grupo OVX-EH500 apresentou um aumento nas fases estro e proestro em 15,25% e 26,6%, respectivamente, quando comparado ao grupo OVX. A ovariectomia promoveu um aumento no peso corporal, que foi inibido pelo tratamento com o EH e solução EP. O peso do tecido adiposo abdominal também foi significativamente menor nos grupos OVX-EP e OVX-EH, quando comparados ao grupo OVX. A ovariectomia também induziu atrofia do tecido uterino (Grupo OVX) em comparação ao grupo SHAM, indicando a eficiência do procedimento cirúrgico; e a administração de EP aumentou significativamente o peso do útero em comparação com grupo OVX. A média do peso uterino do grupo OVX-EH também foi maior do que o grupo OVX, porém menor que o grupo OVX-EP. Quanto à análise histológica, observou-se que as características do epitélio escamoso da vagina do grupo OVX-EP ($57,79 \pm 1,49\mu\text{m}$), em relação à espessura, se assemelharam à das ratas do grupo SHAM ($50,66 \pm 1,60\mu\text{m}$). Após 14 semanas de administração de EH houve uma reversão parcial da atrofia vaginal ($37,34 \pm 1,77\mu\text{m}$), quando comparado ao grupo OVX ($12,92 \pm 0,53\mu\text{m}$), mostrando maturação deste tecido com o tratamento; entretanto, o EH não alterou o tecido mamário, diferente do estímulo induzido pelo EP. Em relação

à bioquímica foi observado que os tratamentos (EH e EP) reduziram as concentrações de triglicérides em 27,5% e 23,8% respectivamente, quando comparado ao grupo OVX. Nos testes *in vitro*, os dados indicam que o EH de *M. nigra* atua como um fraco fitoestrógeno e protege contra a proliferação de células de carcinoma de mama humano (MCF-7). No estudo toxicológico agudo, o tratamento de camundongos com o EH não produziu alterações comportamentais nem mortes. Em conjunto, os dados demonstram que o EH de *M. nigra* apresenta efeitos benéficos em modelos de hipoestrogenismo induzida em ratas, diminuindo a atrofia uterina e vaginal, sem alterar a estrutura mamária, melhorando os níveis de triglicérides, tendo potencial antioxidante, além de mostrar-se seguro. Esses efeitos podem estar relacionados com seus constituintes flavonoídicos, e dessa forma, a espécie vegetal pode ser útil no controle de sintomas da menopausa como uma alternativa para Terapia de Reposição Hormonal.

Palavras-chave: *Morus nigra* L., terapia hormonal, ratas ovariectomizadas, flavonoides, LC-MS/MS.

ABSTRACT

The hypoestrogenism in climacteric is associated with vasomotor symptoms, cardiovascular disease, osteoporosis and urogenital changes. At this stage of life of women, hormone replacement HRT can alleviate some consequences of decreased estrogen caused by ovarian failure. However, estrogen therapy may cause adverse effects such as breast tenderness, uterine bleeding and increase the relative risk for cancers of the breast and endometrium. *Morus nigra* L. (mulberry) is a plant species most used in Brazil for the treatment of menopausal symptoms. Thus, this study aims to assess the likely effects phytoestrogenics the hydroalcoholic extract (HE) from the leaves of *M. nigra* in ovariectomized female rats. Therefore, the dried leaves were pulverized and soaked in 70% ethanol in the proportion 1:3 (v/v) to obtain the HE (yield=21.90%). The HE was subjected to evaluation of the antioxidant activity by capturing free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil, analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrum (LC-MS/MS) for identification of compound and then partitioned with hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol/water. The safety of extract was determined by the test of acute toxicity in mice at doses of 0.1 to 10.0 g/kg orally (p.o.). To evaluate the estrogenic activity of the extract from *M. nigra* leaves, the rats were divided into two control groups: sham-operated (SHAM) and ovariectomized (OVX), which received 0.1 mL/100 g saline, and two test groups: ovariectomized and treated with a solution estroprogestative (OVX-EP-50µg/kg) and ovariectomized and treated with HE *M. nigra* 500mg/kg (OVX-HE500), n = 8-10, daily, p.o., for 14 weeks. Throughout the treatment period were analyzed the frequency stage of the estrous cycle, food intake and body weight. At the end of treatment were evaluated biochemical parameters and hormone, histomorphometry of the uterus, vagina and breast. Furthermore, the influence of *M. nigra* on the proliferation of breast tumor cell line MCF-7 was determined by MTT method. HE showed high antioxidant activity when compared to standard quercetin. The analysis by LC-MS/MS EH compared with literature data allowed the identification of flavonoids (kaempferol and quercetin) and quinic acid derivatives (caffeoylquinic acid and isomers dicaffeoylquinic acid). In the analysis of the estrous cycle, the group OVX-HE500 showed an increase in proestrous and estrous phases at 15.25% and 26.6%, respectively, when compared to OVX group. Ovariectomy caused an increase in body mass, which was prevented by treatment with HE and EP solution. The weight of abdominal adipose tissue was also significantly lower in groups OVX-HE and OVX-EP compared to the OVX group. Ovariectomy also induced atrophy of uterine tissue (OVX group) compared to SHAM group, indicating the efficiency of the surgical procedure, and the administration of EP significantly increased uterine weight compared with OVX group. Average uterine weight of the OVX-HE group was also higher than the OVX group, but smaller than the OVX-EP group. In the histological analysis, it was observed that the characteristics of the squamous epithelium of the vagina of OVX-EP group ($57.79 \pm 1.49\mu\text{m}$), relative to thickness, were similar to that of SHAM group ($50.66 \pm 1.60\mu\text{m}$). After 14 weeks of administration of HE was a partial reversal of vaginal atrophy ($37.34 \pm 1.77\mu\text{m}$), when compared to the OVX group ($12.92 \pm 0.53\mu\text{m}$), showing maturation of this tissue with the treatment, however, the HE did not alter breast tissue, unlike the stimulus EP-induced.

Regarding biochemistry was observed that the treatments (HE and EP) reduced concentrations of triglycerides in 27.5% and 23.8% respectively, when compared to OVX. In *in vitro* tests, the data indicate that the HE *M. nigra* acts as a weak phytoestrogen and protects against cell proliferation of human breast carcinoma (MCF-7). In acute toxicity study, the treatment of mice with HE did not produce behavioral changes or deaths. Together, the data demonstrate that the HE *M. nigra* L. has beneficial effects in models of induced menopause in rats, decreased uterine and vaginal atrophy, without changing the mammary structure, improving triglyceride levels and shows up secure and potent oxidant activity. These effects may be related to their flavonoid constituents, and thus the plant species may be useful in controlling symptoms of menopause as an alternative to Hormone Replacement Therapy.

Key words: *Morus nigra* L., hormone therapy, ovariectomized rats, flavonoids, LC-MS/MS.

LISTA DE SIGLAS

AMH	Hormônio anti-mülleriano
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
IGF-1	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
EI	Electron Ionization
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERE	Elemento de resposta ao estrogênio
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Etanol
FE's	Fitoestrógenos
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HERS	Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study
IMS	International Menopause Society
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LH	Hormônio luteinizante
LPL	Lipoproteína lipase
MeOH	Metanol
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MPA	Medroxiprogesterona
MWS	Million Women's Study
[M-H] ⁻	Molécula desprotonada
MS	Mass spectrometry
MS/MS or MS ²	Tandem mass spectrometry
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NAMS	North American Menopause Society
m/z	Razão massa sobre carga
OH	Hidroxila
pH	Potencial Hidrogeniônico
RE	Receptor de estrógeno
RE-α	Receptor de Estrogênio α
RE-β	Receptor de Estrogênio β
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
STRAW	Stages of Reproductive Aging Workshop
TH	Terapia Hormonal
TGFβ	Fatores de crescimento transformadores beta
TIC	Total Ion Current
WHI	Women's Health Initiative

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Climatério e Menopausa	18
2.2	Terapia Hormonal (TH)	29
2.3	Terapia Alternativa/ Fitoestrógenos	37
2.4	<i>Morus nigra</i> Linnaeus	42
3	OBJETIVOS	49
	REFERÊNCIAS	50
4	CAPÍTULO I	
	Artigo a ser submetido ao periódico Maturitas “The European Menopause Journal”: “ Evaluation of the Phyto-oestrogenic Effects of <i>Morus nigra</i> L. (Moraceae) Leaves in Ovariectomised Rats ”.....	68
5	CAPÍTULO II	
	Artigo a ser submetido ao periódico Phytotherapy Research: “ Chemical analysis and effect of <i>Morus nigra</i> L. (Moraceae) Leaves on mammary of epithelial cell proliferation ”	95
6	CAPÍTULO III	
	Patente depositada: “ Formulação de composição farmacêutica de liofilizado do extrato hidroalcoólico e/ou frações ativas das folhas trituradas ou moídas de <i>Morus nigra</i> e seu uso no alívio dos sintomas da menopausa ”	118
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
	ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

Menopausa é definida como o término da menstruação e caracterizada pela cessação irreversível da capacidade reprodutiva feminina. É um fenômeno biológico universal, que afeta todas as mulheres de meia-idade, geralmente entre 45 e 55 anos (GREENDALE; LEE; ARRIOLA, 1999; FREITAS; SILVA; SILVA, 2004). O mecanismo fisiológico responsável pela menopausa é a perda gradual dos folículos ovarianos, que por sua vez resulta na produção reduzida de estradiol pelo ovário, a forma biologicamente ativa de estrogênio, bem como aumento das concentrações circulantes de hormônio folículo-estimulante (FSH) e diminuição das concentrações de inibina, responsável pela inibição da liberação de FSH, até o término final do ciclo menstrual (KILAF; KIRCHENGAST, 2008). O diagnóstico da menopausa pode ser determinado retrospectivamente após 12 meses de amenorréia; sendo sua transição considerada complexa e varia consideravelmente de uma mulher para outra. A diminuição do número de folículos ovarianos, devido à atresia folicular ou à ovulação é a base para o declínio reprodutivo e ocorre ao longo da vida. Ou seja, as alterações no ciclo menstrual e endócrinas já podem ser observadas, em média de 12 a 24 meses antes da menopausa, caracterizadas por ciclos irregulares e aumento das concentrações de FSH (O'NEILL; EDEN, 2012; TILLY, 2003).

Essa insuficiência ovariana ou hipoestrogenismo acarreta uma série de sintomas que são característicos da transição da menopausa e que podem ocorrer em até 85% das mulheres. Os sintomas desta fase incluem desde atrofia genital, até sintomas vasomotores e psicológicos, como fogachos, suores noturnos, palpitações, insônia, ansiedade, depressão, vertigens, dores de cabeça e fadiga e, uma série de outros sintomas, com diferentes graus de gravidade, afetando seu funcionamento pessoal e social, e sua qualidade de vida (AGWU; UMEORA; EJIKEME, 2008; STURDEE; PANAY, 2010; O'NEILL; EDEN, 2012).

Além disso, é importante enfatizar, que o prolongamento da expectativa de vida feminina gerou um interesse crescente acerca do climatério e suas implicações para a saúde da mulher. Durante o século passado, a expectativa de vida da mulher nos países industrializados aumentou cerca de 30 anos. Na

França, por exemplo, a expectativa de vida subiu de 62 anos em 1936 para 81 anos em 1990 (BRODY et al., 2000). Assim, enquanto no início do século 20, a maioria das mulheres sobreviveram apenas alguns anos após a menopausa, agora para uma mulher saudável é esperado que ela passe cerca de 40% do seu tempo de vida em pós-menopausa (BRODY; GRANT; FRATESCHI, 2000). No Brasil, de acordo com dados censitários, a melhora das condições de saúde pública também levou ao aumento da expectativa de vida da população geral brasileira (DE LORENZI et al., 2009).

Segundo o IBGE (BRASIL, 2007), a projeção da população no Brasil mostra a tendência de crescimento do número de idosos, que deve alcançar 25 milhões de pessoas em 2020, a maioria composta por mulheres. Assim, um número cada vez maior de mulheres alcança o climatério, correspondendo nos últimos anos, à aproximadamente dois terços da população acima de 75 anos, em países como o Brasil e África do Sul (OMS, 2005). Portanto, considerando que a idade média da menopausa natural é de aproximadamente 51 anos (ARMSTRONG et al., 2004; SHUSTER et al., 2010), isto significa que estas mulheres viverão cerca de 1/3 de suas vidas no período pós-menopausa, expostas às consequências da deficiência estrogênica. São atualmente mais de 12 milhões de brasileiras com mais de 50 anos, que irão procurar os serviços de saúde e consultórios médicos apresentando queixas e doenças próprias da idade avançada, muitas delas de natureza crônica, às vezes incapacitantes, algumas letais, que poderiam ser prevenidas ou atenuada pela reposição hormonal. Portanto, a prevenção e o tratamento da menopausa associados aos distúrbios clínicos progressivamente tornou-se uma preocupação e um problema de saúde pública (HESS et al., 2012).

A terapia hormonal (TH) pós-menopausa com estrógeno ou estrogênio associado à progestágenos é amplamente considerado como padrão terapêutico para aliviar os sintomas físicos associados com a menopausa, e para ajudar na prevenção das consequências clínicas de um estado de déficit de estrogênio (UTIAN et al., 2008). Entretanto, a TH em mulheres na pós-menopausa constitui-se hoje em um dos temas mais emblemáticos da ginecologia no que diz respeito a dúvidas e incertezas em relação aos possíveis riscos e benefícios de seu emprego, tanto pelos médicos ginecologistas quanto pelas potenciais usuárias. O tema “Terapia Hormonal”,

na menopausa, ganhou realce em 2002, quando foram divulgados resultados parciais do estudo *Women's Health Initiative Study Group* (WHI - 2002), com 16 mil mulheres, onde indicavam que o uso dos hormônios aumentava o risco de doenças cardiovasculares e de câncer de mama (WHI - 2002) e a partir daí a utilização da TH caiu dramaticamente em todo o mundo (PELUCCHI; LEVI; LA VECCHIA, 2010).

Diante desse contexto, houve um interesse considerável no desenvolvimento de medicamentos seletivos que aliviem os sintomas da menopausa e que sejam seguros no sentido de não provocar proliferação celular na mama ou no endométrio. O interesse no estudo farmacológico de compostos bioativos presentes em plantas com atividade na menopausa aumentou na última década, e um expressivo número de mulheres aderiram às terapias alternativas a fim de aliviar os sinais e sintomas da menopausa (MA; DRIELING; STAFFORD, 2006; SCHEID et al., 2010). Assim, a comunidade científica, por sua vez, começou a se dedicar sobre o estudo de produtos naturais como TH, os fitoestrógenos, uma opção já conhecida, mas até então pouco investigada.

Classificados como polifenólicos naturais, os fitoestrógenos, compreendem uma família que incorpora vários grupos de compostos não-esteroidais. Fazem parte desta classe as isoflavonas (encontradas principalmente na soja), lignanas (encontrado em grãos) e estilbenos (encontrado na pele da uva). Outros compostos que também apresentam esta atividade, porém menos investigados incluem as flavonas, as chalconas e os cumestanos (KRONENBERG; FUGH-BERMAN, 2002; LETHABY et al., 2007; SCHWARTZ; SONTAG; PLUMB, 2009). Dados epidemiológicos indicam que os povos asiáticos têm menores taxas de fraturas osteoporóticas, doenças cardiovasculares, sintomas pós-menopausa e certos tipos de câncer do que a população ocidental. Estas vantagens para a saúde são notavelmente reduzidas quando os asiáticos adotam uma dieta e estilo de vida ocidental. A genisteína e daidzeína, isoflavonas predominantes na soja, são extremamente importantes na dieta da população asiática. Assim muitos pesquisadores investigam, por exemplo, a relação entre a ingestão de soja e doenças na pós-menopausa (ORGAARD; JENSEN, 2008; USUI, 2006).

Os fitoestrógenos são notavelmente semelhantes em estrutura química ao estrogênio de mamífero, pois de acordo com estudos computacionais, estruturais e bioquímicos estes compostos precisam se ligar ao receptor de estrogênio (ER), subtipos alfa e beta, para iniciarem a transcrição (KUIPER et al., 1998; NIKOV et al., 2000; YEARLEY et al., 2007). A constatação de que as isoflavonas possuem afinidades diferentes entre os dois tipos de receptores de estrogênio (alfa e beta), tendo uma maior afinidade pelos receptores do tipo β estrogênico, do que os receptores α , podendo assim agir seletivamente (SWEDENBORG et al., 2009), permite classificá-las como moduladores específicos dos receptores hormonais (SERMs) (OSEN et al., 2008; SETCHELL, 2001). Alguns fitoestrógenos, dentre eles os obtidos da soja, já se mostraram como alternativa válida para o tratamento dos sintomas da menopausa mostrando eficácia e segurança com seu uso (HAN et al., 2002).

Na maioria dos países em desenvolvimento, 70-80% da população ainda recorre às plantas de uso medicinal para seus cuidados de saúde primários. No Brasil, o uso de plantas medicinais é generalizado entre a população, devido à grande biodiversidade botânica existente no país. No entanto, esta biodiversidade ainda não foi totalmente elucidada, já que muitas espécies de plantas ainda permanecem sem investigação. Além disso, o uso generalizado dessas plantas exige uma avaliação dos riscos potenciais associados com o consumo (CALIXTO, 2000; DE ALBUQUERQUE et al., 2007). Esses produtos são utilizados para várias finalidades, sob diversas combinações (com medicamentos alopáticos, homeopáticos, entre outros), baseados exclusivamente em evidências históricas ou pessoais, onde geralmente não são atribuídos efeitos adversos (CALIXTO, 2000; FUNARI; FERRO, 2005).

O Brasil já dispõe de legislação própria sobre este assunto desde janeiro de 2000, a RDC 17, orientando seu uso e comercialização (BRASIL, 2000), e, a partir daí os programas de fitoterapia apoiados pelo serviço público de saúde se multiplicaram. No caso do emprego das plantas medicinais para a reposição hormonal, existem oito plantas com autorização de uso pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – *Glycine max* L. (Soja), *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz), *Linum usitatissimum* L. (Linhaça), *Trifolium pratense* L. (Trevo vermelho), *Dioscorea villosa* L. (Yam mexicano), *Vitex agnus-castus* L. (Vitex), *Cimicífuga racemosa* L. (Erva-de-São-Cristóvão) e

Angelica sinensis (Oliv.) Diels (Angélica) (MARÇAL, 2011). Dentre estas, a soja é a mais conhecida, por sua propriedade em aumentar a densidade óssea e o conteúdo mineral ósseo, além de diminuir os riscos de câncer de mama e endométrio (ARJMANDI, 1996; SHU, 2009; D'ANNA, 2009). O alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.), por exemplo, aumenta o estrogênio sérico e é um adoçante natural, podendo ser usado por diabéticos, acrescentando também a sua capacidade de se ligar fracamente aos receptores de estrógeno e progesterona (LIU, 2001). Além das espécies anteriormente descritas, é comum a menção popular ao uso de chá de folhas de amora (*Morus nigra* L.) para amenizar os sintomas do climatério, porém sobre esta atividade de *M. nigra* existem poucos estudos relatados na literatura (SOBRAFITO, 2010).

Portanto, o extrato das folhas de *Morus nigra* L., tradicionalmente utilizadas no Brasil por mulheres na menopausa, e que possui comprovada eficácia em doenças crônicas, como o diabetes (HEMMATI et al., 2010) e potente atividade antioxidante (ARFAN et al., 2012), surge neste contexto como uma alternativa em potencial para o tratamento dos sintomas da menopausa. Além disso, já foram relatados efeitos estrogênicos *in vivo* em outra espécie do gênero *Morus* – *Morus alba* L., cuja utilização em ratas induziu ao aumento significativo de estradiol (E₂) e progesterona (P₄) e redução de FSH e LH séricos, recuperando a atrofia uterina nos animais ovariectomizados (LU; MA; LIU, 2008; MA et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Climatério e Menopausa

O climatério é um período fisiológico amplo, caracterizado por mudanças endócrinas em função do declínio da atividade ovariana, mudanças biológicas pelo declínio da fertilidade, uma vez que a mulher passa do período reprodutivo para o não reprodutivo, e por mudanças clínicas consequentes às alterações do ciclo menstrual e de uma variedade de sintomas, que caracterizam a síndrome climatérica. Este período é compreendido entre 2 a 8 anos, antes e após a menopausa (MENOPAUSE AND POSTMENOPAUSE, 2004). Portanto, a menopausa é o marco desse período, representando apenas a data da última menstruação, ou seja, o último fluxo menstrual, considerado após 12

meses de amenorreia; sendo assim, um evento que ocorre dentro do climatério (WHO, 1981; TRENCH; SANTOS, 2005; CHEDRAUI et al., 2010).

O período do climatério compreende três fases, a pré, a peri e a pós-menopausa. Pré-menopausa inclui mulheres com mais de 40 anos com sangramento irregular, acompanhado ou não de sintomas (neurovegetativos, neuropsíquicos ou genitais). A perimenopausa corresponde ao período de transição e a pós-menopausa é definida como o período após a menopausa, que só começa após 12 meses de amenorréia espontânea e inclui mulheres em idade compatível com a menopausa natural, com ou sem sintomas (neurovegetativos, neuropsíquicos ou genitais, como o comprometimento do trofismo vaginal) (PROJETO DIRETRIZES, 2008; WEISMILLER, 2009).

A função reprodutiva normal da mulher envolve repetitivos ciclos de desenvolvimento folicular, ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo e regressão lútea. Este padrão de ciclos ovulatórios regulares é alcançado através da integração funcional e temporal precisa do hipotálamo, da hipófise e dos ovários, que são as glândulas (**Figura 01**). As funções do sistema reprodutivo feminino, de modo endócrino, é iniciada por secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) dos neurônios do hipotálamo no sistema portal da hipófise. O GnRH liga-se a receptores específicos na hipófise, através do qual estimula a síntese e secreção das gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). O FSH controla o desenvolvimento folicular e aromatização de precursores de andrógenos nas células da granulosa. O LH é necessário para a síntese desses andrógenos pelas células da teca no folículo em desenvolvimento e para a ovulação e manutenção do corpo lúteo. O estradiol e a inibina B são secretadas a partir de folículos em desenvolvimento, enquanto a progesterona, estradiol e inibina A são secretados a partir do corpo lúteo. A sinalização endócrina do ovário para o hipotálamo e a hipófise é fundamental para a função reprodutiva normal. A secreção de FSH é regulada por estradiol, inibina A e inibina B. O controle preciso de FSH é fundamental para o desenvolvimento do único oócito maduro que caracteriza os ciclos reprodutivos humanos. Além dos mecanismos de feedback negativo, o ciclo menstrual é único entre os sistemas endócrino em dependência de feedback positivo de estrogênio,

para produzir o pico de LH pré-ovulatório (**Figura 01**) (HALL, 2004; WEINBAUER et al., 2008; BRUCE; RYMER, 2009).

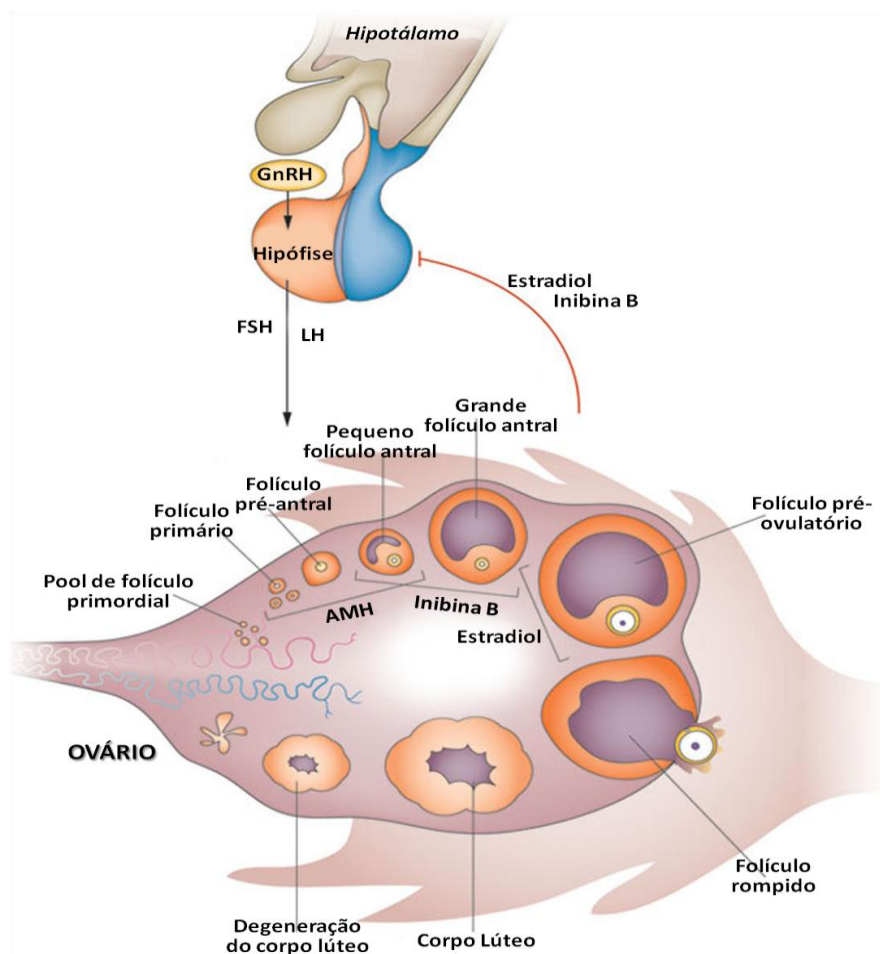


Figura 01. Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo feminino. Os folículos são continuamente recrutados a partir de um pool de folículos primordiais. O pool de folículos crescente começa a expressar o AMH e inibina B. Depois da puberdade, em cada novo ciclo, um número limitado de folículos é selecionado a partir deste grupo de pequenos folículos em crescimento sob a influência do FSH. A partir desses pequenos folículos em crescimento, um é selecionado para ser o dominante e ovular sob a influência de LH. A maioria dos folículos em crescimento são removidos por atresia, processo apoptótico controlado hormonalmente. Como consequência da diminuição contínua em folículos primordiais durante toda a vida reprodutiva, o número de folículos em crescimento também diminui. Subsequentemente, há um declínio dos níveis de inibina B e de estradiol, libertando o feedback negativo no hipotálamo e hipófise, o que resulta no aumento de FSH característico da menopausa e, em menor grau dos níveis de LH. AMH, hormônio anti-Mülleriano; FSH, hormônio folículo-estimulante; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante. **Fonte:** VISSER et al., 2011.

Os hormônios sexuais femininos importantes para a mulher são os estrógenos, a progesterona e a testosterona, sintetizados nos ovários, que são as glândulas sexuais que produzem os óvulos. O estrógeno é o principal

hormônio feminino e é responsável pelo revestimento endometrial, por estimular o tecido glandular mamário e deixar a parede vaginal mais densa (DEVOTO et al., 2009). Esse hormônio tem um papel essencial na composição óssea e acredita-se que se apresente como uma variável importante no sistema cardiovascular (ARMAS; RECKER, 2012; SZMUILOWICZ; MANSON; SEELY, 2011). A progesterona, que é produzida pelo ovário somente durante a segunda metade do ciclo menstrual, na fase lútea, prepara o revestimento do útero para que um óvulo possa ser implantado. Esse hormônio produz outros efeitos importantes em vários dos tecidos sensíveis ao estrógeno (DEVOTO et al., 2009; MIHM; GANGOOLY; MUTTUKRISHNA, 2011). A testosterona contribui para uma vida sexual saudável, desempenhando um papel no estímulo da libido, na motivação, no aumento da disposição e no desenvolvimento da massa muscular (WYLIE et al., 2010; ANDERSEN et al., 2011).

As células da granulosa dos folículos ovarianos e o corpo lúteo secretam vários outros peptídeos e hormônios, incluindo ativina, inibina, folistatina, hormônio anti-mülleriano (AMH), entre outros; alguns com efeitos de feedback sobre o hipotálamo e glândula pituitária. As inibinas são glicoproteínas da família do fator de crescimento $TGF\beta$ (fator de transformação do crescimento beta), produzidas, com destaque pelos ovários, testículos e placenta. As inibinas A e B são formadas por uma subunidade α , comum a ambas, e uma subunidade β , que pode ser do tipo βA (presente na inibina A) ou βB (presente na inibina B). Atuam fundamentalmente como antagonistas das ativinas, com quem compartilham grande homologia estrutural, uma vez que a subunidade proteica beta das inibinas é a mesma que se combina em homodímero para dar origem às ativinas (DOS REIS; DE REZENDE, 2009).

Na mulher, a principal fonte de inibina B são as células da granulosa de folículos em crescimento (TSIGKOU et al., 2008), o que faz da inibina B um marcador de atividade folicular e reserva ovariana, com níveis mais altos na fase folicular do ciclo menstrual, redução na perimenopausa, níveis mínimos ou indetectáveis na pós-menopausa (COBELLIS et al., 2002; SAMMEL et al., 2009) e elevação considerável em caso de tumor das células da granulosa (PETRAGLIA et al., 1998). Quanto à inibina A, suas fontes principais são o corpo lúteo e a placenta e, portanto, sua utilidade diagnóstica está ligada às

diversas disfunções placentárias, como as associadas a abortamento precoce, cromossomopatias e pré-eclâmpsia (TSIGKOU et al., 2008).

A ativina também é membro da superfamília $TGF\beta$, é o homodímero da inibina βA , sendo uma subunidade secretada pelos folículos. Tem sua concentração aumentada na segunda metade da fase lútea (MUTTUKRISHNA et al, 1996), diminuindo durante a fase folicular precoce, subindo então novamente durante o meio da fase folicular em conjunto com o estradiol e inibina A (MUTTUKRISHNA et al, 1996; MUTTUKRISHNA et al, 2000; MUTTUKRISHNA et al, 2002), participando da esteroidogênese (NI et al., 2000). A concentração de foliestatina, a proteína de ligação específica da ativina, não parece alterar ao longo do ciclo menstrual, e não há nenhuma evidência de um papel endócrino durante o ciclo (MUTTUKRISHNA et al., 2004).

Outra forma de determinar a função ovariana é pela dosagem do Hormônio Anti-Mülleriano (AMH), também chamado de Substância Inibidora Mülleriana (MIS), uma glicoproteína dimérica de 140 kilodaltons que sofre ativação após a clivagem e liberação dos fragmentos C-terminais (partículas biologicamente ativas). O AMH pertence à família do $TGF\beta$ e está envolvido em processos de crescimento e diferenciação; e por ser produzido por células dos ovários, permite estimar de forma indireta se a quantidade de óvulos disponíveis está acima, na média ou abaixo do esperado para a idade e, assim, tentar prever a longevidade reprodutiva (SOUTO et al., 2011). É um produto dos pequenos folículos pré-antrais e antrais, correlacionam-se positivamente com as concentrações de inibina B (FANCHIN et al., 2005), e, assim, diminui lentamente com a depleção folículo até que se tornem indetectáveis na menopausa (VAN ROOIJ et al., 2005).

Vários autores têm considerado o AMH como o marcador sérico mais fidedigno para a predição da reserva ovariana (VAN ROOIJ et al, 2002; TE VELDE; PEARSON, 2002; GRUIJTERS et al, 2003; FANCHIN et al, 2003; VISSER; THEMMEN, 2005). Adicionalmente, contrapondo-se ao FSH, inibina B e estradiol, o AMH apresenta, ainda, a vantagem da reduzida variabilidade de suas concentrações séricas ao longo do ciclo menstrual (FANCHIN et al, 2005; LA MARCA; VOLPE, 2006), o que lhe confere credibilidade, uniformidade na

avaliação e maleabilidade quanto ao momento de dosagem, ou seja, independente da fase do ciclo menstrual (LA MARCA et al, 2009).

Um declínio na fertilidade começa da terceira a quarta década de vida, mas acelera-se rapidamente após a idade de 35 anos, em associação com uma diminuição bem documentada de folículos ovarianos. Durante os primeiros estágios de envelhecimento reprodutivo, a fase folicular do ciclo menstrual reduz (MIRO et al., 2004); no início da fase folicular, ocorre aumento da concentração de FSH no plasma e diminui a de inibina (HALL, 2007). Com a progressão da transição da menopausa, o esgotamento folicular ovariano ocorre, o ovário torna-se menos sensível à estimulação de gonadotrofinas (FSH e LH), e um estado de hipoestrogenismo relativo começa a se estabelecer; a secreção de gonadotrofina é elevada em todo o ciclo menstrual; ciclos ovulatórios são menores, e segue irregularidade do ciclo menstrual. Uma vez que o folículo dominante produz a maior parte do estradiol circulante, a concentração de estradiol circulante cai drasticamente após a menopausa. Como resultado disto, a secreção de FSH e LH da hipófise anterior aumenta devido à falta de regulação por feedback negativo de estradiol. Isto dá origem ao estado de pós-menopausa caracterizado por hipogonadismo hipergonadotrófico (BRUCE; RYMER, 2009). Assim, a transição da menopausa tardia é caracterizada pela persistência endócrina de FSH elevado no plasma, sustentada irregularidade do ciclo menstrual, com períodos de amenorreia e hipoestrogenismo. Com o envelhecimento, concomitante com alterações na função reprodutiva há também diminuição dos níveis de vários outros hormônios que podem afetar o humor e o comportamento, incluindo os andrógenos (testosterona e androstenediona), dehidroepiandrosterona (DHEA) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1) que começam a declinar aos 20 anos atingindo o pico de declínio dos 40 aos 50 anos (COUZINET et al., 2001; DAVISON et al., 2005; FOGLE et al., 2007).

A principal forma de estrogênio circulante na mulher na pós-menopausa é a estrona, que é sintetizada pela conversão periférica da androstenediona (principalmente secretado pela glândula adrenal e a pequena quantidade a partir do ovário na pós-menopausa) no fígado e tecido adiposo (FOGLE et al., 2007; VIHMA; TIKKANEN, 2011).

Na fisiologia normal da mulher, o eixo reprodutivo feminino é o único que atinge um estado senescente enquanto outros órgãos do corpo são geralmente saudáveis. O processo de envelhecimento do sistema reprodutor começa com o esgotamento do oócito, que tem início antes do nascimento e termina com a menopausa, não sendo possível prever com precisão a idade cronológica, como a idade de início deste estágio, visto que varia muito entre as mulheres. Apesar de não haver divergência quanto ao conceito de que “o climatério representa a fase de transição da função reprodutiva normal para a falência ovariana completa”, há uma grande heterogeneidade quanto a sua duração, o que causa confusão quanto às terminologias usadas para este período. A OMS, por exemplo, considera o climatério como sendo o período compreendido entre a perimenopausa (dois a cinco anos antes da última menstruação) até um ano após o término dos ciclos menstruais (WHO, 1994); a “International Menopause Society” (IMS) estende este período até o início da terceira idade (65 anos) e a “North American Menopause Society” (NAMS) prefere a terminologia “transição menopausal” para caracterizar este período, sugerindo a abolição do termo climatério de publicações científicas (SOULES et al., 2001).

Desta forma, um sistema de estadiamento clínico foi criado com o objetivo de tornar possível uma melhor identificação do estágio em que uma mulher se encontra em seu processo de envelhecimento reprodutivo baseado em seus padrões de sangramento, que é um melhor preditor do que sua idade. O estadiamento é útil por várias razões, entre elas proporcionando um meio de atribuir os sintomas das mulheres durante este tempo para as mudanças da menopausa, a previsão de tempo para o período menstrual final e identificação de riscos à saúde. Agora, existem sintomas bem descritos que estão ligados a pontos específicos do tempo ao longo da transição da menopausa, validando o conceito de que as alterações do ciclo menstrual, juntamente com suas básicas alterações hormonais, são responsáveis pelos sintomas comuns da transição da menopausa (BUTLER; SANTORO, 2011).

O primeiro sistema de estadiamento de envelhecimento reprodutivo feminino (*STRAW*- Stages of Reproductive Aging Workshop) foi desenvolvido em Park City Utah em julho de 2001. Este sistema foi dividido em

7 estágios, que foram definidos usando o último período menstrual (UM) como ponto de referência e se baseando nas mudanças nos padrões do ciclo menstrual e nos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) (**Figura 02**). O último período menstrual (UM), considerado estágio 0, é a âncora dos estágios, que são numerados de -5 a 2. O intervalo de reprodução inclui estágios de -5 a -3. Na fase inicial de reprodução, estágio -5, os ciclos menstruais são variáveis a regulares e o FSH está dentro da faixa normal. Esse intervalo se refere ao período pós-menarca, antes de ciclos menstruais tornarem-se regulares após a menarca, o que demonstra considerável variação interindividual. Na fase de pico reprodutivo, estágio -4, os ciclos são regulares (a cada 25-35 dias) e FSH permanece normal e com duração de fase variável (SOULES et al., 2001).

**Última menstruação
(UM)**
0

ESTÁGIOS	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2
TERMINOLOGIA	Reprodutiva			Transição Menopausa			Pós-Menopausa	
	Precoce	Pico	Tardio	Precoce	Tardio*		Precoce*	Tardio
				Perimenopausa				
DURAÇÃO DO ESTÁGIO	Variável			Variável			(a) 1 ano	(b) 4 anos Até o fim
CICLO MENSTRUAL	Variável a regular	Regular		Duração de ciclo variável (> 7 dias)	≥2 ciclo pulados e um intervalo de amenorreia (≥60 dias)		Amenorreia x 12 meses	Nenhum
ENDÓCRINO	FSH normal		FSH ↑	FSH ↑			FSH ↑	

Figura 02. Sistema de estadiamento de envelhecimento reprodutivo feminino (*STRAW-Stages of Reproductive Aging Workshop*), Park City, Utah, USA- Julho de 2001. Fonte: BUTLER E SANTORO, 2011.

O final do período reprodutivo, estágio -3, abrange um período de ciclagem regular durante o qual a elevação do FSH, com tempo, começa a ocorrer, indicando bioquímica, mas não clinicamente o declínio da reserva ovariana. Algumas mulheres nesta fase final reprodutiva começam a sentir os sintomas geralmente associados com a perimenopausa, incluindo os vasomotores, sensibilidade mamária, insônia, enxaquecas e disforia pré-menstrual. A transição da menopausa começa quando uma mulher apresenta mudança em seu intervalo interciclo usual for maior que 7 dias, ou tiver um

período menstrual imperceptível. Ela é dividida em estágios precoces e tardios (-2 e -1). Elevações de FSH são maiores e mais propensos a serem mantidos ciclo a ciclo durante este tempo. Na transição precoce, a amenorreia é intermitente e relativamente pouco frequente. A transição final começa quando uma mulher apresenta ausência de pelo menos dois ciclos e experimenta, pelo menos, 60 dias de amenorreia.

A pós-menopausa é dividida em duas etapas e começa com a fase inicial, 1, definida como os primeiros cinco anos após o último período menstrual. Este período de tempo é dividido em **a** e **b**, com **a** sendo o primeiro ano de amenorreia e **b** sendo os próximos quatro anos. Este período é significativo por ser um momento onde os hormônios ovarianos sofrem declínio, com algumas flutuações intermitentes. É conhecido por ser um momento de perda óssea acelerada. Estádio 2, a fase tardia da pós-menopausa, começa cinco anos após o último período menstrual e continua até o fim da vida da mulher. O FSH permanece elevado em toda a pós-menopausa, embora durante longos períodos de tempo, eventualmente, o FSH possa diminuir (SOULES et al., 2001).

Uma estimativa de 75 a 85% de mulheres experimentam alguns ou todos os sintomas da menopausa (APPLING; PAEZ; ALLEN, 2007; MACLENNAN, 2009), incluindo distúrbios vasomotores (fogachos / suores noturnos), fadiga, perturbações do sono, distúrbios do humor, dificuldades cognitivas, dor musculoesquelética e cefaleia (JOFFE; SOARES; COHEN 2003; WARREN, 2007). Os sintomas geralmente começam, pelo menos, um ano antes da cessação do período menstrual e persistem por vários anos pós-menopausa. Os resultados de uma meta-análise, indicaram que aproximadamente 50% das mulheres continuam a experimentar sintomas vasomotores por um período de até 4 anos após a sua última menstruação (POLITI; SCHLEINITZ; COL, 2008). Aproximadamente 10 a 30% das mulheres na pós-menopausa continuarão a sentir os sintomas ao longo da vida; em sobreviventes de câncer de mama, os sintomas são muito mais frequentes ou severos, devido à hormonioterapia e quimioterapia que induz à menopausa (GUPTA et al., 2006; HUNTER et al., 2004). Os sintomas podem resultar em qualidade de vida significativamente reduzida e para alguns pode vir a ser debilitante (AVIS et al., 2009), o que leva cerca de

60% das mulheres a procurar tratamento médico (WILLIAMS et al., 2007). Além disso, tendo em vista que existem mais de 50 milhões de mulheres nos EUA com 50 anos ou mais de idade, pelo menos 1,5 milhões chegam à menopausa a cada ano; isto significa que, os encargos financeiros, sociais e psicológicos com esta população na menopausa são consideráveis (KJERULFF et al., 2007; UMLAND, 2008).

Muitas queixas no climatério, particularmente os fogachos (ondas de calor) e episódios de taquicardia estão intimamente ligados à hiperatividade de pulsos hipotalâmicos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em mulheres na pós-menopausa. Parece que a ausência de estrógenos causam a ativação fásica e sincrônica de neurônios GnRH que são secretados em quantidades tão altas que eles também estimulam outros neurônios hipotalâmicos reguladores da temperatura ou da função cardíaca. Portanto, um efeito desejável de substâncias estrogênicas é a redução da hiperatividade hipotalâmica, que deve resultar na diminuição dos níveis séricos médios de hormônio luteinizante (LH), e conseqüentemente, deve refletir na redução de queixas climatéricas (KREBS et al., 2004; GELLER; STUDEE, 2005).

Para a maioria das mulheres nessa fase, além dos sintomas como as ondas de calor, pode ocorrer ressecamento vaginal, alterações de humor, libido em declínio, insônia, letargia /fadiga, irritabilidade, ansiedade, depressão, palpitações no coração e dor nas articulações (KIRSTEN, 2008; BRUCE; RYMER, 2009). Adicionalmente, a deficiência de estrogênio também aumenta o risco de osteoporose (ARMAS; RECKER, 2012).

Ao contrário das ondas de calor e suores noturnos que se resolvem espontaneamente com o tempo, os sintomas afetando a atrofia vagina e do trato urinário inferior são frequentemente progressivos e frequentemente necessitam de tratamento. A prevalência de secura vaginal aumenta à medida que a mulher avança pelos anos da pós-menopausa, causando ardor, coceira e dispareunia, e a atividade sexual é muitas vezes comprometida. Isto ocorre porque o declínio nos níveis de estrogênio circulantes associados à transição da menopausa está intimamente correlacionado com a diminuição da flora vaginal normal “lactobacilos de *Döderlein*”, com o aumento do pH e com conseqüente aumento da colonização vaginal por enterobactérias; além de alterações da morfologia epitelial e redução do fluxo vaginal (BACHMANN;

NEVADUNSKY, 2000; CALLEJA-AGIUS; BRINCAT, 2009; STURDEE; PANAY, 2010).

O pH vaginal em mulheres na menopausa é menor que 4,5; refletindo ainda a produção de ácido láctico pelos lactobacilos, porém o pH aumenta para mais de 6,0 em mulheres na pós-menopausa, devido a uma redução na colonização da vagina por lactobacilos, que é secundário a uma diminuição de células superficiais e, portanto, de glicogênio. O epitélio vaginal, consequentemente, fica mais fino (CASTELO-BRANCO et al., 2005). Ou seja, o fato de o epitélio vaginal ser dependente de estrógeno, a indução da proliferação e cornificação epitelial, apresentam-se, neste caso, como um efeito estrogênico positivo, uma vez que os lactobacilos metabolizam o glicogênio armazenado nas células maduras para produzir ácido láctico, que por sua vez, mantém o meio vaginal ácido e, portanto, evitam infecções ascendentes (**Figura 03**) (CASTELO-BRANCO et al., 2005; HEINEMANN; REID, 2005).

E por estas razões, a vagina na pós-menopausa apresenta maior risco de contrair infecções e inflamações (CASTELO-BRANCO et al., 2005). O tratamento local da atrofia vaginal é justificado, uma vez que não está associado a possíveis riscos da TH sistêmica. O ressecamento vaginal pode ser melhorado por lubrificantes simples, mas o melhor tratamento e mais lógico para atrofia urogenital é a utilização de estrogênio local. Esta é uma prática segura, eficaz e com poucas contraindicações. A terapia estrogênica restaura os níveis normais de pH, a espessura e revasculariza o epitélio. O número de células superficiais é aumentada, e os sintomas existentes são aliviados. Portanto, o início da terapia, no momento da menopausa, pode prevenir o desenvolvimento de sintomas urogenitais (BALLAGH, 2005; LYNCH, 2009; ARCHER, 2010; STURDEE; PANAY, 2010).

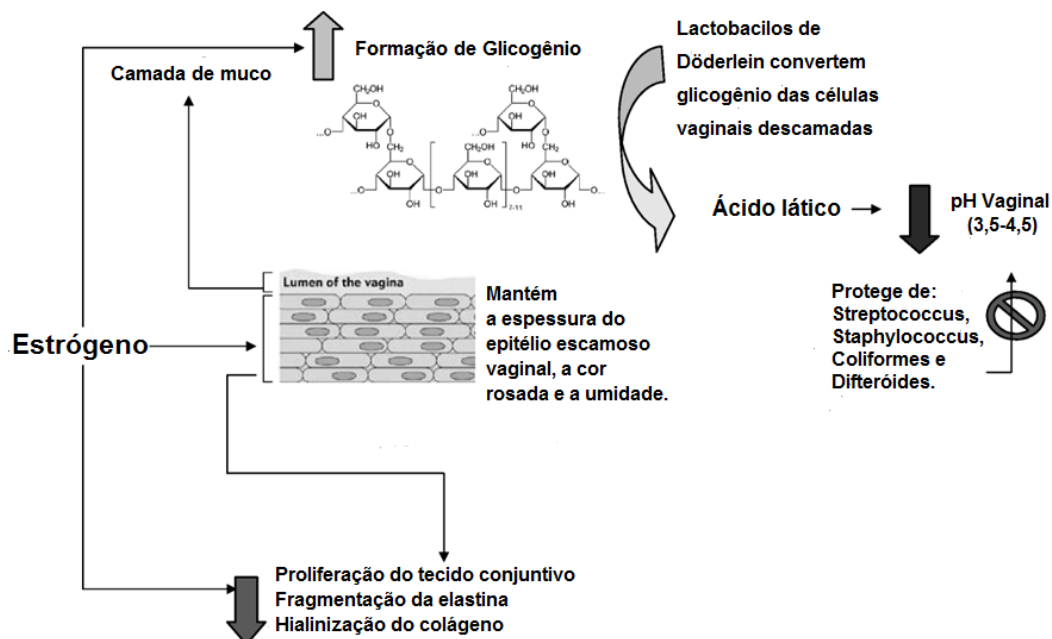


Figura 03. Representação esquemática dos efeitos do estrogênio no epitélio vaginal. Estrogênio promove a formação de glicogênio no epitélio escamoso. Lactobacilos de *Döderlein* fazem parte da flora vaginal normal, dependem do glicogênio como fonte de energia e convertem o glicogênio em ácido láctico, mantendo assim o pH vaginal ácido. O pH ácido serve para reduzir a infecção por patógenos. O estrogênio também ajuda a manter a espessura das multicamadas do epitélio escamoso vaginal, que confere a sua cor rosa normal e aspecto úmido. Ausência de estrogênio aumenta a proliferação do tecido conjuntivo, a elastina torna-se fragmentada, e o colágeno fica sujeito à hialinização. **Fonte:** ARCHER, 2010.

2.2 Terapia Hormonal (TH)

A terapia hormonal (TH) tem sido prescrita desde o início dos anos 1960 (SVEN, 2004) e o reconhecimento de que a perda de estrogênio na menopausa possui numerosos efeitos deletérios levou ao desenvolvimento da terapia hormonal na perimenopausa e pós-menopausa. Portanto, tradicionalmente a terapia hormonal substitutiva é a principal forma de tratamento da menopausa e pode proporcionar diversos benefícios para as mulheres, sobretudo na pós-menopausa, mostrando-se eficaz para aliviar os principais sintomas resultantes do hipoestrogenismo (GENAZZANI et al., 2002; LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010).

Na TH é imprescindível considerar os tipos de hormônios, as vias e esquemas de administração. A maioria das preparações utilizadas atualmente na TH contém uma associação de estrogênios e progestágenos. A TH incluindo o uso de estrogênios isolados é recomendada para pacientes histerectomizadas, ou associados a progestagênios, para aquelas com o útero, a fim de prevenir a hiperplasia endometrial e câncer secundária à estrogênio-terapia isolada (PINES, 2010; STURDEE; PINES, 2011; NAMS,

2012). Os estrógenos naturais, que são estradiol (E_2), estrona (E_1) e estriol (E_3), são amplamente utilizados na terapia de reposição hormonal. Já os sintéticos são mais utilizados em métodos contraceptivos. O estrógeno utilizado nessas preparações pode ser natural (estradiol, por exemplo), sintético, como dietilestilbestrol (DES), estrógenos contraceptivos (etinilestradiol) e antiestrogênicos, que geralmente são moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERM's) (KOMM, 2008; WATSON; JENG; GUPTARAK, 2011).

Os estrogênios promovem as características femininas, controle reprodutivo e gravidez, influenciam a pele, os ossos, sistema cardiovascular e imunidade. Os estrogênios endógenos, como o estradiol, têm em geral meia-vida curta, não se acumulam nos tecidos, são facilmente metabolizados no fígado e são mais potentes que qualquer estrogênio sintético (exceção feita ao dietilestilbestrol). Em contraste, drogas como etinilestradiol, dietilestilbestrol (DES), estrogênios ambientais sintéticos como hexaclorociclohexano, bifenóis policlorinados (PCBs), diclorodifeniltricloroetano (p'DDT) e fitoestrógenos (FE) como isoflavonas e lignanas são mais estáveis e têm uma meia-vida maior. Devido à característica lipofílica, tendem a se acumular na gordura e tecidos (TAPIERO; BA; TEW, 2002).

O estradiol é hormônio sexual pleiotrópico que regula muitos processos fisiológicos, não só no trato reprodutivo feminino, mas também nos outros órgãos, como o sistema nervoso central e sistemas esquelético. Suas funções são exercidas por meio dos receptores, de estrógenos α (RE_α) e β (RE_β) (KOEHLER et al., 2005). A distribuição tissular e a afinidade ao ligante são diferentes entre os subtipos de receptores. Alguns tecidos como útero, tecido mamário, vagina, rins e núcleo arqueado hipotalâmico expressam predominantemente RE_α , enquanto pulmão, ossos, trato urogenital, sistema cardiovascular, sistema imune, próstata, ovário, células da granulosa, e núcleo paraventricular hipotalâmico expressam predominantemente RE_β . Outros tecidos como tireóide e hipófise expressam ambos RE_β e RE_α (TANAKA et al., 2003; CORNWELL; COHICK; RASKIN, 2004; LIMER; SPEIRS, 2004).

Os estrogênios exercem seus efeitos fisiológicos de várias maneiras: ação rápida (não gênica) e ação lenta (gênica). Como os receptores estrogênicos, em sua grande maioria, encontram-se no núcleo, o mecanismo

de ação clássico se dá pela ligação do estrogênio aos seus receptores intracelulares, $RE\alpha$ e $RE\beta$ (tecido específico). Esses receptores pertencem a superfamília de receptores hormonais nucleares. Assim, o estrógeno ao entrar em contato com a célula-alvo, atravessa a membrana plasmática e interage com receptores intracelulares específicos, que resultará na formação de dímeros. Após esse processo de dimerização, esse complexo desloca-se para o núcleo, atravessando pelo poro nuclear, onde atua como cofator de transcrição ao interagir com regiões específicas do DNA, denominadas de “elementos responsivos aos estrogênios” (ERE), resultando, por fim, na regulação da expressão de genes-alvo. A ligação do complexo hormônio-receptor ao DNA pode estimular ou inibir as transcrições gênicas tecido dependente, aumentando os níveis de RNAm (NORMAN et al., 2004), que após o processo de tradução, caso não ocorra inibição, leva a formação de proteínas específicas. As proteínas estão relacionadas às respostas celulares e/ou ativação de cascatas enzimáticas, modificando a fisiologia celular. Este mecanismo genômico clássico se dá mais lentamente (NADAL et al., 2001; NORMAN et al., 2004; KOEHLER et al., 2005; HUANG; CHANDRA; RASTINEJAD, 2010).

Por outro lado, as ações iniciadas na membrana (mecanismo de ação não-genômico), geralmente acontecem mais rapidamente. Agindo através de um RE presente na superfície da membrana plasmática da célula, pode rapidamente iniciar uma cascata de sinais químicos (íons específicos, lipídios, nucleotídeos cíclicos, etc) (WATSON, 2003; WATSON, 2010). Recentemente, um receptor órfão acoplado à proteína G-(GPR30) foi relatado na membrana da célula por mediar a ação estrogênica de modo não-genômico e de rápida sinalização (REVANKAR et al. 2005, THOMAS et al. 2005). O GPR30 é estruturalmente não relacionado com $RE\alpha$ e $RE\beta$ e os efeitos rápidos de estimulação deste receptor incluem liberação de Ca^{2+} intracelular e a ativação subsequente de calmodulina-quinases cálcio dependentes ou ativação das vias MAP quinase e fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). Esta ação rápida está relacionada à vasodilatação imediata e a efeitos protetores diretos na função vascular (**Figura 04**). O efeito direto vasodilatador ocorre pela liberação de óxido nítrico, ação antagonista à da ativação do canal de cálcio e efeito proliferativo na musculatura lisa de parede vascular

(WAKATSUKI et al., 2003). Eles também podem ser sustentados pela reativação repetida e perpetuação da cascata de sinalização. Modificações pós-transducionais provocada pela sinalização não genômica pode ter uma variedade e multiplicidade de efeitos em moléculas funcionais (LEVIN, 2011).

A presença um anel fenólico e um segundo grupamento capaz de realizar pontes de hidrogênio, são características estruturais necessárias para a ligação dos estrógenos aos receptores $RE\alpha$ e $RE\beta$. Deste modo, qualquer composto que induza a dimerização do receptor, e subsequente ligação ao RE, pode ser considerado um estrógeno (SETCHELL; CASSIDY, 1999; LIMER; SPEIRS, 2004; CORNWELL; COHICK; RASKIN, 2004).

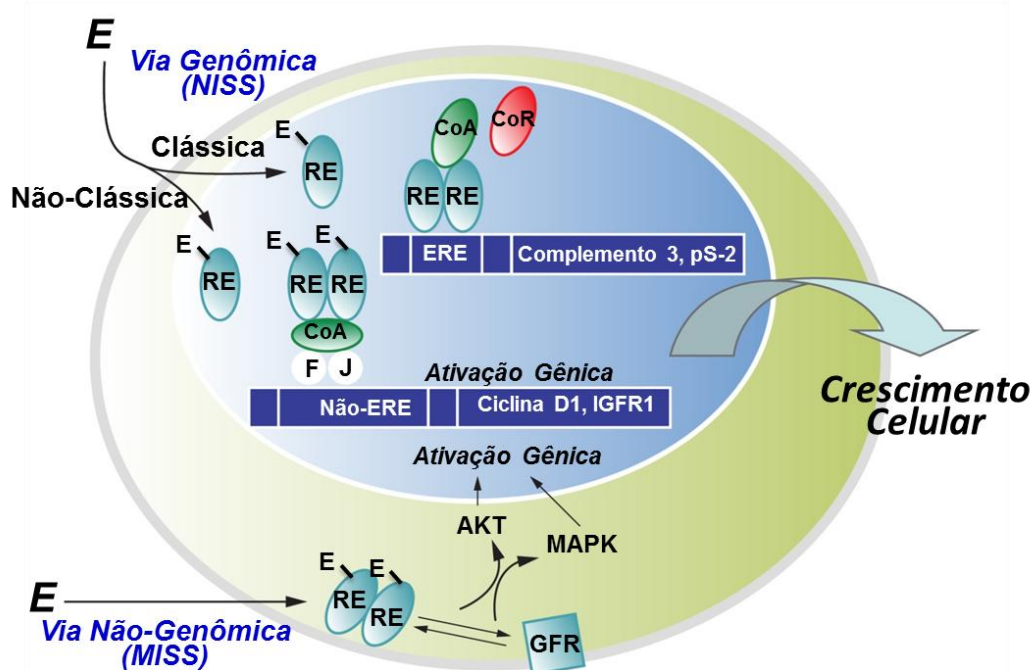


Figure 04. O receptor de estrógeno (RE) atua através de dois mecanismos diferentes: genômico e não-genômico. Sinalização esteróide iniciada no núcleo (NISS) e sinalização esteróide iniciada na membrana (MISS), via receptor de estrógeno (RE). Devido à sua natureza esteroidal, o estrogênio se difunde passivamente através da membrana citoplasmática e nuclear para ligar-se ao seu receptor nuclear. O RE ativado liga-se, tal como um dímero e na presença de coativadores (CoA), a uma sequência específica de DNA definida como elemento responsivo ao estrógeno (ERE) localizado no gene promotor regulado pelo estrogênio (via clássica), tais como o complemento 3 e pS-2. Alternativamente, o RE ativado liga-se a fatores de transcrição, tais como Fos (F) e Jun (J), que por sua vez, em ligação a sequências de DNA diferentes (por exemplo, AP-1), ativa outros genes estrogênio responsivos (via não-clássica), como ciclina D1 e receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR1). O estrogênio pode também se ligar a um receptor de membrana que coopera, como dímero, com os receptores do fator de crescimento (TGF) e ativa as vias de transdução de sinal da AKT/PKB (*protein kinase B*) e MAPK (*mitogen activated protein kinase*), levando à ativação de genes. **Fonte:** ZILLI et al., 2009.

No tecido adiposo, já é bem estabelecido a função do estradiol na sua regulação, atuando na redução do acúmulo de triglicérides e tendo efeito na redução da expressão da lipoproteína lipase (LPL), a enzima que catalisa a conversão de triglicérides em ácidos graxos e glicerol (HOMMA et al., 2000). Isto é ainda apoiada por observações epidemiológicas em que os níveis de triglicérides séricos aumentam em mulheres na pós-menopausa e que o nível de atividade da LPL é reduzida por tratamento de estrógeno (IVERIUS; BRUNZELL, 1988). Os esteróides sexuais além de influenciar o metabolismo lipídico podem alterar as apolipoproteínas, que constituem a parte protéica do sistema de transporte dos lipídios. No fígado, o estradiol regula a síntese de apolipoproteínas para VLDL e HDL. Reduz a síntese de apoB100 enquanto estimula a síntese de apoA1 e apoA2. No hepatócito, o estrógeno estimula a síntese de apoCIII enquanto diminui a síntese de lipase hepática. Portanto, estradiol através da regulação do metabolismo lipídico nos adipócitos e hepatócitos modula a concentração dos lipídios no plasma e a queda de seus níveis, na mulher pós-menopausada, incide em alterações do metabolismo lipídico (TIKKANEN et al., 2002).

A ação estrogênica na TH através do estímulo da síntese hepática de receptores de LDL (WAKATSUKI et al., 2003) diminui a concentração de colesterol total sanguíneo, de LDLcol, lipoproteína (a) e apolipoproteína B, e pode aumentar os níveis de HDLcol (WAKATSUKI et al., 2001).

O estrógeno pode também atenuar o processo inflamatório associado com a aterosclerose pela melhora da reconstituição da célula endotelial e inibição da proliferação de células musculares lisas em resposta à injúria vascular. Essas moléculas participam do recrutamento de leucócitos na superfície do endotélio e iniciam o processo aterosclerótico (FELETOU; VANHOUTTE, 2006).

Os progestágenos, também chamados de progestogênios ou gestagênios são hormônios com efeito similar ao da progesterona, o único progestágeno natural (SCHINDLER et al., 2008). Todos outros progestágenos são sintéticos e são, por vezes, chamados de progestinas. Os progestágenos têm a capacidade de mudar a mucosa uterina da fase proliferativa para a fase secretória. Seus efeitos dependem, entretanto, da dosagem e da fase do ciclo menstrual em que são administrados. A progesterona é um hormônio esteróide

produzido, a partir da puberdade, pelo corpo lúteo e pela placenta durante a gravidez. É o segundo hormônio feminino e é produzido principalmente no ovário. A progesterona age em todo o corpo físico e emocional da mulher preparando-a para a gravidez. É um hormônio essencial na manutenção da gravidez. A progesterona natural é pouco absorvida quando ingerida oralmente e vários progestágenos sintéticos têm sido desenvolvidos (MADAUSS; STEWART; WILLIAMS, 2007). Podem ser divididos em dois grupos: 1) pregnanos – derivados da 17α -hidroxiprogesterona, como o acetato de medroxiprogesterona (MPA), acetato de megestrol e acetato de ciproterona; 2) cestranos – derivados da 19-nortestosterona, como a nortestosterona e a levonorgestrona. Em geral, os pregnanos têm alta afinidade por receptores de progesterona, mínimo efeito estrogênico e atividade androgênica, enquanto os progestágenos derivados da nortestosterona possuem somente atividade androgênica (SCHINDLER et al., 2008). Os progestágenos apresentam ação protetora sobre o endométrio, evitando o aparecimento de lesões pré-malignas e diminuindo a incidência das malignas (CAMPAGNOLI et al., 2005). Os estrógenos associados aos progestágenos podem ser administrados mediante dois tipos de esquemas: cíclico ou contínuo. O esquema cíclico compreende a administração dos estrógenos entre 21 e 25 dias por mês, associados ao progestágenos nos 10 ou 14 últimos dias, sendo utilizado geralmente antes da menopausa ou nos primeiros anos após a menopausa, por que ocorrem menstruações ou metrorragias com maior frequência. O esquema contínuo compreende o uso ininterrupto de estrógenos associados ao progestágeno durante 10 a 14 dias mensais. Este esquema combinado é preferido no caso de não haver desejo de menstruações ou na pós-menopausa avançada (mais de cinco anos depois da menopausa) (SITRUK-WARE, 2008; SKOUBY; JESPERSEN, 2009).

Acredita-se que cerca de 50% das mulheres brasileiras acima dos 40 anos utilizem a TH para aliviar os sinais e sintomas do climatério. A TH, por sua vez, mostrou-se extremamente eficaz durante muitos anos (JEROME, 2004). Contudo, há relatos de ocorrência de efeitos adversos a longo prazo com o emprego da terapia estroprogestativa, em especial quanto ao aumento do risco de câncer mamário e do ovário (BARNET; FRIEDRICH, 2004; KERLIKOWSKE, 2010). Neste contexto, o estrogênio ativa a proliferação do epitélio mamário e

ovariano por aumentar a síntese de proteínas envolvidas com a mitose e a diferenciação celular (JORDAN, 2004). Semelhante ao que acontece nos osteoblastos, o estrogênio estimula a produção de fatores de crescimento como IGF-1 e do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em tumores de ovário e de mama, moléculas tumorogênicas envolvidas no avanço do câncer ginecológico e mamário, respectivamente (GRADY et al., 1995; FOURNIER et al., 2008). Tem sido mostrado também que grupos de mulheres, como as que usaram contraceptivos orais contendo dosagens elevadas de estrogênio e por longo período, apresentam altas taxas de incidência de tumores de mama (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT, 2001; WELNICKA et al., 2003). Consequentemente, acredita-se hoje que o tempo de exposição aos agentes estrogênicos seja um importante fator no desenvolvimento do câncer de mama. No caso dos cânceres de ovário, contudo, os dados relacionando exposição ao estrogênio são ainda muito controversos (CLEATOR; ASHWORTH, 2004; BARNET; FRIEDRICH, 2004).

Os hormônios femininos exógenos utilizados para contracepção ou para TH no climatério também estão associados a aumento de risco para tromboembolismo venoso (TEV), principalmente por provocarem alterações pró-coagulante na hemostasia. Este risco não é cumulativo e parece ser maior no primeiro ano de uso. A dose de estrogênio, o tipo de estrogênio e progestagênio utilizados, a via de administração hormonal e os fatores de risco hereditários para trombose venosa de cada paciente interferem no risco final para trombose venosa. O conhecimento dos efeitos na hemostasia inerentes a cada composto hormonal é essencial para uma prescrição adequada (VIEIRA, 2007).

A segurança da TH para as mulheres ficou abalada após a publicação parcial em julho/2002 e interrupção do estudo americano multicêntrico, duplo-cego, controlado com placebo e randomizado, realizado por pesquisadores do “Women’s Health Initiative” (WHI) que utilizaram esquemas de estrogênios equinos associados à medroxiprogesterona; e dois anos mais tarde, em março de 2004, um segundo ramo do estudo WHI que utilizavam apenas estrogênios. Este foi extensamente divulgado pela imprensa e por revistas médicas, provocando reações drásticas e imediatas por parte dos médicos e das

pacientes em relação à TH. Os riscos globais excediam os benefícios, havendo um aumento significativo do risco de doença arterial coronariana, de acidente vascular cerebral, de tromboembolismo venoso; um decréscimo significativo do risco de câncer de cólon e do risco total de fraturas e uma relação de risco quanto ao tempo de duração da terapia para o câncer de mama (WHI, 2002; WHI, 2004).

Outro estudo sobre a associação entre terapia hormonal e câncer de mama foi o *Million Women's Study* (MWS) realizado no Serviço Nacional de Saúde do Reino Unido, que também observou risco aumentado de câncer de mama, não somente nas usuárias de esquemas hormonais estro-progestagênico combinados contínuos, mas também nas usuárias de estrogênios isolados e de tibolona (GARNET et al., 2003).

O HERS (*Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study*), ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado, utilizando 2763 mulheres na menopausa e com cardiopatia coronária, com idade média de 66,7 anos, testou a utilização de 0,625 mg de estrógeno associado a 2,5 mg de progesterona em relação ao desenvolvimento de eventos cardíacos e não cardíacos. Ao final de 4 anos de seguimento, observou-se um aumento significativo de quase três vezes na taxa de eventos tromboembólicos venosos em relação ao placebo e o estudo mostrou um aumento de 50% no risco de doença cardiovascular no primeiro ano de acompanhamento (GRADY et al., 2000).

O estudo ERA (*Estrogen Replacement and Atherosclerosis*), apresentado pelo Colégio Americano de Cardiologistas, incluiu 309 mulheres com doença coronariana e avaliou a estenose arterial coronária antes e depois do tratamento com estrogênio ou estrogênio associado à progesterona comparado ao grupo placebo, durante 3,2 anos. Ocorreram 8 casos de TEV (5 no grupo usando apenas estrogênio, 2 no grupo com associação e 1 no grupo placebo), com um risco de 3,7 (95% IC; 0,45 – 30,4). O estudo mostrou não haver benefício em mulheres com DAC em terapia estrogênica (HERRINGTON et al., 2000).

Entretanto, como os resultados do WHI (2002) contradiziam aqueles anteriormente obtidos em estudos experimentais e observacionais (ADAMS et al., 1990; STAMPFER et al., 1991; GRODSTEIN et al., 2000), os quais

mostravam resultados cardiovasculares positivos com o uso da TH, os pesquisadores buscaram uma explicação lógica para este paradoxo, concluindo que as características da população avaliada nos estudos não seriam as ideais para se indicar o início da TH. Provavelmente em pacientes mais jovens, nas quais o início da TH precedeu a menopausa ou ocorreu nos primeiros anos após a menopausa (período conhecido como “janela de oportunidade”), a TH pode ter um efeito cardioprotetor (PINES et al., 2007). Isto porque nestas pacientes de idade próxima a da menopausa, há maior probabilidade de o endotélio estar saudável e o uso do estrogênio pode ser benéfico, reduzindo lesões precursoras de aterosclerose. Porém quando o endotélio está lesado (mais comum em pacientes mais velhas), o estrogênio pode deflagrar respostas trombogênicas, pró-inflamatórias e vasoconstritoras, afetando negativamente as placas ateromatosas estabelecidas (THE, 2006).

Portanto, embora TH convencional esteja disponível há mais de 6 décadas, as mulheres e mesmo os profissionais da saúde estão confusos pelas opiniões divergentes em relação aos riscos e benefícios da TH na menopausa, tanto estrogênica ou estro-progestagênica. Pois, o impacto desses estudos vem provocando mudanças em conceitos e gerando divergências entre os especialistas quanto ao tratamento ideal da mulher menopausada e intensificando a controvérsia risco *versus* benefício.

2.3 Terapia Alternativa/ Fitoestrógenos

Na busca de terapias alternativas à TH convencional com a finalidade de combater os sintomas indesejáveis da menopausa, porém apresentando menores efeitos colaterais quando utilizados por tempo prolongado (especialmente os cardiovasculares), relatados a partir dos grandes estudos prospectivos, como o HERS e WHI, tem havido um interesse crescente na medicina alternativa e complementar (CAM), principalmente no emprego dos fitoestrógenos (CARROLL, 2006; NELSON et al., 2006; BORRELLI; ERNST, 2010; MOLLA et al., 2011).

Os fitoestrógenos (FE's) são compostos derivados de plantas que, por causa de sua semelhança estrutural com os estrógenos de mamíferos, podem apresentar efeitos tanto estrogênicos quanto anti-estrogênicos. São polifenóis naturais, existindo em diferentes classes: flavonóis, como quercetina e kaempferol; flavonas, como apigenina; flavanonas, como naringenina;

cumarinas; chalconas; estilbenos, como resveratrol e isoflavonas, como genisteína, formononetina, biochanina A e daidzeína; cumestanos como o cumestrol; lignanas, como enterodiol e enterolactona (KRONENBERG; FUGHERMAN, 2002; JACQUOT et al., 2003) (**Figura 05**), que de acordo com estudos computacionais, estruturais e bioquímicos, fazem ligação com os receptores estrogênicos (subtipos alfa e beta) para iniciar a transcrição (NIKOV et al., 2000; YEARLEY et al., 2007). Como consequência, foi proposto que os FE's podem reduzir as queixas da síndrome do climatério como fogachos e osteoporose, em mulheres na menopausa, além de apresentarem uma ampla gama de efeitos benéficos para a saúde (CARUSI, 2000; LUKACZER et al., 2005). Dentre estes, estão os efeitos sobre as doenças cardiovasculares, cânceres dependentes de hormônios, bem como, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e vasodilatadores (CASSIDY et al., 2006; SACKS et al., 2006; ADLERCREUTZ, 2007; MORTENSEN et al., 2009).

As isoflavonas são os fitoestrógenos mais estudados e são uma subclasse dos flavonoides. A estrutura básica é o núcleo flavônico, composto de dois anéis benzênicos A e B, ligados por um anel heterocíclico pirânico C (RIMBACH et al., 2007). Essa estrutura é similar aos estrógenos e aos moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERMs). A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização (TAHARA, 2007). Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados (SIMÕES et al., 2004; HAVSTEEN, 2002; VEITCH; GRAYER, 2008). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas como as chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (VEITCH; GRAYER, 2008; BOOTS, 2008).

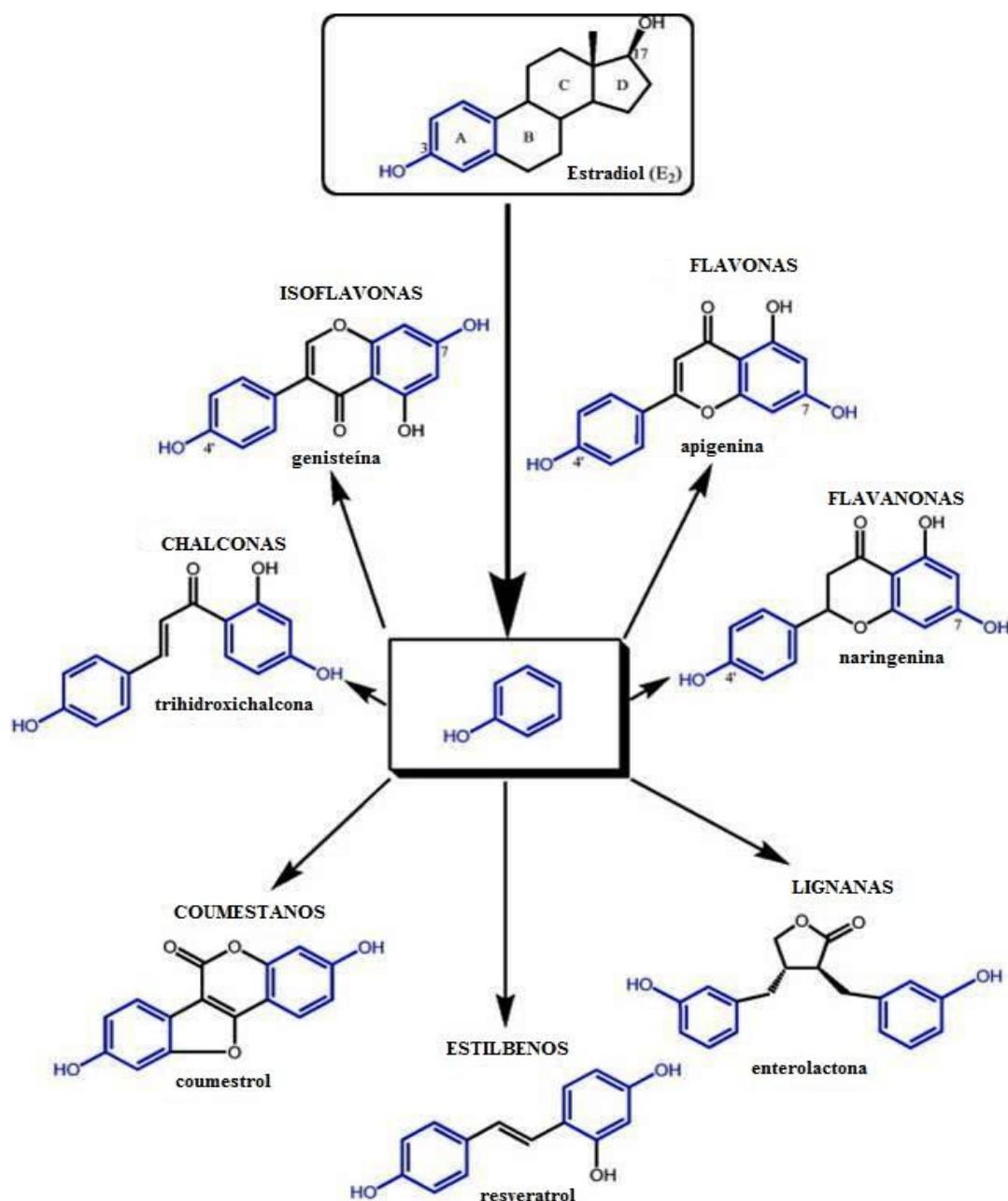


Figura 05. Estrutura química do Estradiol (E_2) e Fitoestrógenos (FE's). Os FE's de cada família são exemplificados pelo seu melhor representante. Os motivos fenólicos, que se referem ao farmacofórico de ligação ao receptor de estrogênio (RE), estão coloridos em azul. **Fonte:** LECLERCQ, 2010.

As isoflavonas são compostos químicos fenólicos, não esteróides, estruturalmente similares ao estrogênio natural, por apresentarem um anel fenólico com um radical hidroxila no carbono 3, estrutura que lhe confere a capacidade de ligação seletiva, de alta afinidade aos receptores estrogênicos (UNFER et al., 2004). Portanto, os derivados das isoflavonas são bioativos e possuem estrutura química semelhante ao 17β -estradiol, principal hormônio feminino (HAN et al., 2002; ANUPONGSANUGOOL et al., 2005). Possuem

efeito estrogênico ou antiestrogênico, dependendo da concentração dos mesmos, da concentração dos esteróides sexuais endógenos e do órgão-alvo específico envolvido na interação com os receptores estrogênicos. A existência de dois tipos de receptores estrogênicos, alfa e beta, confere especificidade dos diferentes órgãos-alvo aos fitoestrogênios (MORITO et al., 2002). São habitualmente encontradas na soja e em vários outros tipos de frutas, vegetais, grãos e legumes (DURANTI, 2006; FUGH-BERMAN et al., 2007).

O grupo das isoflavonas é constituído pela genisteína, daidzeína, gliciteína, biochanina A e formononetina (MINIELLO, 2003). Destas, a genisteína e a daidzeína são as que apresentam atividade estrogênica mais potente, sendo, portanto, utilizadas na maioria das pesquisas (LEPHART et al., 2002). As lignanas, enquanto fitoestrógenos, constituem uma classe de dímeros e oligômeros fenil-propanóides, representados pelo enterodiol e pela enterolactona, que derivam do secoisolariciresinol e matairesinol, ocorrendo principalmente em sementes de linhaça, pães de grão integral, morango (CORNWELL; COHICK; RASKIN, 2004). A quantidade de fitoestrógenos em qualquer planta varia consideravelmente com base no local de cultivo, época de colheita e condições de colheita, processamento e preparação. O metabolismo dos fitoestrogênios em seres humanos é complexa: uma vez ingerido, lignanas são transformados pela microflora intestinal e convertido ao hormônio compostos semelhantes, enquanto as isoflavonas (que estão presentes na soja na forma de glicosídeos) são inicialmente hidrolisados pela glucosidases das bactérias intestinais e, em seguida, metabolizado a conjugados glicuronídeos no intestino e fígado. Assim, a biodisponibilidade de fitoestrogênios depende da microflora intestinal (BORRELLI; ERNST, 2010).

Remédios à base de plantas são frequentemente usados por mulheres para o tratamento e alívio dos sintomas da menopausa. Na maioria dos países eles são regulamentados como suplementos dietéticos, e poucos estudos sobre sua eficácia para os sintomas da menopausa foram realizadas. Os principais medicamentos fitoterápicos utilizados para tratar os sintomas da menopausa são Cohosh preto (*Cimicifuga racemosa* L.), Lúpulo (*Humulus lupulus* L.), Inhame (*Dioscorea villosa* L.), Ginseng (*Panax ginseng*), Dong quai (*Angelica sinensis*), Óleo de prímula (*Oenothera biennis* L.), Erva de São João (*Hypericum perforatum* L.), Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), (BORRELLI;

ERNST, 2010); além de Kava (*Piper methysticum*), Vitex (*Vitex agnus castus*) e Valeriana (*Valeriana officinalis*) (GELLER; STUDEE, 2006).

Dentre esses fitoterápicos, a espécie *Cimicifuga racemosa* possui propriedades estrogênicas relevantes nos tratamentos de deficiência estrogênica, sendo um dos fitohormônios mais estudados. Segundo WUTTKE et al. (2003) e PANAY (2007), alivia os calores, a atrofia e o ressecamento vaginal, a palpitação e a ansiedade; age no hipotálamo reduzindo a pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), previne a osteoporose e a incontinência urinária, atuando de modo semelhante ao estriol, um derivado do estrogênio responsável pela lubrificação da vagina.

Acredita-se que os fitoestrógenos produzem alguns dos efeitos do estrogênio, porém, não seriam carcinogênicos. A genisteína, ao contrário, funciona como potente inibidor da oncogênese, pois inibe a tirosina quinase (PTK), o fator de crescimento epidérmico (EGF-R), as DNA topoisomerasas I e II, a quinase ribossômica S6, assim como a angiogênese e a diferenciação celular *in vivo*. Além disso, inibe a produção de radicais livres, modula o ciclo celular e, eventualmente, poderia estar envolvida com a ativação da apoptose (BARNES; PETERSON, 1995; BANERJEE; WANG; SARKAR, 2008).

Estudos epidemiológicos mostraram que mulheres que fazem dieta com alto teor de soja apresentam menos ondas de calor no climatério (MASKARINEC, 2003; KOH; LEE, 2007). Esse dado foi confirmado em estudos clínicos com produtos nutricionais (LUKACZER et al., 2005; LETHABY, 2007; IM, 2010) e também com isoflavonas isoladas (ASO, 2010). Numerosos estudos em animais e em humanos mostraram seus efeitos benéficos sobre a resistência à insulina, a lipídemia, o sistema circulatório e osso (BHATHENA; VELASQUEZ, 2002; BITTO et al., 2009; DENG, 2009; CAVALLINI et al., 2009; CEDERROTH; NEF, 2009; FERRETTI et al., 2010; GONZÁLEZ JIMÉNEZ et al., 2010; BAHLS et al., 2011).

Como antioxidantes, os FE's reduzem a oxidação de lipídios, prevenindo a arteriosclerose (SACKS et al., 2006; GRASSI et al., 2009). Em outubro de 1999, o órgão Food and Drug Administration (FDA) autorizou o anúncio em embalagens de alimentos à base de proteína de soja, que o produto diminui o risco de doença cardiovascular. A concessão baseou-se em estudos que

apontam que a adição de quantidade a partir de 25 g/dia desse composto (que contém cerca de 50mg de isoflavonas), associada a uma dieta pobre em gordura, levaria à redução do colesterol total e LDL (CLAPAUCH et al., 2002).

Nem todos os fitoestrógenos operam da mesma maneira. O resveratrol, por exemplo, é um fitoestrógeno de uvas presente no vinho tinto e se liga ao $RE\alpha$ e $RE\beta$ com afinidade similar, porém 7000 vezes inferior ao estradiol. Difere de outros fitoestrógenos que se liga com maior afinidade ao $RE\beta$ do que o $RE\alpha$. No entanto, resveratrol é um antagonista do $RE\alpha$, mas não do $RE\beta$ (BOWERS, 2000).

2.4 *Morus nigra* Linnaeus

A família *Moraceae*, comum nas regiões tropicais e subtropicais dos cinco continentes, subdivide-se em cerca de cinquenta a sessenta gêneros, os quais abrangem em torno de mil e quinhentas espécies, estando representada, no Brasil, por 27 gêneros com cerca de 250 espécies incluindo árvores, arbustos, ervas ou lianas, geralmente latescentes (SOUZA; LORENZI, 2008).

Dentre esses gêneros, destaca-se *Morus*, que é constituído de aproximadamente 24 espécies e uma subespécie, sendo descrito pelos menos 100 variedades (MACHII et al., 2000; TUTIN et al., 1996). Uma espécie muito popular desse gênero é *Morus nigra* L. (**Figura 06**), uma árvore dióica, glabra, caducifólia ou decídua, de 3-5 m de altura, com tronco revestido por casca fina, quase lisa, de cor acinzentada. Os ramos são mais ou menos horizontais com as extremidades pendentes, formando uma copa achatada em forma de guarda-chuva. Folhas são alternas, glabrescentes, longas, simples, ovais, de base obtusa a cordada, ápice agudo a acuminado, margem denteadas, e não lobada ou mais ou menos irregularmente lobada, de 8- 12 cm de comprimento x 5-9 cm de largura, pecíolo delgado, de 1,5- 3 cm, com duas estípulas linear-lanceoladas na base. Suas inflorescências são formadas entre julho e agosto, tanto as masculinas quanto as femininas, podendo ser do tipo racemo ou espiga e alongada (3-6 cm de comprimento). As flores são pequenas, esverdeadas, sésseis ou curtopediceladas, com sépalas ovais, côncavas internamente, de ápice ciliados e pétalas ausentes; flores pistiladas com 2 ou 3 sépalas que envolvem o ovário, 1 estilete com 2 estigmas, ovário unilocular com 1 óvulo; flores estaminadas com 4 sépalas e 4 estames opostos a estas.

Os frutos são múltiplos, formados pelas sépalas desenvolvidas; são cilíndricos, de superfície tuberculada, inicialmente vermelhos e pretos quando maduros, de 1-2cm de comprimento, de polpa carnosa e agri-doce (PARANI, 1993; LORENZI, 2003).



Figura 06. Folhas e frutos da espécie *Morus nigra* L (amora). Fonte: MRKVICKA, 2004.

A espécie *Morus nigra* L., é conhecida, não somente pelos valores nutricionais de seus frutos, as amoras, como também por conter vários compostos com ação terapêutica, tanto em seus frutos, como também em outras partes dessa planta. *Morus nigra* L. é conhecida popularmente como amoreira-negra, amoreira ou amora-preta, e é uma espécie vegetal que tem sua origem na Ásia, frutificando com maior intensidade e abundância, sobretudo na Ásia Menor e estando plenamente aclimatizada no Brasil (CRUZ, 1979; KHARE, 2007).

Sistemática botânica de *Morus nigra* L. (Interagency Taxonomic Information System – ITIS, 2010):

Reino: Plantae

- Filo: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Urticales

- Família: Moraceae
- Gênero: *Morus* L.
- Espécie: *Morus nigra* L.
- Nome comum: black mulberry (inglês), amora ou amora-preta (português).

Na medicina tradicional popular as folhas da amoreira-preta têm sido indicadas para mulheres durante a menopausa, como terapia de reposição hormonal; é utilizada também com frequência como adstringente suave, antiinflamatória, antioxidante, antisséptica, calmante, cicatrizante, depurativa, diurética, emoliente, expectorante, hipoglicêmica, anti-helmíntica e hipotensora, além de ser indicada para hipercolesterolemia (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; KHARE, 2007).

No Brasil, o chá de folhas de amora é largamente empregado na medicina tradicional como repositor hormonal por ocasião da menopausa a fim de aliviar os sintomas, principalmente os fogachos, que ocorrem neste período, além da cefaleia e irritação que ocorrem no período pré-menstrual. Os resultados obtidos da pesquisa etnofarmacológica confirmam a utilização de *M. nigra* L. no tratamento de sintomas do climatério, com apreciável consenso de uso popular (maior que 50%), podendo constituir um potencial produto natural medicinal para estudos químicos e farmacológicos, especialmente como fonte de substâncias com atividade estrogênica (MIRANDA et al., 2010).

Estudos farmacológicos pré-clínicos, mostraram que o extrato diclorometano das folhas de *M. nigra* apresenta atividade antinociceptiva em camundongos, em modelos clássicos de dor como testes da formalina, placa quente, imersão da cauda, bem como nas contorções induzidas por ácido acético (DE MESQUITA et al., 2009). O extrato hidroalcoólico 50% das folhas de *M. nigra* apresentou significativo efeito antiinflamatório por reduzir o edema de pata induzido por carragenina e por inibir a formação de tecido granulomatoso em ratos, sendo associado a este efeito a presença de compostos como o ácido betulínico, β -sitosterol e germanicol, isolados do extrato (PADILHA et al., 2010). O prenilflavonóide “morusina”, substância isolada da casca da raiz de *Morus nigra*, foi associada com a atividade

antinociceptiva ou analgésica apresentada por essa espécie, sendo esse efeito relacionado a sua participação no sistema opióide (DE SOUZA et al., 2000).

O efeito hipoglicemiante da amora vem sendo extensivamente pesquisado. Extrato alcoólico das folhas de *Morus nigra* reduziu a glicose sérica em ratos nos quais o diabetes foi induzido experimentalmente, mas não teve ação em ratos normoglicêmicos. Além disso, este extrato não alterou os níveis de insulina em ambos os grupos de animais (ORYAN et al. 2003). Volpato et al. (2005) descreveram o efeito hipoglicêmico do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra*, porém não conseguiu reduzir os níveis de glicose nos animais com diabetes induzido tratados com amora-preta em seu estudo, o que atribui à baixa concentração da dose utilizada. Recentemente, Volpato et al. (2011) verificaram que o tratamento com o extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* em ratos diabéticos e não diabéticos não altera os níveis de glicose; por outro lado, em ratos diabéticos, *M. nigra* apresentou atividade antioxidante, por reduzir *malonaldeído* (MDA), produto final da peroxidação lipídica, além de diminuir as concentrações de triglicérides, colesterol e da fração VLDL.

Diferentes extratos da fruta de *Morus nigra* como o suco, extratos hidroalcoólico e polifenólico apresentaram ação protetora contra danos oxidativos, por inibir glicosilação de hemoglobina, a hemólise de eritrócitos induzida por peróxidos de hidrogênio, o dano à membrana do hepatócito e a oxidação de LDL *in vitro* (NADERI et al. 2004). Também em relação ao efeito anti-hiperglicêmico de *Morus nigra* L. foi mostrado em preparações herbais com outras plantas (patente No. P-9801091; Zagreb Croatia), diminuição significativa dos níveis de glicose e frutossamina em camundongos diabéticos não-obesos induzido por aloxano e tratados com os extratos (PETLEVSKI et al., 2001). Por outro lado, o tratamento oral subcrônico com o extrato aquoso das folhas de *Morus nigra*, não só confirmou o efeito hipoglicemiante do extrato, como também produziu efeitos tóxicos renais e hepáticos em camundongos (HEMMATI et al., 2010).

Diferentes grupos de compostos químicos têm sido identificados no gênero *Morus*, como os alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos e esteroides (FUKAI; KAITOU; TERADA, 2005).

Segundo NAKAMURA et al. (2003), os frutos de *Morus* contêm compostos fenólicos que apresentaram amplo espectro de atividade bioquímica, tais como propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas bem como a capacidade de modificar a expressão gênica. Ercisli (2007), por exemplo, estudando o fruto de três espécies de amoras, *M. alba*, *M. rubra* e *M. nigra*, demonstrou que a amora-preta apresenta maior conteúdo fenólico e flavonoídico que as demais; além de ácidos graxos, como ácido linoleico, palmítico e oleico. A atividade antioxidante do fruto de genótipos diferentes de *M. nigra* variou entre 63% e 76%. Quanto ao conteúdo de ácidos orgânicos, o ácido málico foi o mais predominante (123-218 mg/g), seguido do ácido cítrico (21-41mg/g) (ERCISLIS; ORHAN, 2008). A análise das frutas de *M. nigra* revelou alto teor de compostos fenólicos e de antocianinas (ÖZGENA; SERÇEB; KAYAC, 2009). Os teores de antocianinas totais em frutas de amoreira estão correlacionados com suas atividades antioxidantes (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2008). Outros estudos também traçaram o perfil fenólico e a atividade antioxidante dos frutos de *Morus nigra*. Os compostos fenólicos antioxidantes foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplado a um espectro de massa, sendo possível identificar duas antocianinas (cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinoside), dois flavonoides (quercetina 3-glicosídeo e rutina), juntamente com ácido caféico e outros derivados do ácido elágico (PÉREZ-GREGORIO et al., 2011). A ação antioxidante do extrato metanólico (80%) das frutas foi verificada por meio da capacidade de sequestro do radical DPPH e por diminuir a formação de lipopolissacarídeos (LPO). Nas análises realizadas em cromatografia líquida (HPLC), determinou-se que os compostos polifenólicos presentes nos extratos de frutas são rutina, resveratol, miricetina e naringerina (AYDIN; YILMAZ; GOKCE, 2011).

Estudos também revelaram o alto valor nutricional dos frutos das amoras. *Morus Alba*, *Morus nigra* e *Morus rubra* foram avaliadas quanto seu conteúdo fenólico, de açúcar, vitamina C e atividade antioxidante de suas frutas. O ácido orgânico predominante nessas espécies foi o ácido málico, seguido de ácido cítrico. O ácido clorogênico e a rutina foram determinados como os principais constituintes fenólicos, provavelmente responsáveis pela maior atividade antioxidante de *Morus nigra* (GUNDOGDU et al., 2011).

O extrato da casca do caule de *Morus nigra* apresentou forte atividade sequestradora de radicais livres. Também foi identificado nesta parte da planta compostos fenólicos e antocianidinas (SÝVACÝ; SÖKMEN, 2004). Além destas, foram isolados e identificados nove compostos fenólicos, como o ácido olcancólico, apigenina, ciclocomunol, morusina, ciclomorusina, kuanon, daucosterol, ácido ursólico e sitosterol (WANG, 2007). Wang (2008), também isolou a partir da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico da casca do caule de *Morus nigra*, três novos compostos, dois flavonoides prenilados e um benzofurano (Morunigrol). Em 2009, Wang (2009) isolou dois novos prenilflavonoides de *M. nigra*, mornigrol E e F, elucidados com base nos métodos espectroscópicos, principalmente nas técnicas de RMN- 2D. Outros estudos com a casca e folhas de *M. nigra* obtiveram-se compostos como, oxyresveratrol estilbenoide, 2-arilbenzofurano moracina M, quatro flavonoides isoprenilados, dois triterpenos e uma saponina esteroidal. Os compostos fenólicos apresentaram moderada atividade antioxidante e propriedades antibacterianas (MAZIMBA et al., 2011).

Morniga G, uma lectina relacionada à jacalina, foi purificada a partir de casca do caule de *M. nigra* usando uma combinação de cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (VAN DAMME et al., 2002). A identificação de Morniga G e Morniga M é de grande interesse porque mostra que a casca da amoreira-preta é uma rica fonte de duas lectinas com propriedades de ligação à carboidratos (galactose, manose e glicose) e provavelmente de atividades biológicas (ROUGE et al., 2003). Entre os glicanos naturais testados para lectina, Morniga G foi o que melhor reagiu com glicoproteínas (gps), apresentando uma alta densidade de antígenos tumorais Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) e T α (Gal β 1-3GalNAc α 1) associados à carboidratos (SINGH et al., 2007).

A partir do extrato etanólico (95%) da raiz de *M. nigra* foi obtido um novo composto, 5'- geranil - 5, 7, 2', 4'- tetrahydroxyflavone e mais 28 compostos fenólicos já conhecidos. Suas estruturas foram identificadas por espectrometria de massa e espectroscopia de RNM. Nove compostos, 5'- geranil -5, 7, 2', 4'- tetrahydroxyflavone; steppogenina -7- O- β - D- glicosídeo; 2, 4, 2' 4' - tetrahidroxichalcona, moracina N, kuwanon H, mulberrofurano G, morachalcona A, oxyresveratrol -3'- O- β - d- glicopiranosídeo e oxyresveratrol-2-O- β -d

glicopiranosídeo, mostraram melhor atividade como inibidores da tirosinase do que o ácido kójico, potente agente antioxidante e antitumoral (ZHENG et al., 2010).

Recentemente foi relatado também que o óleo da semente de *Morus nigra* deve ser considerado como fonte de ácidos graxos essenciais α - tocoferol e esteróis que são essenciais para a prevenção de doenças cardiovasculares (GECGEL, 2011).

Neste contexto, na medicina tradicional, apesar de poucas comprovações científicas, o uso de plantas com efeito estrogênico tem sido uma prática comum (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002) e, dentre as espécies vegetais mais empregadas encontra-se a amoreira (*Morus nigra* L), utilizada na forma de chá das folhas para aliviar sintomas do climatério, principalmente os fogachos, que são as ondas de calor, uma das principais queixas das mulheres menopausada. Pelos relatos na literatura, estes efeitos podem estar relacionados à presença de constituintes flavonoídicos, especialmente as isoflavonas, que apresentam atividade estrogênica (NOTELOVITZ, 1989).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do extrato das folhas de *Morus nigra* L. como terapia de reposição hormonal em ratas ovariectomizadas.

3. Específicos

CAPÍTULO I

- Avaliar a ação dos extratos em modelo experimental de hipoestrogenismo.
- Investigar o efeito dos extratos nos tecidos uterinos e vaginal de ratas ovariectomizadas.
- Determinar a toxicidade e a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L.

CAPÍTULO II

- Avaliar o efeito crônico do extrato no tecido mamário de ratas ovariectomizadas.
- Avaliar o potencial fitoestrogênica *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *M. nigra* e de suas frações em ensaios de proliferação com células MCF-7.
- Identificar os constituintes químicos presentes no extrato hidroalcoólico, por meio do método de LC-MS/MS.

CAPÍTULO III

- Reunir e analisar dados que validem a atividade fitoestrogênica dos extratos vegetais ativos que possibilitem o depósito de patente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; KAPLAN, J. R.; MANUCK, S. B.; KORITNIK, D. R.; PARKS, J. S.; WOLFE, M. S.; CLARKSON, T. B. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 10: 1051-1057, 1990.
- ADLERCREUTZ, H. Lignans and Human Health. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 44: 483-525, 2007.
- AGWU, U. M.; UMEORA, O. U. J.; EJIKEME, B. N. Patterns of menopausal symptoms and adaptive ability in a rural population in south-east Nigeria. **Journal of Obstetrics & Gynaecology**, 28: 217-221, 2008.
- ANUPONGSANUGOOL, E.; TEEKACHUNHATEAN, S.; ROJANASTHIEN, N.; PONGSATHA, S.; SANGDEE, C. Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. **BMC Clinical Pharmacology**, 2005.
- ANDERSEN, M. L.; ALVARENGA, T. F.; MAZARO-COSTA, R.; HACHUL, H. C.; TUFIK, S. The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. **Brain Research**, 1416: 80-104, 2011.
- APPLING, S.; PAEZ, K.; ALLEN, J. Ethnicity and vasomotor symptoms in postmenopausal women. **Journal of Womens's Health**, 16: 1130-8, 2007.
- ARJMANDI, B. H. et al. Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. **The Journal of Nutrition**, 126: 161-167, 1996.
- ARMAS, L. A. G.; RECKER, R. R. Pathophysiology of Osteoporosis: New Mechanistic Insights. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**: In Press, 2012.
- ARMSTRONG, K. et al. Hormone Replacement Therapy and Life Expectancy After Prophylactic Oophorectomy in Women With BRCA1/2 Mutations: A Decision Analysis. **Journal of Clinical Oncology**, 22: 1045-1054, 2004.
- ARCHER, D. F. Efficacy and tolerability of local estrogen therapy for urogenital atrophy. **Menopause**, 17: 194-203, 2010.
- ARFAN, M. et al. Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. **Int J Mol Sci**, 13: 2472-80, 2012.
- ASO, T. Equol Improves Menopausal Symptoms in Japanese Women. **The Journal of Nutrition**, 140: 1386S-1389S, 2010.
- AVIS, N. E.; COLVIN, A.; BROMBERGER, J. T.; HESS, R.; MATTHEWS, K. A.; ORY, M.; SCHOCKEN, M. Change in health-related quality of life over the menopausal transition in a multiethnic cohort of middle-aged women: Study of Women's Health Across the Nation. **Menopause**, 16: 860-9, 2009.
- AYDIN, S.; YILMAZ, Ö.; GOKCE, Z. Effectiveness of matured Morus nigra L. (black mulberry) fruit extract on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH•) and hydroxyl (OH•) radicals as compared to less matured fruit extract. **African Journal of Biotechnology**, 10: 16037-44, 2011.

BACHMANN, G. A.; NEVADUNSKY, N. S. Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis. **Am Fam Physician**, 61: 3090-6, 2000.

BALLAGH, S. A. Vaginal Hormone Therapy for Urogenital and Menopausal Symptoms. **Semin Reprod Med**, 23: 126,140, 2005.

BANERJEE, S.; LI, Y.; WANG, Z.; SARKAR, F. H. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. **Cancer Letters**, 269: 226-242, 2008.

BARNES, S.; PETERSON, T. G. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. **Proc Soc Exp Biol Med**, 208: 103-8, 1995.

BARRET-CONNOR, E.; BUSH, T. I. Estrogen and coronary heart disease in women. **JAMA**, 265:1861-7, 1991.

BAHLS, L. D.; VENTURINI, D.; SCRIPES, N. D. A.; LOZOVY, M. A. B.; SIMÃO, T. N. C.; SIMÃO, A. N. C.; DICH, I.; MORIMOTO, H. K. Avaliação do consumo de uma baixa quantidade diária de soja no estresse oxidativo, no perfil lipídico e inflamatório e na resistência à insulina em pacientes com síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 55: 399-405, 2011.

BELKIS, T.; SANTOS, C. G. Menopausa ou menopausas? **Saúde Soc.**, 1: 91-100. 2005.

BHATHENA, S. J.; VELASQUEZ, M. T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 76: 1191-1201, 2002.

BITTO, A.; ALTAVILLA, D.; BONAIUTO, A.; POLITO, F.; MINUTOLI, L.; DI STEFANO, V.; GIULIANI, D.; GUARINI, S.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F. Effects of aglycone genistein in a rat experimental model of postmenopausal metabolic syndrome. **J Endocrinol**, 200: 367-76, 2009.

BORRELLI, F.; ERNST, E. Alternative and complementary therapies for the menopause. **Maturitas**, 66: 333-343, 2010.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, 585: 325-337, 2008.

BOWERS, J. L.; TYULMENKOV, V. V.; JERNIGAN, S. C.; KLINGE, C. M. Resveratrol Acts as a Mixed Agonist/Antagonist for Estrogen Receptors α and β . **Endocrinology**, 141: 3657-3667, 2000.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17** de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico visando normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária. Diário Oficial da União 25 Fev 2000; Seção 1: 25.

BRODY, J. A. et al. Reproductive longevity and increased life expectancy. **Age and Ageing**, v. 29, n. 1, p. 75-78, 2000.

BRUCE, D.; RYMER, J. Symptoms of the menopause. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 23: 25-32, 2009.

BUTLER, L.; SANTORO, N. The reproductive endocrinology of the menopausal transition. **Steroids**, 76: 627-635, 2011.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents), **Braz. J. Med. Biol. Res.** **33**: 179–189, 2000.

CALLEJA-AGIUS, J.; BRINCAT, M. P. Urogenital atrophy. **Climacteric**, 12: 279-285, 2009.

CAMPAGNOLI, C.; CLAVEL-CHAPELON, F.; KAAKS, R.; PERIS, C.; BERRINO, F. Progestins and progesterone in hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 96: 95-108, 2005.

CARROLL, D. G. Nonhormonal therapies for hot flashes in menopause. **Am Fam Physician**, 73: 457-64, 2006.

CARUSI, D. Phytoestrogens as hormone replacement therapy: An evidence-based approach. **Primary Care Update for Ob/Gyns**, 7: 253-259, 2000.

CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; NIELSEN, I. L.; HALL, W.; WILLIAMSON, G.; TETENS, I.; ATKINS, S.; CROSS, H.; MANIOS, Y.; WOLK, A.; STEINER, C.; BRANCA, F. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. **Proceedings of the Nutrition Society**, 65: 76-92, 2006.

CASTELO-BRANCO, C.; CANCELO, M. J.; VILLERO, J.; NOHALES, F.; JULIÁ, M. D. Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. **Maturitas**, 52: 46-52, 2005.

CAVALLINI, D.; ABDALLA, D.; VENDRAMINI, R.; BEDANI, R.; BOMDESPACHO, L.; PAULY-SILVEIRA, N.; DE VALDEZ, G.; ROSSI, E. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, 8: 40, 2009.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 304: 30-42, 2009.

CHEDRAUI, P. et al. Perceived control over menopausal hot flushes in mid-aged women. **Gynecol Endocrinol**, 26: 607-11, 2010.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 46: 679-695, 2002.

COBELLIS, L.; LUISI, S.; PEZZANI, I.; REIS, F. M.; DE LEO, V.; PETRAGLIA, F. Serum inhibin A, inhibin B, and pro- Î±C levels are altered after surgically or pharmacologically induced menopause. **Fertility and sterility**, 77: 745-749, 2002.

CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry**, 65: 995-1016, 2004.

COUZINET, B.; MEDURI, G.; LECCE, M. G.; YOUNG, J.; BRAILLY, S.; LOOSFELT, H.; MILGROM, E.; SCHAISON, G. The Postmenopausal Ovary Is Not a Major Androgen-Producing Gland. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 86: 5060-5066, 2001.

CRUZ, G. L. Dicionário de plantas úteis no Brasil. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 599 p. 1979.

D'ANNA, R. et al. Effects of the phytoestrogen genistein on hot flushes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Menopause**, 16: 301-6, 2009.

DAVISON, S. L.; BELL, R.; DONATH, S.; MONTALTO, J. G.; DAVIS, S. R. Androgen Levels in Adult Females: Changes with Age, Menopause, and Oophorectomy. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 90: 3847-3853, 2005.

DE LORENZI, D. R. S. et al. Assistência à mulher climatérica: novos paradigmas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 62: 287-293, 2009.

DEVOTO, L.; FUENTES, A.; KOHEN, P.; CÉSPEDES, P.; PALOMINO, A.; POMMER, R.; MUÑOZ, A.; STRAUSS III, J. F. The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. **Fertility and sterility**, 92: 1067-1079, 2009.

DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 110: 76-91, 2007.

DENG, R. Food and food supplements with hypocholesterolemic effects. **Recent Pat Food Nutr Agric**, 1: 15-24, 2009.

DE MESQUITA PADILHA, M.; VILELA, F. C.; DA SILVA, M. J.; DOS SANTOS, M. H.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. **J Med Food**, 12: 1381-5, 2009.

DE SOUZA, M. M.; BITTAR, M.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; MESSANA, I.; DELLE MONACHE, F.; FERRARI, F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. **Z Naturforsch C**, 55: 256-60, 2000.

DOS REIS, F. M.; DE REZENDE, C. P. Aplicações das dosagens de inibinas em Ginecologia e Obstetrícia. **Rev bras ginecol obstet**. DOENCAS DOS GENITAIS FEMININOS. /DIAGNOSTICO. COMPLICACOES NA GRAVIDEZ. /SANGUE. /PATOLOGIA. 2009

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, 77: 67-82, 2006.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1380-1384, 2007.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, 116: 41-46, 2008.

FANCHIN, R.; SCHONÄUER, L. M.; RIGHINI, C.; GUIBOURDENCHE, J.; FRYDMAN, R.; TAIEB, J. Serum antimüllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. **Human Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 323-327, 2003.

FANCHIN, R.; TAIEB, J.; LOZANO, D. H. M.; DUCOT, B.; FRYDMAN, R.; BOUYER, J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Human Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 923-927, 2005.

FERRETTI, M.; BERTONI, L.; CAVANI, F.; ZAVATTI, M.; RESCA, E.; CARNEVALE, G.; BENELLI, A.; ZANOLI, P.; PALUMBO, C. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. II: Role in recovering osteoporosis. **Journal of Anatomy**, 217: 48-56, 2010.

FOGLE, R. H.; STANCZYK, F. Z.; ZHANG, X.; PAULSON, R. J. Ovarian Androgen Production in Postmenopausal Women. **Obstetrical & Gynecological Survey**, 62: 791-793 10.1097/01.ogx.0000292008.97616.c7, 2007.

FOURNIER, A.; FABRE, A.; MESRINE, S.; BOUTRON-RUAULT, M.-C.; BERRINO, F.; CLAVEL-CHAPELON, F. Use of different postmenopausal hormone therapies and risk of histology- and hormone receptor-defined invasive breast cancer. **J Clin Oncol** Mar 26:1260-8, 2008.

FRANZOTTI, E. M. Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: *Morus nigra* L., *Plectranthus ornatos* codd., *Ipomoea cairica* (L) sweet e pouteria torta (mart.) radlk., 2006. **Tese** (Doutorado da Universidade de Brasília). [Internet] http://bdtd.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=497. Acesso em: 10 de Novembro 2010.

FREITAS, K. M.; SILVA, A. R. V.; SILVA, R. M. Mulheres vivenciando o climatério. **Acta sci., Health sci**, 26: 121-8, 2004.

FUGH-BERMAN, A.; ROGERIO, A. L.; M.D.A2 - ROGERIO A. LOBO, M. D. Chapter 50-Herbs, phytoestrogens, and other CAM therapies. In: (Ed.). **Treatment of the Postmenopausal Woman (Third Edition)**. St. Louis: Academic Press, 2007. p.683-690. ISBN978-0-12-369443-0.

FUKAI, T.; KAITOU, K.; TERADA, S. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, 76: 708-11, 2005.

FUNARI, C. S; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15: 178-182, 2005.

GARNET, A.L.; HOWARD, J.L.; KAUNITZ, A.M.; ANDREW, M.; BARAD, D.H.; BERESFORD, S.A.A. et al. Effects of Estrogen Plus Progestin on Gynecologic Cancers and Associated Diagnostic Procedures: The Women's Health Initiative Randomized Trial. **JAMA**, 290:1739-48, 2003.

GECGEL, U.; VELIOGLU, S.; VELIOGLU, H. Investigating Some Physicochemical Properties and Fatty Acid Composition of Native Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Seed Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 88: 1179-1187, 2011.

GELLER, S. E.; STUDEE, L. Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what does not. **J Womens Health (Larchmt)**, 14: 634-49, 2005.

GELLER, S. E.; STUDEE, L. Contemporary alternatives to plant estrogens for menopause. **Maturitas**, 55 Suppl 1: S3-13, 2006.

GENAZZANI, A. R.; NICOLUCCI, A.; CAMPAGNOLI, C. et al. Assessment of the QoL in Italian menopausal women: comparison between HRT users and non-users. **Maturitas**, 42: 267-80, 2002.

GONZÁLEZ JIMÉNEZ, E.; CAÑADAS DE LA FUENTE, G. A.; FERNÁNDEZ CASTILLO, R.; ÁLVAREZ FERRE, J.; GONZÁLEZ ANTÓN, C. Phytoestrogens and their effects on Osteoporosis in Postmenopausal Women. **Revista Clínica de Medicina de Familia**, 3: 201-205, 2010.

GRADY, D.; WENGER, N. K.; HERRINGTON, D.; KHAN, S.; FURBERG, C.; HUNNINGHAKE, D.; VITTINGHOFF, E.; HULLEY, S.; FOR THE, H.; ESTROGEN/PROGESTIN REPLACEMENT STUDY RESEARCH, G. Postmenopausal Hormone Therapy Increases Risk for Venous Thromboembolic Disease: The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. **Annals of Internal Medicine**, 132: 689-696, 2000.

GRADY, D.; GEBRETSADIK, T.; KERLIKOWSKE, K.; ERNSTER, V.; PETITTI, D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. **Obstet Gynecol**, 85: 304-13, 1995.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; CROCE, G.; TIBERTI, S.; AGGIO, A.; FERRI, C. Flavonoids, Vascular Function and Cardiovascular Protection. **Current Pharmaceutical Design**, 13: 1072-1084, 2009.

GREENDALE, G. A.; LEE, N. P.; ARRIOLA, E. R. The menopause. **The Lancet**, 353: 571-580, 1999.

GRODSTEIN, F.; MANSON, J. E.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; SPEIZER, F. E.; STAMPFER, M. J. A Prospective, Observational Study of Postmenopausal Hormone Therapy and Primary Prevention of Cardiovascular Disease. **Annals of Internal Medicine**, 133: 933-941, 2000.

GRUIJTERS, M. J. G.; VISSER, J. A.; DURLINGER, A. L. L.; THEMMEN, A. P. N. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 211: 85-90, 2003.

GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; SENSOY, R. I. G.; YILMAZ, H. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. **Scientia Horticulturae**, 132: 37-41, 2011.

GUPTA, P.; STURDEE, D. W.; PALIN, S. L.; MAJUMDER, K.; FEAR, R.; MARSHALL, T.; PATERSON, I. Menopausal symptoms in women treated for breast cancer: the prevalence and severity of symptoms and their perceived effects on quality of life. **Climacteric**, 9: 49-58, 2006.

HALL, J. E. Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 637-659, 2004.

HALL, J. E. Neuroendocrine changes with reproductive aging in women. **Semin Reprod Med**, 25: 344-51, 2007.

HAN, K. K.; SOARES, J. M., JR.; HAIDAR, M. A.; DE LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Benefits of Soy Isoflavone Therapeutic Regimen on Menopausal Symptoms. **Obstetrics & Gynecology**, 99: 389-394, 2002.

HASSIMOTTO, N. M.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutr Res**, 28: 198-207, 2008.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, 96: 67-202, 2002.

HEINEMANN, C.; REID, G. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. **Canadian Journal of Microbiology**, 51: 777-781, 2005.

HEMMATI, M. R.; HEMMATI, A.; HEMMATI, M. J.; HEMMATI, I. R.; HEMMATI, H. T. Effects of aqueous extract of black mulberry (*Morus nigra*) on liver and kidney of diabetic mice. **Toxicology Letters**, v. 196, Supplement, n. 0, p. S213-S214, 2010.

HERRINGTON, D. M.; REBOUSSIN, D. M.; KLEIN, K. P.; SHARP, P. C.; SHUMAKER, S. A.; SNYDER, T. E.; GEISINGER, K. R. The Estrogen Replacement and Atherosclerosis (ERA) Study: Study Design and Baseline Characteristics of the Cohort. **Controlled Clinical Trials**, 21: 257-285, 2000.

HESS, R. et al. The impact of menopause on health-related quality of life: results from the STRIDE longitudinal study. **Quality of Life Research**, 21: 535-544, 2012.

HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; TAKEDA, T.; YAMAMOTO, T.; ADACHI, K.; MORISHIGE, K.-I.; OHMACHI, M.; MATSUZAWA, Y.; MURATA, Y. Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 11404-11411, 2000.

HUANG, P.; CHANDRA, V.; RASTINEJAD, F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. **Annual Review of Physiology**, 72: 247-272, 2010.

HUNTER, M. S.; GRUNFELD, E. A.; MITTAL, S.; SIKKA, P.; RAMIREZ, A.-J.; FENTIMAN, I.; HAMED, H. Menopausal symptoms in women with breast cancer: Prevalence and treatment preferences. **Psycho-Oncology**, 13: 769-778, 2004.

IBGE. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo demográfico**. BRASIL, 2007. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 de Julho de 2010.

IM, E.-O.; SEUNG HEE, L.; CHEE, W. Subethnic Differences in the Menopausal Symptom Experience of Asian American Midlife Women. **Journal of Transcultural Nursing**, 21: 123-133, 2010.

INTERAGENCY TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM - ITIS. Catalogue of life: 2010 annual checklist. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/details/species/id/7038172>. Acesso em: 25 de Dezembro 2011.

IVERIUS, P.H.; BRUNZELL, J.D. Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid level in obese women. *J Clin Invest.* 1988; 82: 1106-12.

JACQUOT, Y.; ROJAS, C.; REFOUVELET, B.; ROBERT, J.F.; LECLERCQ, G.; XICLUNA, A. Recent advances in the development of phytoestrogens and derivatives: an update of the promising perspectives in the prevention of postmenopausal diseases. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 3: 387-400, 2003.

JOFFE, H.; SOARES, C. N.; COHEN, L. S. Assessment and treatment of hot flushes and menopausal mood disturbance. **The Psychiatric Clinics of North America**, 26: 563-580, 2003.

JORDAN, V. C. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 31, p. 41-52, 1994.

KHARE, C. P. **Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary**. Springer, 2007. ISBN 9780387706375. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=gMwLwbUwtfkC> <

KILAF, E.; KIRCHENGAST, S. Menopause between nature and culture: Menopausal age and climacteric symptoms among Turkish immigrant women in Vienna, Austria. **Acta Med Lituanica**, v. 15, p. 2-8, 2008.

KIRSTEN J, L. Menopause and the Menopausal Transition. **Medical Clinics of North America**, 92: 1253-1271, 2008.

KJERULFF, K. H.; FRICK, K. D.; RHOADES, J. A.; HOLLENBEAK, C. S. The cost of being a woman: A National Study of Health Care Utilization and Expenditures for Female-Specific Conditions. **Women's Health Issues**, 17: 13-21, 2007.

KOEHLER, K. F.; HELGUERO, L. A.; HALDOSÉN, L.-A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-Å. Reflections on the Discovery and Significance of Estrogen Receptor β . **Endocrine Reviews**, 26: 465-478, 2005.

KOH, W.-P.; LEE, L. H.-P. Menopause and the Asian woman-Is she different from women of other ethnicities? **Menopausal Medicine: For clinicians who provide care for women**, 15, 2007.

KOMM, B. S. A new approach to menopausal therapy: the tissue selective estrogen complex. **Reprod Sci**, 15: 984-92, 2008.

KREBS, E. E.; ENSRUD, K. E.; MACDONALD, R.; WILT, T. J. Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. **Obstet Gynecol**, 104: 824-36, 2004.

KRONENBERG, F.; FUGH-BERMAN, A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: A review of randomized, controlled trials. **Annals of Internal Medicine**, v. 137, n. 10, p. 805-813, 2002.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . **Endocrinology**, 139: 4252-4263, 1998.

LA MARCA, A.; VOLPE, A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? **Clinical Endocrinology**, v. 64, n. 6, p. 603-610, 2006.

LA MARCA, A.; BROEKMANS, F. J.; VOLPE, A.; FAUSER, B. C.; MACKLON, N. S. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know? **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2264-2275, 2009.

LECLERCQ, G. et al. Lack of sufficient information on the specificity and selectivity of commercial phytoestrogens preparations for therapeutic purposes. **Maturitas**, 68: 56-64, 2010.

LEPHART, E. D.; WEST, T. W.; WEBER, K. S.; RHEES, R. W.; SETCHELL, K. D. R.; ADLERCREUTZ, H.; LUND, T. D. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. **Neurotoxicol Teratol**, 24: 5-16, 2002.

LETHABY, A. E. et al. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD001395, 2007.

LEVIN, E. R. Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. **Mol Endocrinol**, 25: 377-84, 2011.

LIMER, J. L.; SPEIRS, V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Research**, 6: 119-127, 2004.

LIU, J. et al. Evaluation of Estrogenic Activity of Plant Extracts for the Potential Treatment of Menopausal Symptoms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2472-2479, 2001.

LÓRÁND T, VIGH E, GARAI J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. **Curr Med Chem**, 17:3542-74, 2010.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003. ISBN 9788586714191. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=SCcgAQAAIAAJ> >.

LU, Y.; MA, H.; LIU, D. Pharmacological investigations of the unique herbal formula Menoprogen in rats: estrogenic activity and mechanism. **Gynecol Endocrinol**, v. 24, n. 3, p. 161-70, Mar 2008.

LUKACZER, D.; DARLAND, G.; TRIPP, M.; LISKA, D.; LERMAN, R. H.; SCHILTZ, B.; BLAND, J. S. Clinical effects of a proprietary combination isoflavone nutritional supplement in menopausal women: a pilot trial. **Altern Ther Health Med**, 11: 60-5, 2005.

LYNCH, C. Vaginal estrogen therapy for the treatment of atrophic vaginitis. **J Womens Health (Larchmt)**, 18: 1595-606, 2009.

MRKVICKA, A. 2004. Botanik im Bild / Flora von Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Wien 22. Bezirk / Ehemaliger Frachtenbahnhof Breitenlee. <http://flora.nhm-wien.ac.at/Seiten-Arten/Morus-nigra.htm>. Acesso em: 17 de Abril 2012.

MA, J.; DRIELING, R.; STAFFORD, R. S. US women desire greater professional guidance on hormone and alternative therapies for menopause symptom management. **Menopause**, v. 13, n. 3, p. 506-16, 2006.

MA, H. et al. Estrogenic effects of the herbal formula, menoprogen, in ovariectomized rats. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 3, p. 455-60, 2010.

MACHII, H.; KOYAMA, A.; YAMANOUCHI, H. 2000. FAO Eletronic Conference: *Mulberry for animal production*. Disponível em <http://www.fao.org/livestock/agap/frg/mulberry>.

MACLENNAN, A. H. Evidence-based review of therapies at the menopause. **International Journal of Evidence-Based Healthcare**, 7: 112-123, 2009.

MADAUSS, K. P.; STEWART, E. L.; WILLIAMS, S. P. The evolution of progesterone receptor ligands. **Medicinal Research Reviews**, 27: 374-400, 2007.

MARÇAL, R. Fito-hormônio. *Revista Herbarium*. n. 2, p. 10-12, 2011 Disponível em: <http://www.revistaherbarium.com.br/>. Acesso em: 20 de Agosto de 2012.

MASKARINEC, S. The Effect of Phytoestrogens on Hot Flashes. **Nutrition Bytes**, 9, 2003.

MAZIMBA, O.; MAJINDA, R. R. T.; MOTLHANKA, D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5: 751-4, 2011.

MENOPAUSE AND POSTMENOPAUSE WORKING GROUP. Clinical Practice Guideline of Menopause and Postmenopause. Barcelona; 2004. Spanish Society of Gynecology and Obstetrics. Spanish Association for the Study of Menopause, Spanish Society of Family and Community Medicine, Iberoamerican Cochrane Centre.

MIHM, M.; GANGOOLY, S.; MUTTUKRISHNA, S. The normal menstrual cycle in women. **Animal Reproduction Science**, 124: 229-236, 2011.

MINIELLO, V. L.. Soy-based formulas and phyto-oestrogens: a safety profile. **Acta Paediatr Suppl**, 91: 93-100, 2003.

MIRANDA, M. A.; VIEIRA, D. G.; ALVES, M. S.; YAMAMOTO, C. H.; DE PINHO, J.J. R. G.; DE SOUSA, V. O. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais. **Brasil. HU Revista (UFJF. Impresso)**, 36: 61-8, 2010.

MIRO, F.; PARKER, S. W.; ASPINALL, L. J.; COLEY, J.; PERRY, P. W.; ELLIS, J. E. Origins and consequences of the elongation of the human menstrual cycle during the menopausal transition: the FREEDOM Study. **J Clin Endocrinol Metab**, 89: 4910-5, 2004.

MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Biological activity and health benefits of lignans and lignins. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, 11: 855-62, 2005.

MOLLA, M. D.; HIDALGO-MORA, J. J.; SOTERAS, M. G. Phytotherapy as alternative to hormone replacement therapy. **Front Biosci**, 3: 191-204, 2011.

MORITO, K.; AOMORI, T.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HASEGAWA, J.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M.; MASAMUNE, Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). **Biol Pharm Bull**, 25: 48-52, 2002.

MORTENSEN, A.; KULLING, S. E.; SCHWARTZ, H.; ROWLAND, I.; RUEFER, C. E.; RIMBACH, G.; CASSIDY, A.; MAGEE, P.; MILLAR, J.; HALL, W. L.; KRAMER BIRKVED, F.; SORENSEN, I. K.; SONTAG, G. Analytical and compositional aspects of

isoflavones in food and their biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, 53: S266-S309, 2009.

MUTTUKRISHNA, S.; FOWLER, P. A.; GEORGE, L.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 81: 3328-34, 1996.

MUTTUKRISHNA, S.; CHILD, T.; LOCKWOOD, G. M.; GROOME, N. P.; BARLOW, D. H.; LEDGER, W. L. Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. **Human Reproduction**, 15: 549-556, 2000.

MUTTUKRISHNA, S.; SHARMA, S.; BARLOW, D. H.; LEDGER, W.; GROOME, N.; SATHANANDAN, M. Serum inhibins, estradiol, progesterone and FSH in surgical menopause: a demonstration of ovarian pituitary feedback loop in women. **Human Reproduction**, 17: 2535-2539, 2002.

MUTTUKRISHNA, S.; TANNETTA, D.; GROOME, N.; SARGENT, I. Activin and follistatin in female reproduction. **Mol Cell Endocrinol**, 225: 45-56, 2004.

NADAL, A.; DÁAZ, M.; VALVERDE, M. A. The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. **Physiology**, 16: 251-255, 2001.

NADERI, G. A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; OROOJY, H.; AFSHIN-NIA, F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytother Res**, 18: 365-9, 2004.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 3309-3312, 2003.

NAMS. The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, 19: 257-271, 2012.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT, P. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1-3, 2000. **Journal of the National Cancer Institute**, 93: 979-989, 2001.

NELSON, H. D.; VESCO, K. K.; HANEY, E.; FU, R.; NEDROW, A.; MILLER, J.; NICOLAIDIS, C.; WALKER, M.; HUMPHREY, L. Nonhormonal Therapies for Menopausal Hot Flashes. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 295: 2057-2071, 2006.

NI, X.; LUO, S.; MINEGISHI, T.; PENG, C. Activin A in JEG-3 Cells: Potential Role as an Autocrine Regulator of Steroidogenesis in Humans. **Biology of Reproduction**, 62: 1224-1230, 2000.

NIKOV, G. N.; HOPKINS, N. E.; BOUE, S.; ALWORTH, W. L. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. **Environ Health Perspect**, 108: 867-72, 2000.

NORMAN, A. W.; MIZWICKI, M. T.; NORMAN, D. P. G. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nat Rev Drug Discov**, 3: 27-41, 2004.

NOTELOVITZ, M. Estrogen replacement therapy indications, contraindications and agent selection. **International Journal Gynecology Obstetrics**, London, 161, p. 8-17.1989

O'NEILL, S.; EDEN, J. The pathophysiology of menopausal symptoms. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 22, n. 3, p. 63-69, 2012.

ORGAARD, A.; JENSEN, L. The Effects of Soy Isoflavones on Obesity. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 9, p. 1066-1080, September 1, 2008.

ORYAN, S.; EIDI, M.; YAZDI, E.; EIDI, A. SOLATI J. Hypoglycemic effects of alcohol extracted of *Morus nigra* leaves in healthy and diabetic male rats. **Journal of Medicinal Plants**, 2: 27-32, 2003.

OSENI, T. et al. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. **Planta Med**, 74: 1656-65, 2008.

ÖZGENA, M.; SERÇEB, S.; KAYAC, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae**, 119: 275-279, 2009.

PADILHA, M. M.; VILELA, F. C.; ROCHA, C. Q.; DIAS, M. J.; SONCINI, R.; DOS SANTOS, M. H.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytother Res**, 24: 1496-500, 2010.

PANAY, N. Integrating phytoestrogens with prescription medicines--a conservative clinical approach to vasomotor symptom management. **Maturitas**, Limerick, v. 57, n. 1, p. 90-4, 2007.

PARANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. Edusp, 1993. ISBN 9788531401169. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=xklxQlqdlVMC> >.

PELUCCHI, C.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. The rise and fall in menopausal hormone therapy and breast cancer incidence. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, 19: 198-201, 2010.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L. M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **LWT - Food Science and Technology**, 44: 1793-1801, 2011.

PETLEVSKI, R.; HADZIJA, M.; SLIJEPCEVIC, M.; JURETIC, D. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. **J Ethnopharmacol**, 75: 181-4, 2001.

PETRAGLIA, F.; LUISI, S.; PAUTIER, P.; SABOURIN, J.-C.; REY, R.; LHOMME, C.; BIDART, J.-M. Inhibin B Is the Major Form of Inhibin/Activin Family Secreted by Granulosa Cell Tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 3, p. 1029-1032, March 1, 1998.

PINES, A.; STURDEE, D. W.; BIRKHÄUSER, M. H.; SCHNEIDER, H. P. G.; GAMBACCIANI, M.; PANAY, N. IMS Updated Recommendations on postmenopausal hormone therapy. **Climacteric**, 10: 181-194, 2007.

PINES, A. Guidelines and recommendations on hormone therapy in the menopause. **J Midlife Health**, 1: 41-2, 2010.

POLITI, M. C.; SCHLEINITZ, M. D.; COL, N. F. Revisiting the duration of vasomotor symptoms of menopause: a meta-analysis. **J Gen Intern Med**, 23: 1507-13, 2008.

PROJETO DIRETRIZES, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. *Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia*. 2008.

REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, 307: 1625-30, 2005.

RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEL, U.; DANIEL, H.; HALL, W. L.; WEINBERG, P. D. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - A molecular perspective. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, 3: 335 -341, 2007.

ROUGE, P.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. **Biochem Biophys Res Commun**, 304: 91-7, 2003.

SACKS, F. M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, W.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M.; FOR THE, A. H. A. N. C. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 26: 1689-1692, 2006.

SAMMEL, M. D.; FREEMAN, E. W.; LIU, Z.; LIN, H.; GUO, W. Factors that influence entry into stages of the menopausal transition. **Menopause**, v. 16, n. 6, p. 1218-1227 10.1097/gme.0b013e3181a8f62b, 2009.

SCHEID, V. et al. The treatment of menopausal symptoms by traditional East Asian medicines: Review and perspectives. **Maturitas**, v. 66, n. 2, p. 111-130, 2010.

SCHINDLER, A. E.; CAMPAGNOLI, C.; DRUCKMANN, R.; HUBER, J.; PASQUALINI, J. R.; SCHWEPPE, K. W.; THIJSSEN, J. H. Classification and pharmacology of progestins. **Maturitas**, v. 61, p. 171-80, 2008.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4. São Paulo: Manole, 2002.

SHUSTER, L. T. et al. Premature menopause or early menopause: Long-term health consequences. **Maturitas**, 65: 161-166, 2010.

SCHWARTZ, H.; SONTAG, G.; PLUMB, J. Inventory of phytoestrogen databases. **Food Chemistry**, v. 113, n. 3, p. 736-747, 2009.

SETCHELL, K.D.R., CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**, 129: 758S-767S, 1999.

SETCHELL, K. D. R. Soy Isoflavones—Benefits and Risks from Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. suppl 5, p. 354S-362S, 2001.

SHU, X. O. et al. Soy food intake and breast cancer survival. **JAMA**, v. 302, n. 22, p. 2437-43, 2009.

SKOUBY, S. O.; JESPERSEN, J. Progestins in HRT: Sufferance or desire? **Maturitas**, 62: 371-375, 2009.

SOBRAFITO. **Fitomedicamentos em Ginecologia**. 2010. Disponível em: <<http://ginecousp.blogspot.com/2010/10/fitomedicamentos-em-ginecologia.html>>.

Acesso em: 10 de Janeiro de 2012.

SOULES, M. R.; SHERMAN, S.; PARROTT, E.; REBAR, R.; SANTORO, N.; UTIAN, W.; WOODS, N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) Park City, Utah, July, 2001. **Menopause**, v. 8, n. 6, p. 402-7, 2001.

SOUTO, S. B.; SOUSA, S.; SOARES, S.; PÓVOA, A. M.; CALEJO, L.; XAVIER, P.; CARVALHO-BRAGA, D.; CARVALHO, D. Hormona Anti-Mülleriana. Novo marcador de reserva ovárica? **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 6, n. 12, p. 69-75, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; INSTITUTO PLANTARUM DE ESTUDOS DA, F. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II**. 2ª. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SINGH, T.; WU, J. H.; PEUMANS, W. J.; ROUGE, P.; VAN DAMME, E. J.; WU, A. M. Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. **Mol Immunol**, 44: 451-62, 2007.

SITRUK-WARE, R. Reprint of Pharmacological profile of progestins. **Maturitas**, 61: 151-157, 2008.

STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E.; ROSNER, B.; SPEIZER, F. E.; HENNEKENS, C. H. Postmenopausal Estrogen Therapy and Cardiovascular Disease. **New England Journal of Medicine**, 325: 756-762, 1991.

STURDEE, D. W.; PANAY, N. Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. **Climacteric**, v. 13, n. 6, p. 509-522, 2010.

STURDEE, D. W.; PINES, A. Updated IMS recommendations on postmenopausal hormone therapy and preventive strategies for midlife health. **Climacteric**, 14: 302-320, 2011.

SVEN O, S. "Climacteric medicine: European Menopause And Andropause Society (EMAS) statements on postmenopausal hormonal therapy." **Maturitas**, 48: 19-25, 2004.

SWEDENBORG, E. et al. Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 24, p. 3873-3894, 2009.

SÝVACÝ, A.; SÖKMEN, M. Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). **Plant Growth Regulation**, 44: 251-256, 2004.

SZMUILOWICZ, E. D.; MANSON, J. E.; SEELY, E. W. Menopausal vasomotor symptoms and circulating hemostatic markers: causation or just association? **Menopause**, 18: 1035-1037 10.1097/gme.0b013e318226741e, 2011.

TAHARA, S. A Journey of Twenty-Five Years through the Ecological Biochemistry of Flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 71: 1387-1404, 2007.

TANAKA, Y.; SASAKI, M.; KANEUCHI, M.; FUJIMOTO, S.; DAHIYA, R. Estrogen receptor alpha polymorphisms and renal cell carcinoma—a possible risk. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 202: 109-116, 2003.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; TEW, K. D. Estrogen and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56: 36-44, 2002.

TE VELDE, E. R.; PEARSON, P. L. The variability of female reproductive ageing. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 2, p. 141-154, March 1, 2002 2002.

THE, E. C. W. G. Hormones and cardiovascular health in women. **Human Reproduction Update**, 12: 483-497, 2006.

THOMAS, P. et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology**, 146: 624-32, 2005.

TIKKANEN, M. J.; VIHMA, V.; JAUHIAINEN, M.; HÖCKERSTEDT, A.; HELISTEN, H.; KAAMANEN, M. Lipoprotein-associated estrogens. **Cardiovascular Research**, 56: 184-188, 2002.

TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: Prevention strategies, and implications for female aging and the menopause. **Annales d'Endocrinologie**, v. 64, n. 2, p. 82-84, 2003.

TSIGKOU, A.; LUISI, S.; REIS, F. M.; PETRAGLIA, F.; GREGORY, S. M. Inhibins as Diagnostic Markers in Human Reproduction. In: (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**: Elsevier, v. 45, p.1-29, 2008.

TUTIN G. T.; BURGESS, N. A.; CHATER, A. O.; EDMONDSON, J. R.; HEYWOOD, V. H.; MOORE, D. M.; VALENTINE, D. H.; WALTERS, S. M.; WEBB, D. A. 1996. *Morus* L. In Flora Europa. *Psilotaceae to Platanaceae*. vol 1. Australia: Cambridge University Press.

UNFER, V.; CASINI, M. L.; COSTABILE, L.; MIGNOSA, M.; GERLI, S.; DI RENZO, G. C. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Fertility and sterility**, 82: 145-148, 2004.

UMLAND, E. M. Treatment strategies for reducing the burden of menopause-associated vasomotor symptoms. **J Manag Care Pharm**, 14: 14-9, 2008.

USUI, T. Pharmaceutical Prospects of Phytoestrogens. **Endocrine Journal**, v. 53, n. 1, p. 7-20, 2006.

UTIAN, W. H. et al. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 584-602, 2008.

VAN DAMME, E. J.; HAUSE, B.; HU, J.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PROOST, P.; PEUMANS, W. J. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. **Plant Physiol**, 130: 757-69, 2002.

VAN ROOIJ, I. A. J.; BROEKMANS, F. J. M.; TE VELDE, E. R.; FAUSER, B. C. J. M.; BANCSI, L. F. J. M. M.; JONG, F. H. D.; THEMMEN, A. P. N. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Human Reproduction**, v. 17, n. 12, p. 3065-3071, December 1, 2002.

VAN ROOIJ, I. A. J.; BROEKMANS, F. J. M.; SCHEFFER, G. J.; LOOMAN, C. W. N.; HABBEMA, J. D. F.; DE JONG, F. H.; FAUSER, B. J. C. M.; THEMMEN, A. P. N.; TE VELDE, E. R. Serum anti-Müllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: A longitudinal study. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 4, p. 979-987, 2005.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, 25: 555-611, 2008.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, 61: 83-103, 2006.

VIEIRA, C. S.; NAVARRO, P. A. A. S. Como Diagnosticar e Tratar: Síndrome climatérica **Revista Brasileira de Medicina**, 64: 99-109, 2007.

VIHMA, V.; TIKKANEN, M. J. Fatty acid esters of steroids: Synthesis and metabolism in lipoproteins and adipose tissue. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 124, n. 3-5, p. 65-76, 2011.

VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. N. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p. 81-86, 2005.

VISSER, J. A. et al. Anti-Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. **Nat Rev Endocrinol**, v. advance online publication, 2011.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, C.; SINZATO, S.; CERVELIN, V.; NICOLEILO, H.; SARTI, M.; CALDERON, I. DE M. P. Avaliação do efeito do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* (Amora) no binômio diabetes e gravidez. **Diabetes Clínica**. 5: 340-345, 2005.

VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; SINZATO, S.; CAMPOS, K. E.; RUDGE, M. V. C.; DAMASCENO, D. C. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 138: 691-696, 2011.

WANG, L.; WANG, H. Q.; CHEN, R. Y. Studies on chemical constituents from bark of *Morus nigra*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, 32: 2497-9, 2007.

WANG, L. et al. Three new compounds from the barks of *Morus nigra*. **J Asian Nat Prod Res**, 10: 897-902, 2008.

WANG, L.; GONG, T.; CHEN, R. Y. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. **Chinese Chemical Letters**, 20: 1469-1471, 2009.

WAKATSUKI, A.; IKENOUE, N.; OKATANI, Y.; SHINOHARA, K.; WATANABE, K.; FUKAYA, T. Lipolytic enzyme effect on small low-density lipoprotein particles in women treated with estrogen. **Obstet Gynecol**, 97: 333-7, 2001.

WAKATSUKI, A.; OKATANI, Y.; IKENOUE, N.; SHINOHARA, K.; WATANABE, K.; FUKAYA, T. Effect of lower dose of oral conjugated equine estrogen on size and oxidative susceptibility of low-density lipoprotein particles in postmenopausal women. **Circulation**, 108: 808-13, 2003.

WARREN, M. P. Missed symptoms of menopause. **International Journal of Clinical Practice**, 61: 2041-2050, 2007.

WATSON, C. S.; GAMETCHU, B. Proteins of Multiple Classes May Participate in Nongenomic Steroid Actions. **Experimental Biology and Medicine**, 228: 1272-1281, 2003.

WATSON, C. S.; JENG, Y.-J.; KOCHUKOV, M. Y. Nongenomic Signaling Pathways of Estrogen Toxicity. **Toxicological Sciences**, 115: 1-11, 2010.

WATSON, C. S.; JENG, Y.-J.; GUPTARAK, J. Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 127: 44-50, 2011.

WEINBAUER, G. F.; NIEHOFF, M.; NIEHAUS, M.; SRIVASTAV, S.; FUCHS, A.; VAN ESCH, E.; CLINE, J. M. Physiology and Endocrinology of the Ovarian Cycle in Macaques. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 7 suppl, p. 7S-23S, 2008.

WEISMILLER, D. G. Menopause. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 1, p. 199-226, 2009.

WELNICKA-JASKIEWICZ, M.; JASSEM, J. The risks and benefits of hormonal replacement therapy in healthy women and in breast cancer survivors. *Cancer Treat Rev.*, 29: 355- 361, 2003.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE, I. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 288: 321-333, 2002.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE, I. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 291: 1701-12, 2004.

WILLIAMS, R. E.; KALILANI, L.; DIBENEDETTI, D. B.; ZHOU, X.; FEHNEL, S. E.; CLARK, R. V. Healthcare seeking and treatment for menopausal symptoms in the United States. **Maturitas**, 58: 348-358, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research on the menopause. WHO Technical Report Series, Geneva, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research on menopause in the 1990's: report of a WHO scientific group. WHO Technical Report Series 866, Geneva, 1994.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; BECKER, T.; SCHULTENS, A.; CHRISTOFFEL, V.; GORKOW, C.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or

replacement for hormone replacement therapy? **Maturitas**, v. 44 Suppl 1, p. S9-20, 2003.

WYLIE, K.; REES, M.; HACKETT, G.; ANDERSON, R.; BOULOUX, P.-M.; CUST, M.; GOLDMEIER, D.; KELL, P.; TERRY, T.; TRINICK, T.; WU, F. Androgens, health and sexuality in women and men. **Maturitas**, v. 67, n. 3, p. 275-289, 2010.

YEARLEY, E. J.; ZHUROVA, E. A.; ZHUROV, V. V.; PINKERTON, A. A. Binding of Genistein to the Estrogen Receptor Based on an Experimental Electron Density Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 48, p. 15013-15021, 2007.

ZHENG, Z. P.; CHENG, K. W.; ZHU, Q.; WANG, X. C.; LIN, Z. X.; WANG, M. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. **J Agric Food Chem**, 58: 5368-73, 2010.

ZILLI, M. et al. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1795, n. 1, p. 62-81, 2009.

4 CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido ao periódico: *Maturitas “The European Menopause Journal”* (ISSN 0378-5122)

“Evaluation of the Phyto-oestrogenic Effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) Leaves in Ovariectomised Rats”

Evaluation of the Phyto-oestrogenic Effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) Leaves in Ovariectomised Rats

Selma do Nascimento Silva^{a,b} and Antônio Carlos Romão Borges^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia-RENORBIO; ^bLaboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, S/N, Campus do Bacanga, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brasil.

*E-mail: selmansilva@ufma.br; tel. +55 98 33018533; fax: +55 98 33018004. (Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, S/N, 65085-580, São Luís, Maranhão, Brasil).

Abstract

Objectives: *Morus nigra* L. (Moraceae) is widely used in Brazilian folk medicine to treat menopausal symptoms. The aim of this study was to evaluate the effects of a hydroalcoholic extract (HE) from the leaves of *M. nigra* in a rat model of induced menopause. **Methods:** The antioxidant activity of the hydroalcoholic extract (HE) was evaluated with the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl assay, and the extract was subjected to phytochemical screening. The control groups, divided into sham-operated (SHAM) and ovariectomised (OVX) rats, received 0.1 mL/100 g of saline. The rats in the test groups were administered oestrogen-progestins (EP, 50 µg/kg; OVX-EP group) or *M. nigra* HE (500 mg/kg; OVX-HE500 group) for 14 weeks. During this period, the food intake, body weight and frequency of the oestrous cycle were measured. At the end of the treatment, biochemical, hormonal and body weight analyses were performed, and the histology of the uterus and vagina were analysed. **Results:** The *M. nigra* HE contained flavonoids and a high level of antioxidant activity (94.18%) similar to that of pure quercetin. An analysis of the oestrous cycles of the OVX-HE500 group revealed increases of 15.2% and 26.6% in the oestrous and pro-oestrous phases, respectively, compared with the OVX group. Ovariectomy reduced the uterine weights of the rats. The administration of 500 mg/kg HE caused an increase of 83.8% of uterine weight compared with the OVX group. In contrast, the EP group exhibited a 169.7% increase in uterine weight. Upon histological analysis, the OVX animals displayed atrophic uterine and vaginal epithelia. In contrast, the EP group exhibited hyperproliferative epithelia, and the OVX-HE500 group was protected from severe uterine atrophy and exhibited a slightly increased proliferation of the vaginal epithelium. Ovariectomy led to an increase in body weight gain, but the chronic administration of 500 mg/kg HE or oestrogen-progestins reduced the effect of castration from the 10th week of treatment. A biochemical analysis revealed that the administration of EP and HE reduced the triglyceride concentrations by 23.8% and 27.5%, respectively, compared with the OVX group. **Conclusion:** Our findings provide evidence that the *Morus nigra* L. HE is a potential source of natural antioxidants, especially flavonoids, and support its use in folkloric medicines to manage menopausal symptoms as an alternative to hormone replacement therapy.

Keywords: *Morus nigra* L., oestrogenic activity, uterus, ovariectomy, antioxidant activity.

1. Introduction

Natural menopause is diagnosed in women after 12 months of amenorrhea that is not associated with any pathological cause. This hypo-oestrogenic state may adversely affect oestrogen target tissues such as the brain, skeleton and skin, as well as the cardiovascular and genitourinary systems. Menopause can result in an increased frequency and severity of climacteric symptoms, such as hot flashes, depression, mood swings, sleeping disorders, vaginal dryness and joint pain [1-3]. Thus, the “classical” hormone replacement therapy (HRT; oestrogens and progestins) has been extensively promoted and used during the past 25 years to relieve menopausal symptoms. However, research has raised concerns regarding the safety of HRT, especially in women with personal or family histories of breast or uterine cancer or other oestrogen-dependent cancers and in women with or at risk of cardiovascular disease [4-6]. Therefore, the use of complementary and alternative medicine, including phyto-oestrogens, for the treatment and relief of menopausal symptoms has increased among menopausal women during the last several years [7, 8].

Phyto-oestrogens (non-steroidal plant compounds) are naturally occurring plant polyphenol compounds. Because of their structural similarity to mammalian oestrogens, phyto-oestrogens may display both oestrogenic and anti-oestrogenic effects [9, 10]. There are three major classes of phyto-oestrogens: flavonoids, such as genistein, naringenin, and kaempferol; coumestans, such as coumestrol; and lignans, such as enterodiol and enterolactone [7, 11].

In addition to soybeans, the following botanical herbs are used as sources of phyto-oestrogens for the treatment of menopausal symptoms: red clover, black cohosh, dong quai, wild yam, kava and ginseng [7, 8]. In Brazil, the use of the extract obtained from the leaves of *Morus nigra* L. for the treatment of climacteric complaints has been growing in popularity. Therefore, this plant may have medicinal potential for chemical and pharmacological studies, especially as a source of substances with oestrogenic activity [12].

Morus nigra L. (syn. *Rubus fruticosus* L.; *Rubus brasiliensis* Mart., *Morus laevigata* WALL.), a member of the family Moraceae, is native to Asia and is more commonly known as the black mulberry. This plant has been used traditionally as an analgesic, diuretic, antitussive, sedative, anxiolytic and hypotensive, in addition to its use in the treatment of a variety of ailments, including inflammatory disorders [13, 14].

The evaluation of the pharmacological effects of crude herbal extracts, the screening of natural products, and the discovery of new biologically active compounds are among the current objectives of many scientific researchers and pharmaceutical companies. The dichloromethane extract from *M. nigra* leaves has demonstrated a strong antinociceptive activity in mice [15]. In contrast, the aqueous extract from *Morus nigra* leaves failed to control hyperglycaemia in diabetic rats. However, *M. nigra* aqueous extract treatment has shown an antioxidant effect, contributing to a reduced incidence of internal anomalies in the offspring of diabetic dams [16]. The antioxidant effect of three different extracts of *M. nigra* fruit has been shown to protect against peroxidative damage to biomembranes and biomolecules [17].

Additionally, many active components have been found in the leaves, stems and fruits of this plant, including flavonoids, alkaloids, coumarins, triterpenes and steroids. It has been previously reported that chemical compounds isolated from *M. nigra* leaves, including betulinic acid, β -sitosterol and germanicol, may be responsible for the anti-inflammatory effect of the extract [18]. *M. nigra* fruit is a good source of several phytonutrients and contains high amounts of total phenolics, total flavonoids and ascorbic acid. In addition, the fruit has a pleasant, slightly acidic taste; an attractive, dark red colour; and moderate antioxidant activity [19-21]. Two major anthocyanins (cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside) and two flavonols (quercetin 3-glucoside and rutin), which contribute significantly to antioxidant activity, have been isolated from *M. nigra* fruits, along with caffeic acid and other hydroxycinnamic and ellagic acid derivatives [22]. The ethanol extract of *M. nigra* twigs yielded 10 new isoprenylated flavonoids (nigrasins) and three known compounds, sanggenol, cudraflavone, and macaranone. Some of these compounds promoted an increase in the gene expression of GLUT4 protein in 3T3-L1 adipocyte cells, which is significant for the development of new agents to maintain glucose homeostasis and treat type 2 diabetes [23]. An investigation of the *M. nigra* bark and leaves yielded a stilbenoid, a 2-arylbenzofuran, four isoprenylated flavonoids, two triterpenes and a steroidal saponin. The phenolic compounds exhibited moderate antioxidant and anti-bacterial properties [24].

Despite the traditional and widespread use of *Morus nigra* L., there is little scientific evidence of its pharmacological properties. The objective of this study was to investigate the potential oestrogenic properties of *M. nigra* leaf extracts. Therefore, we focused our investigation on the pharmacologic effects of *M. nigra* leaf extracts on body

weight, degree of cornification of the vaginal epithelium, and uterotrophic potential. Furthermore, we examined the histology of the reproductive organs and assayed the hormonal profiles of rats with experimentally induced menopause.

2. Materials and methods

2.1. Animals and ethics

Male and female Swiss mice and *female Wistar rats* were used in the experiments. Adult animals were obtained from Bioterious of the Federal University of Maranhão (UFMA) and were kept under standard temperature conditions (22 ± 2 °C) and a 12-hour light/dark cycle, with water and animal feed (Labina® - Purina, São Paulo, Brazil) provided *ad libitum* during the entire period of the experiment. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Maranhão (Nº 026/2008).

2.2. Plant material and extract preparation

Morus nigra L. leaves were collected from the UFMA (Bacanga campus), São Luís, Maranhão State, Brazil in May 2008. This material was identified as *Morus nigra* L. (Moraceae), and a voucher specimen (Nº. 1365) was deposited in the Prof. Dra. Berta Lange de Morretes Medicinal Plant Garden/ UFMA.

The leaves were dried at room temperature (28-30 °C) and pulverised. The dried powder was macerated in 70% ethanol for 72 hours at a ratio of 1:3 (v/v) with mechanical stirring on a daily basis. The hydroalcoholic extract (HE) obtained via this process was concentrated under vacuum with a yield of 21.9%, bottled in an amber flask and stored at 4 °C.

2.3. Phytochemical screening

Phytochemical screening of the HE of *Morus nigra* leaves was performed using standard procedures and tests to determine the presence of constituents such as alkaloids, terpenoids, flavonoids, phenols, tannins, coumarins and saponins [25].

2.4. DPPH free radical scavenging activity

The quantification of the antioxidant activity (AA) of the HE was assessed on the basis of the radical scavenging effect of a DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl, Sigma) solution (0.006% w/v) prepared in 80% methanol. Different dilutions of the extracts and standard (quercetin) totalling 2.0 mL were added to 1.0 mL of DPPH. These solution mixtures were kept in the dark for 30 min, and then the optical density was measured at 517 nm using an SP-2000 UV spectrophotometer. All the

measurements were performed in duplicate. The antioxidant activity was expressed according the following equation: $AA\% = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$ (A = absorbance). The IC_{50} values denote the sample concentration that was required to scavenge 50% of the DPPH free radicals [26].

2.5. Acute oral toxicity study

The HE of *M. nigra* was administered orally as a single dose in the range of 2-10 g/kg to different groups of mice ($n = 10-15$). The mice were observed for adverse signs and symptoms 0 min, 30 min, 1, 2, 4 and 6 hours after the extract administration and thereafter every day for 14 days [27, 28].

2.6. Bilateral ovariectomy and treatments

To study the oestrogenic property of *M. nigra*, adult cyclic female rats were ovariectomised (OVX). Briefly, intact cyclic rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and two dorsolateral incisions approximately 1 cm long were made above the ovaries. Following the removal of both ovaries, the skin wounds were closed bilaterally with a single catgut suture. The sham operation (SHAM) was performed by exposing the ovaries and placing them back into the body cavity.

After 21 days of endogenous hormonal decline (in the case of the OVX animals) and evidence of anoestrus provided by vaginal smears, all the experimental groups ($n = 8-10$) were treated with the following compounds: Group I: sham-operated rats (SHAM, 10 mL saline/kg body weight); Group II: bilaterally ovariectomised rats (OVX, 10 mL saline/kg body weight); Group III: bilaterally ovariectomised rats (OVX-EP, 50/25 μg oestrogen/progestins [Natifa Pro[®]]/kg body weight) and Group IV: bilaterally ovariectomised rats (OVX-HE, 500 mg *Morus nigra* HE/kg body weight).

2.7. Body weight and food intake

The body weights and food consumption of the rats were determined every three days throughout the study.

2.8. Determination of the oestrous cycle phases of the rats via vaginal smears

The oestrous cycles of the adult rats were monitored as previously described [29]. A vaginal smear was collected using a micropipette filled with 20 μL of normal saline (0.9% NaCl) and was observed under a light microscope at 100x and 400x magnifications. The vaginal epithelial cells were classified into three types: leukocyte (L) cells, nucleated cells and cornified cells. The proportion of each cell type was used to determine the oestrous phases (pro-oestrous, oestrous, metoestrous and dioestrous)

[30]. The appearance of cornified cells (or a majority of cornified cells) was used as an indicator of oestrogenic activity (oestrous and pro-oestrous phases). The metoestrous and dioestrous phases indicated the non-proliferative phase (atrophy) of the oestrous cycle. Only rats exhibiting normal oestrous cycles were selected for this *in vivo* study. Throughout the treatment period, all the rats underwent a daily vaginal smear cytological analysis to determine the phase of the oestrous cycle.

2.9. Biochemical and hormonal analyses

After the 14-week treatment period, all the rats were deprived of food overnight and were then sacrificed by exsanguination from the abdominal aorta under anaesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine). Blood samples were collected from the abdominal aorta and centrifuged at 3000 rpm for 10 min to extract the serum for biochemical and hormonal profile analyses. Biochemical determinations, including total protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), glucose, urea, creatinine, triglycerides, total cholesterol and lipoprotein fractions were performed with a biochemical analyzer BIO 2000 (Bioplus® Barueri, Brazil) spectrophotometer, using standard kits from Labtest®. The serum oestrogen (E₂) and progesterone (P₄) levels were assayed in duplicate using an ELISA kit manufactured by Diagnostics Biochem Canada Inc (DBC).

2.10. Uterotrophic assay and organ weight

An uterotrophic bioassay of the bilaterally ovariectomised (OVX) female rats was used to determine the oestrogenicity of the extract [31]. The uterine horns and body were dissected and trimmed of fascia and fat. The uterine weight of each rat was calculated by dividing the uterine wet weight by the body weight and multiplying by 100. The adrenal glands, kidneys, liver, hypophysis, heart and spleen were also removed and weighed.

2.11. Histological analysis of the uterus and vagina

The uterus and vagina were collected and immediately immersed in 10% neutral buffered formalin. For each animal, 4-µm-thick paraffin sections were cut and stained with haematoxylin-eosin for morphological examination. The measurements were performed in cross- and longitudinal-embedded tissues, from the middle of the uterus and away from the oviduct or cervix. The thickness of the endometrium (µm), the luminal cell height (µm), the epithelial gland cell height (µm) and the area of the uterine glands (%) were determined histomorphometrically. The thickness of the vaginal epithelium was determined using the distance between the limit of the epithelium with

the connective tissue (basal membrane) to the surface of the outer epithelial zone along a straight line perpendicular to the basal membrane. The histological images were quantified using a microscope (Axioskop 40; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) connected to a digital camera (PowerShot A620; Canon, Tokyo, Japan) interfaced with the ImageJ 1.44C image analysis system (National Institutes of Health, USA). For the statistical analysis, we used the means of 10 measurements from each of 5 animals (50 measurements per group).

2.12. Statistical analysis

The results are expressed as the means $\pm$ the standard error of the mean (S.E.M). Significant differences between the control and experimental groups were assessed with an ANOVA followed by the Newman-Keuls test, using GraphPad Prism software, version 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significance was set at a level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Phytochemical screening of the material

The phytochemical evaluation of the HE of *Morus nigra* detected the presence of phenols and saponins with weakly positive intensity and flavones, flavonols, xanthenes and steroids with strongly positive intensity.

3.2. DPPH radical scavenging activity

The results obtained from the analysis of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract (HE) from *M. nigra* leaves showed that the HE was effective at scavenging free radicals at all the concentrations tested, with a maximum antioxidant activity (AA% max) of 94.2%. The IC₅₀ values indicated that the HE from *M. nigra* had excellent antioxidant activity because the lower concentrations produced high free radical scavenging activity (0.102 $\mu\text{g/mL}$). The IC₅₀ value of the standard compound (quercetin) was 0.0078 $\mu\text{g/mL}$ (**Table 1**).

3.3. Acute oral toxicity

The HE administered p.o. to mice at doses of 0.1-10.0 g/kg had no effect on their behavioural responses, and we did not observe any sedation or other behavioural changes during the observation period of 0, 4, 12, 24 hours and 14 days after administration. No mortality was observed during 14 days of monitoring. Upon necropsy, no significant changes or lesions were observed in the viscera of any animals.

3.4. Body weight, abdominal fat and food intake

The initial body weights were similar among all the experimental groups. As expected, ovariectomy promoted a significant increase in body mass, which was completely reversed by treatment with the HE (500 mg/kg) or the EP solution. No differences in body mass were observed among the SHAM, OVX-EP and OVX-HE groups. The weight of the adipose tissue was also significantly lower in the OVX-EP and OVX-HE groups (**Figure 1**) compared with the OVX group. The increases in body weight were not associated with an increase in food consumption, which remained constant for all the groups throughout the study. The mean amounts consumed by the controls (SHAM and OVX) and the EP- and HE-treated animals were as follows: 17.91 ± 1.47 g/day, 17.70 ± 1.67 g/day, 16.16 ± 1.26 g/day and 16.09 ± 0.68 g/day, respectively.

3.5. Vaginal cornification assay

All the ovariectomised (OVX) rats exhibited predominantly leukocyte-type cells throughout the pre-treatment period after the ovariectomy, which is characteristic of phases with reduced endogenous oestrogen. This finding was confirmed by the absence of endogenous ovarian oestrogen production after the ovaries were completely removed. The vaginal smears taken from all the animals demonstrated that the control SHAM animals experienced regular oestrous cycles, whereas the control OVX group displayed only metoestrous or dioestrous phases (in which only L-type cells were found). The oral administration of EP (50 µg/kg) induced the cornification of the vaginal epithelium as early as the third day of treatment and maintained the animal predominantly in the oestrous phase until the last day of the post-treatment period. The hydroalcoholic extract (500 mg/kg), in turn, induced the oestrous and pro-oestrous phases at 15.25% and 26.6%, respectively (**Table 2**).

3.6. Effects on uterine and organ weights in the OVX rats

The OVX group exhibited significant uterine tissue atrophy (0.034 ± 0.002 g) compared with the SHAM group (0.135 ± 0.007 g), indicating the success of the surgical procedure. The EP administration significantly increased the uterine weight (0.0936 ± 0.011 g) by 173.53% compared with the OVX group (0.034 ± 0.002 g). The mean uterine weight of the OVX-HE group (0.063 ± 0.006 g) was significantly higher than that of the OVX group (0.034 ± 0.002 g), representing an increase of 85.29%

(**Figure 2**). The tissue weights of the heart, liver, spleen, lung, kidney and hypophysis were not significantly different among the groups (**Table 3**).

3.7. Biochemical and hormonal parameters

The effects of *M. nigra* HE on the serum biochemical composition are presented in **Table 4**. There were no significant differences in the serum glucose or cholesterol levels among the groups. The aspartate aminotransferase (AST) level was significantly increased in the OVX group compared with the SHAM group. The administration of HE500 resulted in normal AST levels compared with the SHAM group. The administration of oestrogen-progestins and HE to the OVX rats decreased the triglyceride and VLDL concentrations compared with the SHAM group. The other biochemical parameters of the OVX-control animals and the oestrogen-progestin- and HE500-treated animals were similar to those of the SHAM control animals (**Table 4**).

As expected, the ovariectomised rats had significantly decreased E₂ levels compared with the SHAM group (54.58 ± 4.07 and 96.58 ± 5.98 pg/mL, respectively). Treatment with oestrogen-progestins significantly increased the serum estradiol concentration (91.88 ± 3.75 pg/mL) compared with the OVX group. No changes in estradiol levels were observed following treatment with 500 mg/kg HE (62.00 ± 4.17 pg/mL) compared with the OVX group. Conversely, the levels of progesterone were similar in all the groups (**Table 5**).

3.8. Histomorphometric analyses of the uterine and vaginal epithelial development

The uterine tissue was examined in cross and longitudinal sections, including the endometrium, lumen and uterine glands. Under light microscopy, neither pathologic changes nor architectural or proliferative abnormalities were observed in any of the sections. There was a regression (marked atrophy) of the uterine endometrial epithelium in the OVX group (**Figure 3B**). Upon EP treatment, all the uterine structures were hypertrophic and displayed extensive proliferation of the endometrial luminal epithelium and the stroma (**Figure 3C**). The ovariectomised rats treated with *M. nigra* HE exhibited a slight stimulation of the uterine histoarchitecture (**Figure 3D**). The general histological features of the vaginal squamous epithelium of the OVX-EP group closely resembled those of the SHAM rats. These effects were accompanied by hyperplasia of the vaginal epithelium. After a 14-week administration of HE (500 mg/kg) or EP, the OVX-HE and OVX-EP rats displayed a reversal of the vaginal atrophy and cytoplasmic vacuolisation of the vaginal epithelium (**Figure 4**).

A quantitative comparison of the longitudinal and cross sections of the uterus revealed that the endometrium of the OVX group was dense and thin ($155.7 \pm 0.40 \mu\text{m}$) compared with that of the SHAM group ($330.3 \pm 0.73 \mu\text{m}$). There was little, if any, interstitial space between the stromal cells. The glands were small and closed. The cuboidal luminal ($15.5 \pm 0.19 \mu\text{m}$) and glandular ($9.4 \pm 0.33 \mu\text{m}$) endometrial epithelia were characterised as atrophic. The uteruses of the SHAM group displayed monostratified cylindrical cells in the luminal ($38.09 \pm 0.65 \mu\text{m}$) and glandular ($27.7 \pm 0.54 \mu\text{m}$) epithelia. Treatment with oestrogen-progestins (OVX-EP) significantly increased the endometrial thickness ($304.7 \pm 0.57 \mu\text{m}$) and the structure of the luminal ($60.5 \pm 1.67 \mu\text{m}$) and glandular ($33.3 \pm 0.48 \mu\text{m}$) epithelia by 95.6%, 290.8% and 252.8%, respectively, relative to the OVX group ($p < 0.001$). Similarly, *M. nigra* HE (500 mg/kg) tended to increase the endometrium (1.23-fold), although this was not statistically significant. However, *M. nigra* HE significantly increased the luminal epithelium thickness and the glandular area, although the magnitude of the increase was lower than that induced by EP treatment. A graphical representation of the vaginal epithelial heights (**Figure 4C**) shows that EP administration increased the vaginal epithelial height by 347.3% (from $12.6 \pm 0.53 \mu\text{m}$ to $57.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$, $p < 0.01$). Following treatment with *M. nigra* HE, the vaginal epithelial height ($37.3 \pm 1.77 \mu\text{m}$) was increased by 189.0% at 500 mg/kg BW/day compared with the OVX group ($12.9 \pm 0.53 \mu\text{m}$), $p < 0.01$ (**Table 6**).

4. Discussion

The present study was an investigation of the effects of *M. nigra* L. leaves as a natural alternative to hormone replacement therapy and treatment for menopausal symptoms, particularly hot flashes. Although there is little scientific evidence supporting the use of this plant in this context, the use of plants with oestrogenic effects is a common practice in folk medicine [32].

We used ovariectomised (OVX) rats, which are widely employed as an animal model of menopause, to study oestrogen withdrawal and replacement. Many phenomena observed in this rat model are similar to those that occur in postmenopausal women [10]. Furthermore, the biochemical and physiological changes that occur with the removal of rat ovaries are comparable to those observed in menopausal women [33].

Throughout the treatment period, vaginal cytology was performed to determine the oestrogenic activities of synthetic oestrogens [34] and phyto-oestrogens [35]. These

substances may affect the oestrous cycle and cause several physiological and morphological changes in the uterus, ovaries, and vagina. In rats, the cycle is completed and recurs at 4-5-day intervals [36]. In our study, all the OVX rats exhibited only leukocyte-type cells throughout the pre-treatment period after ovariectomy. This was confirmed by the finding that after the ovaries were completely removed, no endogenous ovarian oestrogens were produced, which suggests that the oestrogen levels are low and the oestrous cycle is blocked in the dioestrous phase, as reported by Westwood [37]. However, the vaginal smears from all the animals in our control SHAM group indicated the presence of regular oestrous cycles, whereas the control OVX group displayed only nonproliferative phases (metoestrous or dioestrous). In contrast, the oral administration of oestrogen-progestins (50 µg/kg) induced a cornification of the vaginal epithelium and maintained the cornified cells until the final day of the post-treatment period. The hydroalcoholic extract of *M. nigra* (500 mg/kg) induced a significant modification of the vaginal smear that indicated prolongations of the pro-oestrous and oestrous phases of 26.6% and 15.2%, respectively (**Table 2**). Plant extracts that have been used to reduce the symptoms of menopause and that contain high levels of isoflavones, such as *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and *Trifolium pratense* L., have also induced a prolonged oestrous phase of the vaginal epithelium in OVX rats, suggesting the oestrogenic nature of the extracts [38, 39].

Furthermore, we carefully measured the serum oestrogen (E₂) and progesterone (P₄) to exclude a possible source of endogenous hormones and to thus ensure that the results obtained from the cytological analysis were due exclusively to the administration of *M. nigra* extract or oestrogen-progestins. The hormonal profiles in our study showed that the ovariectomy significantly decreased the plasma E₂ level (OVX group) compared with the SHAM group. However, these levels were in the physiologic range in the OVX-EP and SHAM groups. The *M. nigra* HE treatment maintained a low level of estradiol. The progestogen levels were similar among all the groups (**Table 5**). This finding is consistent with those of Parhizkar [40], who reported vaginal cornification in OVX rats following *Nigella sativa* L. supplementation despite the presence of low levels of E₂, indicating the oestrogenic activity of these plants. Furthermore, the vagina is the target of oestrogenic substances that induce the proliferation and cornification of the epithelium; these are desired oestrogenic effects because lactobacilli use these cells to produce lactic acid, which keeps the vaginal milieu acidic and prevents ascending infections [41].

The use of uterotrophic assays in OVX rats is another classical method to demonstrate the oestrogenic activity of chemicals or natural compounds [42]. Our study showed that the administration of *M. nigra* HE to OVX rats for 14 weeks significantly increased the uterine weight compared with the control (OVX group). However, the uterine weight increase was significantly lower than that of the OVX-EP group, which indicates that the plant exhibited only weak oestrogenic effects (**Figure 2**). Studies of other plants that contain potential phyto-oestrogens, such as *Morinda citrifolia* and an herbal formula composed of *Lycii fructus*, *Rehmanniae radix*, *Morus alba* and *Carthami flos*, have also demonstrated weak oestrogenic effects, as reflected by changes in uterine weight [43, 44].

Published studies have reported that ovariectomised rats display an oestrogen deficit, which promotes the atrophy of the uterus and reproductive tract; the administration of oestrogenic substances to ovariectomised rats leads to uterotrophic effects, vaginal cornification, increased glycogen and proliferative changes in the uterine endometrium [45]. In the uterus, oestrogen stimulates endometrial proliferation, which may result in endometrial hyperplasia and, eventually, neoplasia [46]. Furthermore, in humans, the endometrial glandular diameter during the proliferative and secretory phases has been correlated with the levels of oestrogen and progesterone. Morphometry has also been applied to the analysis of gland morphogenesis in animals depleted of uterine glands [47].

In our study, rats that were ovariectomised and not treated with *Morus nigra* or oestrogen-progestins exhibited dramatic decreases in vaginal and uterine histomorphometric parameters (glandular epithelial height, endometrial thickness, and glandular diameter and area) compared with the SHAM and OVX-EP groups, both of which exhibited uterine and vaginal hypertrophy. However, the OVX-HE500 group avoided severe atrophy of the uterus and displayed increases in the luminal and glandular area and the vaginal epithelium (**Table 6**). Furthermore, the administration of *M. nigra* HE (500 mg/kg) significantly prevented the atrophy of the vaginal epithelium. We also noted vacuolation of the vaginal epithelial cells, which implied an increase in mucopolysaccharide (glycogen) content [48]. If these findings are extended to humans, they may be of benefit to women who experience vaginal dryness after menopause (**Figure 4**). The positive effects of *M. nigra* HE are most likely due to the high content of flavonoids and/or esters and other previously identified phenolic compounds present in *M. nigra* leaves [22, 49].

There are several classes of phyto-oestrogens: the steroidal oestrogens found in a few plants and the more ubiquitous phenolic oestrogens, isoflavones, coumestans and lignans. Other classes of phyto-oestrogens that have been reported include anthraquinones [50], chalcones [51], flavones [52], prenylflavonoids [53] and saponins [54]. Two new prenylflavonoids (mornigrol E and mornigrol F) have been isolated from *M. nigra* [55]. Furthermore, the stem, bark and wood of *M. nigra* have yielded the stilbenoid oxyresveratrol, four isoprenylated flavonoids, two triterpenes and the steroidal saponin β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside [24]. These observations suggest that the influence of the *M. nigra* extract on the uterus is due its oestrogen-like capacity, which can also be linked to the steroids and flavonoids found in the phytochemical analysis of our extract. Therefore, the results of the vaginal cytology and uterotrophic assays were corroborated by the histological analysis of the uterus and vagina. This qualitative and quantitative analysis of oestrogenic activity was based on analyses of longitudinal and cross sections of uterine tissue, including measurements of the endometrium, lumen, and gland number.

There are reports in the literature that plant extracts containing high levels of anthocyanins and other flavonoids demonstrate high radical scavenging activity when assayed with the DPPH method [56]. After the presence of flavonoids in *M. nigra* HE was verified, we investigated their potential antioxidant activity. Our examination of the antioxidant activity of *M. nigra* extract with the DPPH assay revealed that this extract exhibited potent antioxidant activity (**Table 1**). This finding may be due to the flavonoid content in the HE. Other researchers have demonstrated a positive correlation between the high flavonoid content of *M. nigra* and its ability to scavenge oxidants and free radicals [49, 57]. In addition, the leaves of other plants, such as *Mucuna sempervirens*, are rich in flavonoids that have been identified as the main antioxidant compound using the DPPH assay. Data obtained from an MVLN cell-based assay (using bioluminescent MCF-7-derived cells) showed that flavonoids have oestrogenic activity [58]. Thus, research has demonstrated a positive correlation between the antioxidant activity and isoflavone content of plants [59, 60].

It is well known that ovariectomy, the bilateral removal of the ovaries, results in a reduction in circulating oestrogen and consequently promotes weight gain in rodents [61]. The OVX group in the present work gained significantly more weight than the other groups throughout the study period. In contrast, oestrogen-progestin or *M. nigra* HE (500 mg/kg) treatment significantly decreased body weight. Furthermore, the

weight of the abdominal adipose tissue was also significantly lower in the OVX-EP and OVX-HE groups than in the OVX group (**Figure 1**), which is likely because adipose tissue is responsive to oestrogen and expresses oestrogen receptors [62], which are responsible for the modulation of lipogenesis in this tissue [63]. However, there were no significant differences in food intake among the groups, indicating that food consumption levels do not reflect changes in the amount of adipose tissue. These data suggest that the extract improved obesity without causing hypophagia in the OVX rats, which was possibly due to improved lipid metabolism.

In addition to its effects on adipose tissue, the oral administration of *M. nigra* leaf HE reduced triglycerides and VLDL. Several studies have reported a similar lipid-lowering activity of the ethanolic extract of *Morus alba* leaves. This extract was shown to lower hepatic lipids and body weight in diet-induced obese mice [64] and to decrease blood glucose and plasma triglycerides in the db/db mouse model [65]. The administration of the fruit to rats resulted in significant declines in the levels of serum and liver triglycerides, total cholesterol, and serum low-density lipoproteins [66]. In diabetic rats, *M. nigra* aqueous extract reduced cholesterol, triglyceride and VLDL levels and decreased body weight [16]. These effects can be attributed to the extract's phytoconstituents, such as its phenolic ingredients, which have also been reported for other plant extracts.

Additionally, the acute toxicity study indicated that the HE of *M. nigra* is not toxic when orally administered in a single dose to experimental animals. As has been previously shown for acute toxicity testing procedures, a dose of 2 g/kg of body weight is considered to be the "limit test" [67]. As the effective dose used in this study (500 mg/kg, p.o.) was 20 times lower than the highest dose used in the acute toxicity test (10 g/kg), we can consider this extract safe. Additionally, the liver and kidney biochemical parameters were normal, and there were no significant differences in the internal organ weights (**Table 3**).

In conclusion, the present study clearly provides evidence that the *Morus nigra* L. hydroalcoholic extract contains biologically active compounds with potent antioxidant activity that have slight uterotrophic effects and effects on the maturation of the vaginal epithelium. These compounds also regulate body-weight gain and lipid metabolism and have been shown to be safe. Although more preclinical studies are needed, this herbal plant has the potential to be a good alternative phytopharmaceutical product for pre- and postmenopausal women.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We acknowledge the FAPEMA (*Foundation for the Support of the Research and Scientific and Technologic Development of the State of Maranhão*; Process APP-01156/10) and the CNPq (Brazilian National Research Council; Process 555140/2010) for their financial support.

References

- [1] Amore M, Di Donato P, Berti A, Palareti A, Chirico C, Papalini A, Zucchini S. Sexual and psychological symptoms in the climacteric years. *Maturitas* 2007; 56: 303-11.
- [2] Butler L, Santoro N. The reproductive endocrinology of the menopausal transition. *Steroids* 2011; 76: 627-35.
- [3] Sturdee DW, Panay N. Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric* 2010; 13: 509-22.
- [4] Writing Group for the Women's Health Initiative I. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2002; 288: 321-33.
- [5] Bundred NJ, Morris J. Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362: 1329; author reply 1330-1.
- [6] Herrington DM, Howard TD. From presumed benefit to potential harm--hormone therapy and heart disease. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 519-21.
- [7] Borrelli F, Ernst E. Alternative and complementary therapies for the menopause. *Maturitas* 2010; 66: 333-43.
- [8] Geller SE, Studee L. Contemporary alternatives to plant estrogens for menopause. *Maturitas* 2006; 55 Suppl 1: S3-13.
- [9] Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 62: 35-49.
- [10] Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environ Health Perspect* 2007; 115 Suppl 1: 62-8.
- [11] Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Annals of Internal Medicine* 2002; 137: 805-13.
- [12] Miranda MA, Vieira GDV, Alves MS, Yamamoto CH, Pinho JJRG, Sousa OV. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais. Brasil. *HU Revista (UFJF. Impresso)* 2010; 36: 61-8.
- [13] Khare CP, *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. 2007: Springer.
- [14] Nomura T, Hano Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. *Natural Product Reports* 1994; 11: 205-18.

- [15] de Mesquita Padilha M, Vilela FC, da Silva MJ, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *Journal of Medicinal Food* 2009; 12: 1381-5.
- [16] Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2011.
- [17] Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytotherapy Research* 2004; 18: 365-9.
- [18] Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytotherapy Research* 2010; 24: 1496-500.
- [19] Koyuncu F. Organic Acid Composition of Native Black Mulberry Fruit. *Chemistry of Natural Compounds* 2004; 40: 367-9.
- [20] Özgena M, Serçeb S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae* 2009; 119: 275-9.
- [21] Ercisli S, Orhan E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae* 2008; 116: 41-6.
- [22] Pérez-Gregorio MR, Regueiro J, Alonso-González E, Pastrana-Castro LM, Simal-Gándara J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology* 2011; 44: 1793-801.
- [23] Hu X, Wu J-W, Zhang X-D, Zhao Q-S, Huang J-M, Wang H-Y, Hou A-J. Isoprenylated Flavonoids and Adipogenesis-Promoting Constituents from *Morus nigra*. *Journal of Natural Products* 2011; 74: 816-24.
- [24] Mazimba O, Majinda RRT, Motlhanka D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; 5: 751-4.
- [25] Matos FJA, Introdução a Fitoquímica Experimental. 3ª ed. Fortaleza: Edições UFC; 2009.
- [26] Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TCd, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 2001; 15: 127-30.
- [27] Malone MH. The pharmacological evaluation of natural products-general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology* 1983; 8: 127-47.
- [28] BRASIL, Resolução - RE nº 90, de 16 de março. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 2004.
- [29] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 2002; 62: 609-14.
- [30] Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry* 2005; 80: 79-87.
- [31] Oecd, Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents. 2007: OECD Publishing.
- [32] Schulz V, Hansel R, Tyler VE, Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 4 ed. 2002, São Paulo: Manole.

- [33] Ho Y-J, Wang C-F, Hsu W-Y, Tseng T, Hsu C-C, Kao M-D, Tsai Y-F. Psychoimmunological effects of dioscorea in ovariectomized rats: role of anxiety level. *Annals of General Psychiatry* 2007; 6: 21.
- [34] Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reproductive Toxicology* 2003; 17: 421-32.
- [35] Cherdshewasart W, Traisup V, Picha P. Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *Journal of Reproduction and Development* 2008; 54: 63-7.
- [36] Yuan Y-D, Foley GL, Wanda MH, Colin GR, Matthew A. WalligA2 - Wanda M. Haschek CGR, Matthew AW, 43 - *Female Reproductive System*, in *Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition)*. 2002, Academic Press: San Diego. p. 847-94.
- [37] Westwood FR. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology* 2008; 36: 375-84.
- [38] Circosta C, Pasquale R, Palumbo D, Samperi S, Occhiuto F. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytotherapy Research* 2006; 20: 665-9.
- [39] Occhiuto F, Pasquale RD, Guglielmo G, Palumbo DR, Zangla G, Samperi S, Renzo A, Circosta C. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytotherapy Research* 2007; 21: 130-4.
- [40] Parhizkar S, Latiff LA, Rahman SA, Dollah MA. Evaluation of estrogen-like activity of *Nigella sativa* in ovariectomized rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; 5: 1006-11.
- [41] Heinemann C, Reid G. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Canadian Journal of Microbiology* 2005; 51: 777-81.
- [42] Mariotti KdCs, Schmitt GC, Barreto F, Fortunato RE, Singer RB, Dallegrave E, Leal MB, Limberger RP. Evaluation of anti-estrogenic or estrogenic activities of aqueous root extracts of *Gunnera manicata* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 47: 601-04.
- [43] Chearskul S, Kooptiwut S, Chatchawalvanit S, Onreabroi S, Churintrapun M, Saralamp P, Soonthornchareonnon N. *Morinda citrifolia* has Very Weak Estrogenic Activity In Vivo. *Thai Journal of Physiological Sciences* 2004; 17: 22-9.
- [44] Ma H, Chung MH, Lu Y, Nishihara T, Hattori M. Estrogenic effects of the herbal formula, menoprogen, in ovariectomized rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2010; 33: 455-60.
- [45] Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. *Endocrine activity: antifertility and sex hormones*, F.J. Evans, Editor, *Pharmacological Methods in Selection, preparation, and pharmacological evaluation of plant material*. 1996, New York.: J. Wiley.
- [46] Albertazzi P, Sharma S. Urogenital effects of selective estrogen receptor modulators: a systematic review. *Climacteric* 2005; 8: 214-20.
- [47] Carpenter KD, Gray CA, Noel S, Gertler A, Bazer FW, Spencer TE. Prolactin regulation of neonatal ovine uterine gland morphogenesis. *Endocrinology* 2003; 144: 110-20.

- [48] Gunasegaran JP, *Textbook of Histology and a Practical Guide*. 2007: Elsevier (A Division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd.). 403.
- [49] Pawlowska AM, Oleszek W, Braca A. Qualitative-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 3377-80.
- [50] Matsuda H, Shimoda H, Morikawa T, Yoshikawa M. Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (polygonaceae): structure-Requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; 11: 1839-42.
- [51] Rafi MM, Rosen RT, Vassil A, Ho CT, Zhang H, Ghai G, Lambert G, DiPaola RS. Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid. *Anticancer Research* 2000; 20: 2653-8.
- [52] Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84: 2249-52.
- [53] Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, et al. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med* 1998; 64: 511-5.
- [54] Chan RYK, Chen W-F, Dong A, Guo D, Wong M-S. Estrogen-Like Activity of Ginsenoside Rg1 Derived from *Panax notoginseng*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87: 3691-5.
- [55] Wang L, Gong T, Chen RY. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. *Chinese Chemical Letters* 2009; 20: 1469-71.
- [56] Imran M, Khan H, Shah M, Khan R, Khan F. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *Journal of Zhejiang University - Science B* 2010; 11: 973-80.
- [57] Wang L, Yang Y, Liu C, Chen RY. Three new compounds from *Morus nigra* L. *Journal of Asian Natural Products Research* 2010; 12: 431-7.
- [58] Du Q, Li B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation–DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity. *Food Chemistry* 2012; 131: 1181-6.
- [59] Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S, Malaivijitnond S. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. *Maturitas* 2008; 61: 350-7.
- [60] Cherdshewasart W, Sutjit W. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine* 2008; 15: 38-43.
- [61] Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y, Ezaki O. Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* 2005; 51: 110-7.
- [62] Cooke PS, Naaz A. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Experimental Biology and Medicine* 2004; 229: 1127-35.
- [63] Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2000; 97: 12729-34.
- [64] Oh KS, Ryu SY, Lee S, Seo HW, Oh BK, Kim YS, Lee BH. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism and anti-obesity effects of ethanolic extract from *Morus alba* leaves in diet-induced obese mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 122: 216-20.

- [65] Sugimoto M, Arai H, Tamura Y, et al. Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in db/db mice. *Atherosclerosis* 2009; 204: 388-94.
- [66] Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 2374-79.
- [67] OECD, *Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*. 2002: OECD Publishing.

Table 1. Antioxidant capacity of hydroalcoholic extract from *Morus nigra* L. leaves compared with the positive control quercetin, including the AA% maximum values and the IC₅₀ of the plant extract.

	% Inhibition	
	Quercetin (Mean ± SD)	HE (Mean ± SD)
0.5 µg/mL	76.81 ± 3.52	64.51 ± 3.15*
2.0 µg/mL	83.11 ± 1.58	82.23 ± 1.21
6.0 µg/mL	91.03 ± 0.33	91.75 ± 2.87
10 µg/mL	95.69 ± 1.21	94.18 ± 3.05
IC ₅₀ (µg/mL)	0.0078	0.102*

All data represent the means of triplicate measurements ± standard deviation. The means that do not share a common letter in the columns were significantly different (at * $p < 0.05$) from the quercetin control.

Table 2. Effects of the hydroalcoholic extract from *Morus nigra* L. leaves on the oestrous cycles of Wistar rats.

Oestrous cycle phases	Frequency of the oestrous cycle phases (%)			
	SHAM	OVX	OVX-EP	OVX-HE500
PRO-OESTROUS	17.6	0	17.89**	26.6***
OESTROUS	26.8	0	79.48***	15.25***
METOEESTROUS	12.1	24.6	0***	32.27***
DIOESTROUS	43.4	75.4	2.63***	25.88***

The data are the means ± S.E.M. (n=8-10). Values were considered significant at * $p < 0.001$ compared with the SHAM group or *** $p < 0.001$ compared with the OVX group (ANOVA, Newman-Keuls test).

Table 3. Effect of the hydroalcoholic extract from *Morus nigra* L. leaves on the average organ weights in Wistar rats.

Organ weights (g/100 g)	SHAM	OVX	OVX-EP	OVX-HE500
Heart	0.389 ± 0.008	0.357 ± 0.01	0.359 ± 0.013	0.365 ± 0.016
Liver	2.839 ± 0.28	2.186 ± 0.05	2.540 ± 0.11	2.202 ± 0.05
Kidneys	0.599 ± 0.03	0.528 ± 0.008	0.617 ± 0.02	0.508 ± 0.01
Adrenal glands	0.022 ± 0.0008	0.018 ± 0.001	0.024 ± 0.001	0.025 ± 0.002
Spleen	0.240 ± 0.009	0.234 ± 0.01	0.248 ± 0.004	0.237 ± 0.01
Hypophysis	0.003 ± 0.0003	0.002 ± 0.0009	0.0009 ± 0.0004	0.003 ± 0.0005

The data are expressed as grams/100 grams weight (g/100 g). The values correspond to the weight of both kidneys and adrenal glands (right and left). The values are the means ± S.E.M. (n=8-10). Control: SHAM-operated rats; OVX: ovariectomised rats; OVX-EP: ovariectomised rats administered oestrogen-progestins (EP); and OVX-HE500: ovariectomised rats administered HE 500 mg/kg for 14 weeks.

Table 4. Effects of the hydroalcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves on serum biochemical parameters in Wistar rats after 14 weeks of treatment.

Biochemical parameters	GROUPS			
	SHAM	OVX	OVX-EP	OVX-HE500
Glucose (mg/dL)	152.4 ± 5.3	154.0 ± 5.2	143.3 ± 2.9	150.0 ± 2.0
Cholesterol (mg/dL)	76.7 ± 2.3	75.5 ± 3.6	68.8 ± 3.7	71.6 ± 5.1
HDL (mg/dL)	31.2 ± 1.9	29.0 ± 0.9	30.0 ± 0.6	29.6 ± 1.29
LDL (mg/dL)	37.5 ± 2.4	38.9 ± 3.7	33.1 ± 3.5	36.5 ± 6.0
VLDL (mg/dL)	7.8 ± 0.2	7.5 ± 0.3	5.7 ± 0.4** ^{##}	5.5 ± 0.5** [#]
Triglycerides (mg/dL)	39.2 ± 1.2	37.7 ± 1.5	28.7 ± 2.4** ^{##}	27.5 ± 2.8** [#]
Urea (mg/dL)	58.0 ± 1.2	58.1 ± 0.8	58.3 ± 0.8	59.6 ± 0.9
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.02*	0.5 ± 0.01	0.4 ± 0.02 ^{##}
Total protein (g/dL)	7.6 ± 0.20	7.1 ± 0.26	7.07 ± 0.20	7.08 ± 0.14
Albumin (g/dL)	2.23 ± 0.02	2.14 ± 0.04	2.19 ± 0.01	2.25 ± 0.07
ALP (U/L)	70.6 ± 1.56	64.25 ± 1.92	67.55 ± 2.4	69.76 ± 2.33
AST (U/L)	103.3 ± 12.2	156.7 ± 13.9**	166.4 ± 3.5**	97.6 ± 10.7 ^{##}
ALT (U/L)	63.0 ± 10.5	71.0 ± 5.0	80.6 ± 1.8	73.7 ± 7.6

The data represent the means ± S.E.M. (n = 8-10). Values were considered significant at * $p < 0.05$ compared with the SHAM group; ** $p < 0.01$ compared with the SHAM group; # $p < 0.05$ compared with the OVX group; or ^{##} $p < 0.01$ compared with the OVX group (ANOVA, Newman-Keuls test). HDL = high-density lipoprotein, LDL = low-density lipoprotein, VLDL = very low-density lipoprotein, ALP = alkaline phosphatase, AST = aspartate aminotransferase and ALT = alanine aminotransferase.

Table 5. Effects of the hydroalcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves on serum hormonal parameters in Wistar rats after 14 weeks of treatment.

Hormone	GROUPS			
	SHAM	OVX	OVX-EP	OVX-HE500
Oestradiol, E₂ (pg/mL)	96.58 ± 5.98	54.58 ± 4.07**	91.88 ± 3.75 ^{##}	62.00 ± 4.17**
Progesterone, P₄ (ng/mL)	9.88 ± 2.40	10.13 ± 3.12	14.14 ± 2.43	13.97 ± 1.04

The data represent the means ± S.E.M. (n = 8-10). Values were considered significant at ** $p < 0.01$ compared with the SHAM group or ^{##} $p < 0.01$ compared with the OVX group (ANOVA, Newman-Keuls test).

Table 6. Histomorphometry of the uterine and vaginal epithelium in ovariectomised rats after 14 weeks of treatment with the *Morus nigra* L. HE.

PARAMETER	SHAM	OVX	OVX-EP	OVX-HE500
Endometrium thickness (μm)	330.3 ± 0.73	155.7 ± 0.40**	304.7 ± 0.57 ^{##}	192.6 ± 0.77
Lumen epithelial cell height (μm)	38.09 ± 0.65	15.49 ± 0.19**	60.54 ± 1.67** ^{##}	26.05 ± 0.37 ^{##}
Mean gland area (μm²)	405.4 ± 32.04	160.9 ± 17.76**	907.7 ± 77.84 ^{##}	386.2 ± 46.54 ^{##}
Gland epithelial cell height (μm)	27.77 ± 0.54	9.45 ± 0.33**	33.34 ± 0.48 ^{##}	21.81 ± 0.36 [#]
Number of uterine glands	7.45 ± 0.47	5.7 ± 0.7	4.60 ± 0.60*	6.22 ± 1.18
% Uterine glands	15.91 ± 0.91	4.75 ± 0.49**	29.95 ± 3.14 ^{##}	11.44 ± 1.38 [#]
Vagina epithelium thickness (μm)	50.66 ± 1.60	12.92 ± 0.53**	57.79 ± 1.49 ^{##}	37.34 ± 1.77** ^{##}

The data represent the means ± S.E.M. (n = 5). Values were considered significant at * $p < 0.05$ compared with the SHAM group; ** $p < 0.05$ compared with the SHAM group; # $p < 0.05$ compared with the OVX group; or ^{##} $p < 0.05$ compared with the OVX group (ANOVA, Newman-Keuls test).

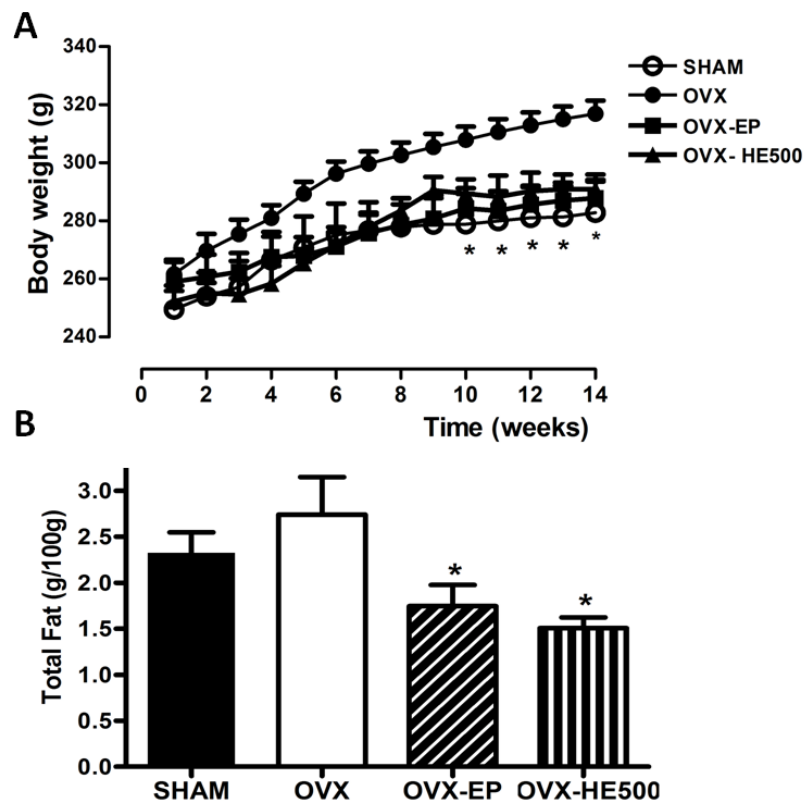


Figure 1. Changes in the body and adipose tissue weights of the rats. (A) Body weight and (B) adipose tissue weight.

SHAM (○), ovariectomised (OVX) (●), OVX-EP (■) and OVX-HE500 (▲). Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. (n = 8-10). * p < 0.05 vs. OVX control (ANOVA, Newman-Keuls test).

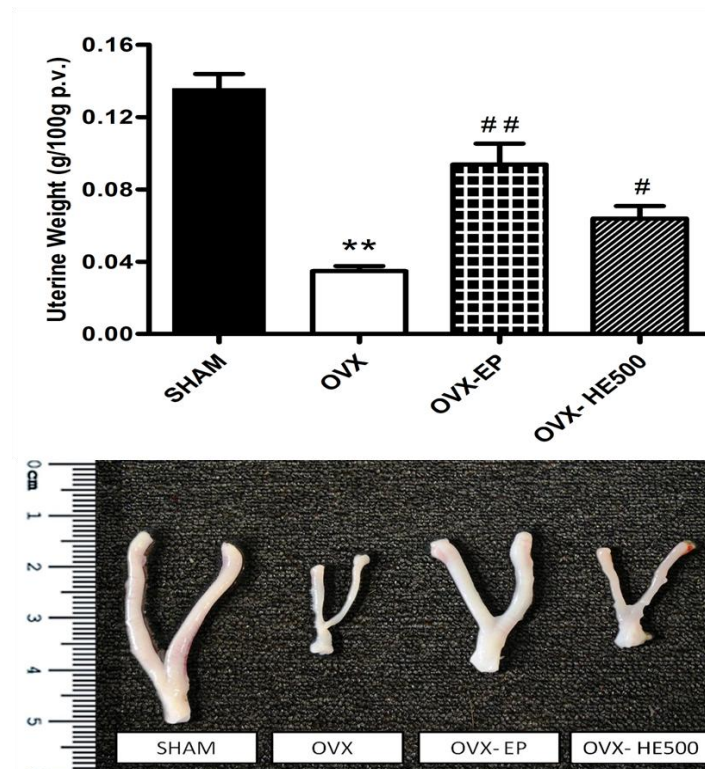


Figure 2. Uterine wet weights after 14 weeks of treatment with saline, oestrogen-progestin drug (50 $\mu\text{g/kg}$) or the *Morus nigra* L. hydroalcoholic extract (HE500). Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. (n = 8-10). ** $p < 0.01$ compared with the SHAM group; ## $p < 0.01$ compared with the OVX group; or # $p < 0.05$ compared with the OVX group (ANOVA, Newman-Keuls test).

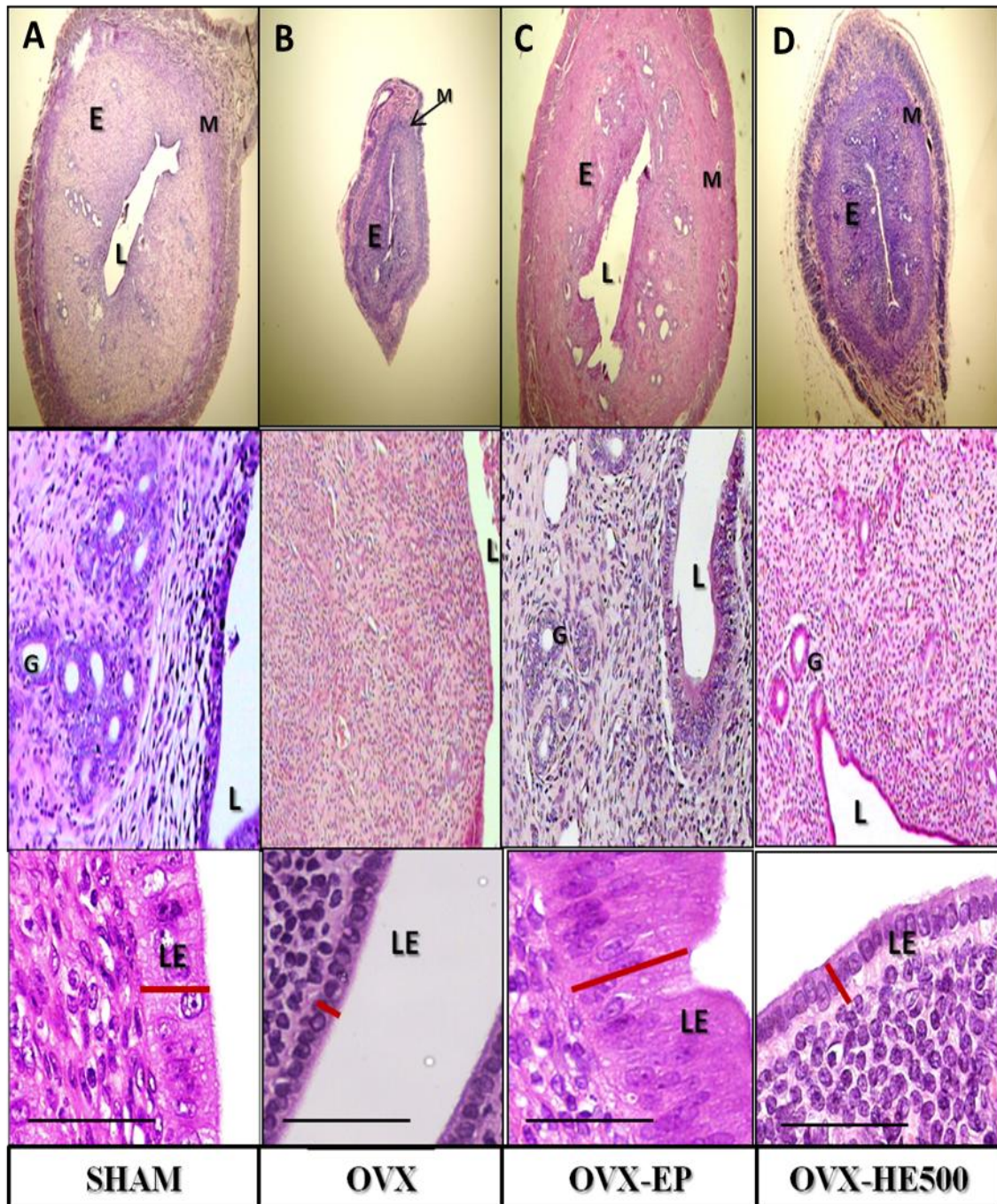


Figure 3. Effects of *Morus nigra* L. on uterine morphology in rats. Cross sections of uterus and endometrium from equivalent regions. In the SHAM group, the endometrium consisted of tall, single-layered epithelial cells with mitotic figures; the stromal cells of the endometrial lamina propria were well organised and spindle-shaped. In the OVX control, the uterus was atrophic with a cuboidal endometrial epithelium, the endometrium contained cuboidal inactive cells and the stroma was less cellular. In the OVX-EP group, all the structures were hypertrophic and hyperplastic, and the endometrial epithelium was multilayered, with squamous metaplasia. In the OVX-HE500 group, *M. nigra* administration resulted in a partial reversal of uterine atrophy. The uterine lumen (L), gland (G), stroma (E), and myometrium (M) are indicated. (H&E, 100× magnification; scale bar=50 µm).

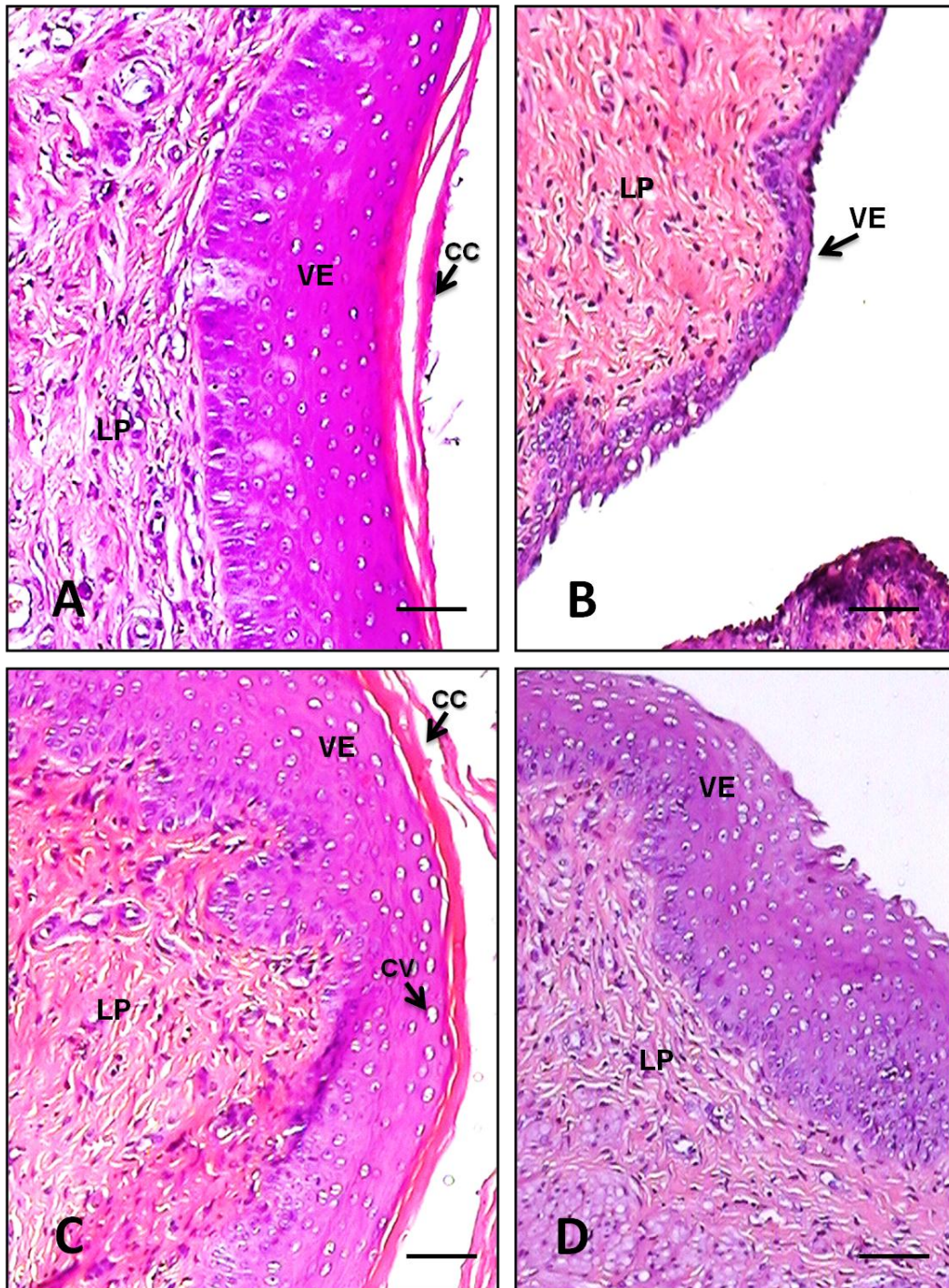


Figure 4. Histopathological examination of the vaginal epithelium of rats. **A:** The SHAM group exhibited more than 6 layers of the normal epithelial cellular lining. **B:** The OVX control group displayed an atrophic vaginal epithelium composed of a few layers of flattened cells. **C:** The OVX-EP group was characterised by hyperplasia and hypertrophy of the vaginal epithelium, with cornified cells (CC) and cytoplasmic vacuolisation (CV). **D:** The OVX-HE group exhibited a moderate reversal of the vaginal atrophy after 14 weeks of *M. nigra* administration (HE-500 mg/kg). (H&E; 100× magnification; VE: vaginal epithelium-stratified squamous; LP: lamina propria; scale bar=16.5 μ m).

5 CAPÍTULO II

**Artigo a ser submetido ao periódico: *Phytotherapy Research*
(ISSN 1099-1573)**

**“Chemical analysis and effect of *Morus nigra* L. (Moraceae)
Leaves on Mammary Epithelial Cell Proliferation”**

Chemical analysis and effect of *Morus nigra* L. (Moraceae) Leaves on Mammary Epithelial Cell Proliferation

Selma do Nascimento Silva^{a,b} and Antônio Carlos Romão Borges^{a,b}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia-RENORBIO; ^bLaboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, S/N, Campus do Bacanga, 65085-580, São Luis, Maranhão, Brazil.

*E-mail: selmansilva@ufma.br; Tel. +55 98 33018533 Fax: +55 98 33018004. (Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos Portugueses, S/N, 65085-580, São Luis, Maranhão, Brazil).

ABSTRACT

Despite the wide use of the leaves of *Morus nigra* L. for the treatment of menopausal complaints, surprisingly little is known on their potential estrogenic properties and about their safety. In this study, we investigated treatment-related changes in mammary gland histomorphology and structure after the oral chronic administration of *M. nigra* hydroalcoholic extract (HE) to ovariectomized (OVX) rats and our estrogenic activity using MCF-7 breast cancer cell proliferation model was determined by measuring MTT assay. The HE was fractionated with hexane (HF), chloroform (CF), ethyl acetate (EtF) and methanol/water (MWF) and the liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) studies of *M. nigra* HE were performed. OVX rats were treated with either the vehicle, the *M. nigra* HE (OVX-HE 500mg/kg) or estroprogestins (50µg/kg), for 14 weeks, by oral route, and a SHAM control group (SHAM) was also included in the study. The histomorphometry showed a larger area of mammary parenchyma in the OVX-EP group ($3.232 \pm 218.2 \text{ mm}^2$; $p < 0.05$) compared with OVX-group ($915.1 \pm 117.0 \text{ mm}^2$) and *M. nigra* HE did not stimulate cell proliferation in the mammary glands ($p > 0.05$) compared with OVX-group. *M. nigra* HE also stimulated proliferation of MCF-7 cells only in low concentration. These data indicate that *M. nigra* HE acts as a weak phytoestrogen and protects against proliferation in human breast carcinoma MCF-7 cells. LC-MS/MS analysis of *M. nigra* HE in comparison with literature showed that the main components that have been detected so far are flavonoids (quercetin and kaempferol) and chlorogenic acids (caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acid isomers). In conclusion, the administration of *M. nigra* HE at high dose had no trophic effect on the mammary glands of rats and the lack of proliferative effects of *M. nigra* extract on estrogen-sensitive breast cancer cells *in vitro* suggests a favorable safety profile for use in women with a history of breast cancer.

Keywords: *Morus nigra* L.; LC-MS/MS; glycosylated flavonoids; MCF-7; mammary glands.

INTRODUCTION

Hormone therapy (HT) is a widely prescribed for the management of menopausal symptoms. However, the safety of estrogen replacement for women with endometrial (Beral *et al.*, 2005) and breast (WHI, 2002) cancers has been questioned after reports that estrogen stimulates proliferation of estrogen-receptor positive tumors. On the basis of this concern, it has been recommended that women with estrogen-sensitive cancers seek alternative methods for alleviating menopausal symptoms (Borrelli and Ernst, 2010).

Recently, the estrogenic activity of isoflavones, lignans, and coumarins, which are widely distributed in vegetables, fruits, and medicinal plants, have been well investigated and these compounds are generally called phytoestrogens (Sunita *et al.*, 2011). They are nonsteroidal, naturally occurring phenolic compounds that can be divided into two groups: firstly, the flavonoids that are further subdivided into isoflavones, coumestans, and prenylflavonoids; and secondly, the nonflavonoids, comprising the lignans. All are polyphenols that have a structural similarity to estradiol and possess estrogenic activity due to having a similar ring as that of estradiol and possessing two hydroxyl groups at positions that afford the correct distance between them to facilitate binding to the estrogenic receptor (Zand *et al.*, 2000). Phytoestrogens with oestrogen-like activities derived from various plants could have beneficial roles in treating human oestrogen deficiency (Lim *et al.*, 2011). These compounds have a wide range of hormonal and nonhormonal activities in animals or *in vitro* tests, and these suggest possible mechanisms for potential physiologic effects of diets rich in isoflavones in humans (Cassidy and Faughnan, 2000). Such constituents are present in some plants such as soybean (*Glycine max* L.) (Nahas *et al.*, 2007), black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.), ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey.) and red clover (*Trifolium pretense* L.) (Cheema *et al.*, 2007) that are popular alternative treatment options available for relief of menopausal symptoms. However, based on their mechanism of action of some of these plants can have side effects similar to estrogens (Liu *et al.*, 2001), thereby increasing the risk of tumor growth and estrogen-receptor positive cell proliferation (Charland *et al.*, 1998). As such, it is important to evaluate the estrogenic effects of alternative therapies.

The ability to precisely measure proliferation in the rat mammary gland is of key importance for preclinical safety testing of pharmaceuticals. Currently, evaluating mammary epithelial proliferation is complicated by the absent or conflicting data about

the effects on proliferation of physiological, patophysiological and anatomical factors such as the estrous cycle, age, pseudo-pregnancy and gland localization. This lack of knowledge is of concern, as these physiological, patophysiological and anatomical factors might overshadow possible minor increases in proliferation associated with compound-mediated preneoplastic changes (Hvid *et al.*, 2012).

Morus nigra L. (Moraceae), a traditional herbal plant used for treatment of menopausal symptoms in Brazil, was selected for the present study. The plant is a rich source of flavonoids including prenylflavonoids (mornigrol E and mornigrol F) (Wang *et al.*, 2009), anthocyanins (cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rutinoside) and flavonols (quercetin 3-glucoside and rutin) (Pérez-Gregorio *et al.*, 2011). The investigation of *M. nigra* bark and leaves yielded a stilbenoid, a 2-arylbenzofuran, four isoprenylated flavonoids, two triterpenes and a steroidal saponin (Mazimba *et al.*, 2011). Dichloromethane extract from leaves of *M. nigra* demonstrated a stronger antinociceptive activity in mice (de Mesquita Padilha *et al.*, 2009) and aqueous extract had antioxidant effect, contributing to reduce incidence of internal anomalies in offspring from diabetic dams (Volpato *et al.*, 2011). Moreover, an herbal formula developed in China to treat perimenopausal symptoms, Menoprogen (MPG), comprises the herbs *Lycii fructus*, *Rehmanniae radix*, *Morus alba* and *Carthami flos*, which are commonly used in traditional Chinese medicine. MPG clinically elevates blood estrogen levels and is regarded as useful for improving menopausal symptoms (Ma *et al.*, 2010).

The estrogenic effect of *M. nigra*, as moderate reversal of vaginal atrophy, has been hypothesized, but no clear *in vitro* and *in vivo* data has been shown (Silva *et al.*, 2012). So, the purpose of this study was to extend our previous observations on the effects of *M. nigra* hydroalcoholic extract in the rat postmenopausal model. Specifically, the following experiments were undertaken to provide additional insight into treatment-related changes in mammary gland histomorphology and structure after the administration of *M. nigra* to ovariectomized rats. Moreover, we evaluated the effect of *M. nigra* HE on the proliferation of estrogen-dependent breast cancer cells (MCF-7) *in vitro* in an effort to further characterize its mechanism of action and to assess the safety of *M. nigra* HE for the treatment of menopausal symptoms in patients with a history of estrogen receptor positive mammary cancer. In addition, to determine the flavonoids in the extract of *M. nigra* using liquid chromatography coupled with ionspray mass spectrometry in tandem mode (LC-MS/MS).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Extraction and Fractionation Procedure

Morus nigra L. leaves were collected from area at Federal University of Maranhão - UFMA (Campus Bacanga), São Luís, Maranhao State, Brazil in May 2008. This material was identified as *Morus nigra* L. (Moraceae) and a voucher specimen (No 1365) was deposited in the Prof^a. Dra. Berta Lange de Morretes Medicinal Plant Garden/ UFMA.

The leaves were dried at room temperature (28–30 °C) and pulverized. The powder was macerated in 70% ethanol at room temperature in a proportion of 1:3 (v/v) with mechanical stirring, on a daily basis. The hydroalcoholic extract (HE) was obtained from this process, bottled in an amber flask and kept under refrigeration at 4°C (yield 21.9%). The HE was fractionated with increasing polarity using hexane (hexane fraction, HF), chloroform (chloroform fraction, CF), ethyl acetate (ethyl acetate fraction, EtF) and methanol/water-1:1 (methanol/water fraction, MWF), under shaking for 30 min. The fractions were dried under vacuum and freeze-dried and were equivalent, respectively, to 5.24%, 3.61%, 2.27% and 73.05% of the dry HE.

High performance liquid chromatography- diode array detector-electro spray ionization-mass spectrophotometer (HPLC-DAD-ESI-MS) Analysis

The hydroalcoholic extract of *M. nigra* leaves were analyzed by HPLC-DAD (LC-10AD, Shimadzu) with photodiode array detector coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS, Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus), with analyzer quadrupole ion trap and electrospray ionization (ESI). An aliquot of 15 µL samples were diluted in Milli-Q water 0.1% formic acid and analyzed by HPLC-DAD, using as mobile phase: Milli-Q water (Millipore) (eluent A) with 0.1% formic acid (Merck) and acetonitrile (HPLC, Merck) (eluent B), using the analytical column reverse phase C18 (250 mm x 4.60 mm, 5 µm). The analysis was performed using dilution gradient, starting with 95% A and 5% B (1 min), 100% B (45 min) and 100% B (60 min), with total time of 60 min. The mass spectra were obtained in negative mode, using ultra-pure nitrogen as nebulization gas flow of 5.0 L / min, pressure 27 psi, 2.5 kV potential, and temperature of 300°C and mass flow of 1.0 mL / min, low resolution, in the range 100 to 3000 m/z. Identification of constituents was made by comparison of their spectra with spectra from the literature.

Animal protocols for in vivo studies

Female Wistar rats (10 - 11 weeks old, 210 - 220 g) from the species *Rattus norvegicus* were used in the experiments. The protocol for these experiments was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Maranhão (Nº 026/2008). All rats were allowed free access to water and pelleted commercial diet during the experimental period. The light/dark cycle was 12 h light and 12 h dark. All rats were ovariectomized (OVX) or sham-operated (SHAM) 21 days before treatment, and randomly divided into groups of 5 rats each: Group I: Sham operated rats (SHAM, saline-10 mL/kg body weight); Group II: Bilaterally ovariectomized rats (OVX, saline-10 mL/kg body weight); Group III: Bilaterally ovariectomized rats (OVX-EP, estrogen/progestins- 50/25 µg/kg; *Natifa Pro*[®]) and Group IV: Bilaterally ovariectomized rats (OVX-HE, *Morus nigra* HE 500 mg/kg). After 21 days, time required to deplete the action of endogenous sex steroids and enter into phase hypoestrogenism; all treatments were given by oral gavage for 14 weeks for HE. After 24 h of last treatment, all the animals were given a xylazine (10 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg) mixture intraperitoneally injected and the first inguinal pair of breasts was removed.

Mammary Gland Histology

The abdominal inguinal mammary glands were collected and immediately immersed in 10% neutral buffered formalin. For each animal, 4 µm-thick paraffin sections were cut and stained either with haematoxylin–eosin for morphological examination. Histologic responses were quantified using a microscope (Axioskop 40; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) adapted to a digital camera (PowerShot A620; Canon, Tokyo, Japan) interfaced with an image analysis system *ImageJ 1.44C* (National Institute of Health, USA). The parameters of estrogenic effects in the mammary glands, we determined the degree of luminal formation and the presence or absence of secretion. For statistical analysis, we used the means of 10 measures from each animal for 5 animals (50 measurements per group).

MCF-7 Cell Proliferation Assay

To evaluate the effect of extract and various solvent fractions on cell proliferation, MTT assay was performed. The extracts were filtrated through a 0.2 µm pore-size membrane filter (Millipore) and stored at 4°C. MCF-7 cells (human breast carcinoma cell line; expresses endogenous ERα) were grown in T-25 flasks (25 cm²) in culture medium consisting of RPMI-1640 with phenol red, supplemented with 10%

fetal bovine serum (FBS), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. The cells were harvested with 0.25% and resuspended in 5% FBS RPMI and the number of viable cells in each sample was determined by trypan blue dye exclusion assay in which viable cells remain transparent, whereas non-viable cells appear blue under the microscope. MCF-7 cells were plated in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells per well and treated with 0, 25, 50, 100 and 200 µg/ml of Isoflavone (contained approximately 52% genistein, 40% daidzein, and 8% glycitein -Galena[®]), extract or fractions or only RPMI (control). After incubating for 48 h, the drug containing medium was aspirated, 10 µl of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) reagent (5mg/ml) added and incubated for 3 h in the dark at 37°C in humidified CO₂ incubator. At the end of incubation, the medium was removed and the formazan crystals formed as a result of MTT metabolism by viable cells were solubilized by the addition of 100µl 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) (in 0.01M HCl) to each well. The plates were further incubated at 37°C overnight. The absorbance of the solubilized product was then measured at 570 nm on an ELISA microplate reader. The absorbance value of the control was set as 100% cell growth and the absorbance values for the other samples were converted to percentage values compared with the control. Each analysis was repeated at least four times.

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard error of mean (S.E.M). Significance differences between control and experimental groups were assessed by ANOVA test, followed by the Newman Keuls test, supported by the *GraphPad Prism*, Inc software, version 5.00 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, USA) at a significance level of $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The growing use of herbal therapies for treatment of menopause symptoms necessitates study of the safety of these natural preparations. In light of the increasing interest in alternative therapies, The North American Menopause Society (NAMS) published a consensus opinion suggesting that, whereas phytoestrogens for the treatment of menopause symptoms are generally safe, additional research on their safety in particular subgroups of women, particularly women who have had breast cancer, is warranted (Eden, 2001; NAMS, 2000).

Thus, the rat mammary gland has been widely studied *in vivo* to elucidate the role of hormones in its development and function because it is similar to the human

breast in many aspects of hormonal regulation of cell proliferation. Using the ovariectomized rat model of menopause, it is possible to investigate the effects of phytoestrogens versus those of estradiol on mammary gland morphology, hormone receptor regulation, and cell proliferation. In this study, to evaluate the effect of chronic administration of *Morus nigra* HE in rat models of menopause-induced, the histopathological analysis of the mammary glands was performed by analyzing the presence of lobulo-alveolar and ductal structures in the H&E-stained paraffin sections. **Figure 1** shows mammary gland sections from the SHAM, OVX, EP and HE-treated rats.

In the morphologic evaluation of mammary glands of intact female rats (SHAM) at the end of the experiment, showed a histological pattern mainly characterized by the presence of terminal ducts and alveolar buds (**Figure 1A**). On the other hand, the removal of endogenous estrogens via the classic hormone ablation model resulted in regression of the mammary gland, particularly the lobulo-alveolar structures. In other words, in OVX rats a regressive process is evident in the structure of the parenchyma. More specifically, most animals had atrophic mammary glands with small ducts lined by a flattened atrophic epithelium and lacking significant lobulo-alveolar structures. Thus, mammary glands from OVX control rats had an increased incidence of atrophy (in 05 of 05 animals) compared with SHAM group (zero of 05 animals) (**Figure 1B**). These findings are consistent with the results reported by Santos (2001), where the castration of rats resulted in decreased rate of proliferation of acinar cells, suggesting that the failure of the menopausal hormone would be a beneficial factor in relation to risk of breast cancer.

The administration of estrogenprogestins to OVX rats induced an increase in duct proliferation and branching with a moderate stimulation of lobulo-alveolar development not different from that of the SHAM controls (**Figure 1C**). These findings were reported by Santos (2001), in which the separate administration of medroxyprogesterone acetate and its association with conjugated estrogens induced greater proliferation of acinar cells. All *M. nigra*-treated rats showed atrophy in the mammary glands with formation of small lumina, but no secretory material was detected. The breasts of the animals belonging to group OVX-HE500 were represented by ducts and rare alveolar mammary immersed in a large area of adipose tissue. The ducts exhibited to consist of two or more layers of epithelial cells surrounded by collagen fibers (**Figure 1D**). Our data showed no proliferative effect in

the breast tissue of ovariectomized rats treated with *M. nigra* HE and are in agreement with a study in OVX rats treated with isoflavones (100 mg/Kg) during 60 days (Piovesan *et al.*, 2005).

Histomorphometric evaluation was performed to estimate the changes of epithelial morphology during different treatments. The histomorphometry of the breast did not differ as to the area of breast parenchyma and the number of ducts and alveoli between the groups treated with *M. nigra* HE ($2.78 \pm 0.21 \text{ mm}^2$) and OVX control ($2.05 \pm 0.24 \text{ mm}^2$). These could be due to lack of estrogen-like effects on the mammary glands of *Morus nigra* L. HE. Moreover, the OVX-EP group showed a higher amount and percentage of area occupied by mammary tissue, as well as ducts and alveoli ($6.26 \pm 0.56 \text{ mm}^2$) compared with the other groups (**Table 1**).

Assuming that estrogenic effects on breast tissue may indirectly estimate the risk of breast cancer development, some studies analyzed the impact of isoflavones on surrogate markers like mammographic density, measurement of the proliferation marker Ki-67 in breast tissue, and others (Yager and Davidson, 2006; Messina and Wood, 2008). Several trials did not show any significant increase in breast tissue proliferation after treatment with isoflavones compared to placebo in both premenopausal and postmenopausal women. Doses of daily isoflavone intake ranged from 36 mg to 120 mg and duration of exposition from 14 days to 12 weeks (Cheng *et al.*, 2007; Sartippour *et al.*, 2004). Also, in accordance with the results on cell proliferation, the trials did not reveal a significant increase of mammographic breast density depending on isoflavone intake. Dietary daily isoflavone intake differed between 40 mg and 99 mg and study duration between 6 months and 1 year (Powles *et al.*, 2008; Verheus *et al.*, 2008).

Hypoestrogenism or ER antagonism in rats unaccompanied by other hormonal changes causes atrophy of the female mammary gland. The atrophy in the female mammary gland affects both the ductular and alveolar components and the fat pad appears prominent because of the loss of the gland parenchyma. The selective estrogen receptor modulators (SERMs) Tamoxifen and toremifene are examples of potent estrogen receptor antagonists in the rat mammary gland that cause decreases in ductal ectasia and mammary gland atrophy in female rats (Greaves *et al.*, 1993; Karlsson *et al.*, 1996). However, the clinical impact of using isoflavones is still controversial. In regard to its effects on the breasts, Wood *et al.* (2006) observed it has an anti-estrogenic effect while other authors observed estrogenic effects. In this way, the phytoestrogens naturally produced chemicals by either plants or their seeds, appear to have both

estrogenic and antiestrogenic effects. Therefore, these have been considered as a part of selective estrogen receptor modulators (SERMs) and studied as the alternative HRT (Palacios, 2011).

To determine the influence of one such alternative, *Morus nigra*, on estrogen-dependent mammary cancers, we conducted an *in vitro* investigation of the effect of *M. nigra* extract and fractions on the proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells, a human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell test system, an established *in vitro* model for estrogen-dependent tumors. The estrogen-positive cell line MCF-7 is a suitable cell model for study of estrogenic effects. Because the proliferative effect of natural estrogen is considered the hallmark of estrogen action, it was proposed that this property be used to determine whether a substance is an estrogen. Therefore, this assay developed for this purpose, is based on the ability of MCF-7 cells to proliferate in the presence of estrogens (Villalobos *et al.*, 1995). In the present study, under the conditions where medium (negative control) showed the maximum proliferation of cells (100%), *M. nigra* HE, CF and EtF at concentration of 25 µg/mL produced significant proliferation in MCF-7 ($P < 0.05$), corresponding to a cell-proliferating activity of 16.02, 17.91, 19.84% of control, respectively, suggesting that these samples are agonistic for estrogen receptors in low concentrations (25 µg/mL). Similarly, isoflavones showed significant cell proliferating activity at same concentration (cell-proliferating activity 19.55% of control) (**Figure 2**). On the other hand, *M. nigra* HE, ISO and EtF did not show any substantial cell-proliferating activity at concentrations higher than 25 µg/mL. Of the four fractions analyzed, only CF showed the highest level of cell proliferation. At the lowest concentration tested (25 µg/mL), estrogenic activity was 17.91% and increased to 29.36% at 200 µg/mL. This finding was in agreement with data reported by other authors that chloroform extract of *Trigonella foenum-graecum* promoted the growth of MCF-7 cells (Sreeja *et al.*, 2010).

Ethyl acetate fraction (EtF) induced proliferation in MCF-7 cells at a low concentration (25 µg/mL). However, at high concentrations (100 and 200 µg/mL) it antagonized MCF-7 cell proliferation, representing cytotoxicity. Such data that suggest a non-estrogenic, or estrogen-antagonistic effect of *M. nigra* EtF on human breast cancer cells lead to the conclusion that *M. nigra* treatment may be a safe, natural remedy for menopausal symptoms in breast cancer. So, these dates indicate that some of the active compounds (estrogenic) present in *M. nigra* leaves are of low polarity and

that test fractions have the weak estrogenic activities, and the observed effect was induced through a classical estrogen response pathway by an interaction with the ER. These results are similar to those from a previous investigation with *Butea superba* and *Mucuna collettii* that exhibited only anti-proliferation effects on the growth of MCF-7 cells (Cherdshewasart *et al.*, 2004), probably related to a possible anti-estrogen mechanism or a potent cytotoxic effect.

Some authors showed that genistein would be a preventive for developing breast cancer by having antiproliferative properties (Fritz *et al.*, 1998) while others showed that phytohormones stimulate the growth of estrogen-dependent tumors (Hsieh *et al.*, 1998). The antagonistic activity of isolated flavonoids against 17 β -estradiol may help to reduce the risk of estrogen-mediated cancer and be applicable to clinical trials for breast cancer in postmenopausal women who are treated with estrogen replacement therapy. Several plant species rich in flavonoids are reported to reduce disease risk and have therapeutic properties. This observation is of particular importance since flavonoids are ingredients of many vegetables and fruits (Ferguson *et al.*, 2004; Kanadaswami *et al.*, 2005). A recent study found that prenylated flavonoids of *Morus alba* leaves exhibited strong cytotoxic (by the MTT method) effects against three cancer cell lines (MCF-7) while kaempferol showed a weak effect. This indicated that the prenyl or geranyl group as well as their cyclization with the hydroxy group increased the cytotoxicity of flavone (Dat *et al.*, 2010).

The reason for these observations is not yet clear, but these results suggest that different mechanisms may be involved in the growth stimulation and inhibition induced by these phytoestrogens. Further investigation will be required to identify the precise mechanisms involved. In the MCF-7 cell proliferation assay, the cells show wide variation in regard to their sensitivity to estradiol. Furthermore, since proliferation of MCF-7 cells can be influenced not only by estrogens but also by cytokinins, growth factors, mitogens, and nutrients, it is sometimes difficult to conclude that the proliferation is just due to the presence of phytoestrogens in the plant extract. This way, the results of the study lead not only to the conclusion that the plant exhibited chemovariety but also lead to the issue that the collection of the leaves in different locations, whether or not change the isoflavone content, and therefore exhibit different levels of estrogenic activity; once a recent study of the plant did not detect estrogenic activity in another experimental model (de Queiroz *et al.*, 2012).

To identify active compounds in *Morus nigra* leaves extract, LC-ESI-MS/MS was used. The data of retention times (RT), molecular weight and the maximal UV wavelength (λ_{max}) and MSn data of the flavonoids detected in the *M. nigra* extract are listed in **Table 2**. MS data were acquired in negative ionization mode. The negative mode was chosen for mass spectrometry to be more sensitive analysis of flavonoids and fragmentation behavior provides additional information for identifying compounds (Cuyckens and Claeys, 2004).

In this study, a total of 17 compounds were characterized. Five of them were unambiguously identified by comparing retention times (RT), UV and MS data from the literature. The HPLC-DAD chromatogram and total ion chromatograms (TIC) in negative mode of the extract of *M. nigra* is shown in **Figure 3**. The compounds were identified according to their fragmentation data and UV absorption and some of their structures are shown in **Figure 4**.

Based on the results of the LC–DAD–MS analyses of *M. nigra* hydroalcoholic extract revealed the presence of some compounds not isolated. Five of them were recognized as Dimer of caffeic acid-*O*-hexose (**1a**), 3-*O*-Caffeoylquinic acid- hexose (**1b**), Quercetin-diglucoside-rhamnoside (**4a**), Quercetin-3-*O*-glucoside-7-*O*-glucoside (**4b**) and Kaempferol 3-*O*-glucoside-7-*O*-glucoside (5) by comparison of their HPLC retention times, elution orders, ESI-MS spectrometric data, and photodiode array PDA/UV/Vis with reference standards.

Compound **1a** (RT = 2.7; m/z 683) was unambiguously identified as Dimer of caffeic acid-*O*-hexose considering its MS² spectra in the negative mode that showed one main fragment: m/z 341, corresponding to the loss of a hexose molecule $[M-H^- 342]^-$. The compound **1b** (RT= 2.9; m/z 533) was unambiguously as 3-*O*-Caffeoylquinic acid-hexose considering its MS² spectra in the negative mode that showed one main fragment: m/z 191, also corresponding to the loss of a hexose molecule $[M-H^- 342]^-$ (**Table 2**).

The MS/MS spectrum of compound **4a** (Quercetin-diglicosideo-rhamnoside) obtained for the ion at m/z 771.6, showing the fragment ions at m/z 609 $[M-H-162]^-$ and 301 $[M-H-146-162]^-$, corresponded to the loss of one glucosil unit (162u), followed by one glucosil and one rhamnosil (162 + 146 u), respectively. The MS² of compound **4b** (Quercetin-3-*O*-glucoside-7-*O*-glucoside) obtained for the ion at m/z 625.5, showing the fragment ions at m/z 463 $[M-H-162]^-$ and 301 $[M-H-162-162]^-$, corresponded to the loss of one glucosil unit (162u), followed by more two glucosils (162 + 162 u),

respectively. Furthermore, its UV spectrum with λ_{max} at 350nm was typical of flavonol derivatives (Wollenweber, 1982), confirming the hypothesis that compounds 4a and 4b were a glycosilated flavonol, probably a quercetin derivative (**Table 2 and Figure 4a**).

Compound 5 showed a singly charged signal at m/z 609.7 ($RT=10.0$). Its identity was confirmed by the MS^2 spectrum. MS^2 fragmentation of the ion at m/z 609.7 gave two signals at m/z 447 and 285, corresponding to the loss of a glucosil molecule $[M-H^- 162]^-$ and the loss of the upper two glucosil units $[M-H^- 162 + 162]^-$, respectively. It was identified as Kaempferol 3-*O*-glucoside-7-*O*-glucoside (**Figure 4b**).

Flavonoids, a group of natural phytoestrogens, are present in plants as glycoside conjugates. Recently, kaempferol has been found to be responsible for majority of estrogenic activity in red wine which earlier was thought to be due to *trans*-resveratrol, suggesting the importance of polyphenolic composition of wine (Zoechling *et al.*, 2009). Kaempferol (flavonoids compounds in honey) also has osteogenic effect in ovariectomized rats (Trivedi *et al.*, 2008). Extracts of *Ginkgo biloba* extract (GBE), for example, contain flavonoids, such as quercetin, kaempferol, isorhamnetin (Smith *et al.*, 1996; Kleijnen and Knipschild, 1992) and may be used as alternative HRP for estrogen-deficient symptoms. In addition, it was confirmed that GBE bind directly to $ER\alpha$ and $ER\beta$ and its binding affinity $ER\beta$ was higher than $ER\alpha$. Since its major components such as quercetin, kaempferol, isorhamnetin showed the same effects to ER, it was supposed that ER binding affinity of GBE was caused by its major components (Oh and Chung, 2004).

The results show that *M. nigra* is appreciable sources of flavonoids, which are considered to have possible protective effects on human health, as suggested by recent epidemiological and experimental studies. Taking together the findings of this study and those of previous investigations (Ercisli and Orhan, 2007; Koyuncu, 2004; Dugo *et al.*, 2001; Hassimotto *et al.*, 2005) into phenolic compounds and their activity, it becomes evident that mulberry is promising source of potent natural antioxidants which should be considered for future exploitation.

Several such phytoestrogens are used for human welfare, particularly woman. For example, resveratrol has been reported to suppress breast cancer (Whitsett *et al.*, 2006). The ability of phytoestrogens to alleviate menopausal symptoms and reduce breast cancer risk has surged extensive research towards evaluation of phytoestrogens for female reproductive health (Umland *et al.*, 2000). The present investigation is yet

another attempt in this direction and shows the presence of compound(s) functionally similar to ovarian estrogen and/or estradiol in the leaves of *M. nigra* that can induce cellular maturation in vaginal epithelium (Silva *et al.*, 2012).

CONCLUSION

The frequency of diseases associated with female hormones is increasing as society ages. *Morus nigra* is a promising therapeutic agent for menopausal woman because of its low risk of causing hormone dependent breast cancer. However, a clear understanding of uptake, metabolism and bioavailability of the compounds (flavonoids and chlorogenic acids) of this plant is crucial to elucidate its health benefits / adverse effects.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the FAPEMA (*Foundation for the Support of the Research and Scientific and Technologic Development of the State of Maranhão*; Process APP-01086/10) and the CNPq (Brazilian National Research Council; Process 555140/2010) for their financial support.

REFERENCES

- Beral V, Bull D, Reeves G, Collaborators MWS. 2005. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet* **365**: 1543-51.
- Borrelli F, Ernst E. 2010. Alternative and complementary therapies for the menopause. *Maturitas* **66**: 333-43.
- Cassidy A, Faughnan M. 2000. Phyto-oestrogens through the life cycle. *Proceed Nutrit Soc* **59**: 489-96.
- Charland SL, Hui JW, Torosian MH. 1998. The effects of a soybean extract on tumor growth and metastasis. *Int J Mol Med* **2**: 225-228.
- Cheema D, Coomarasamy A, El-Toukhy T. 2007. Non-hormonal therapy of post-menopausal vasomotor symptoms: a structured evidence-based review. *Arch Gynecol Obstet* **276**: 463-9.
- Cheng G, Wilczek B, Warner M, Gustafsson JA, Landgren BM. 2007. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause* **14**: 468-73.
- Cherdshewasart W, Cheewasopit W, Picha P. 2004. The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*), and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. *J Ethnopharmacol* **93**: 255-60.
- Cuyckens F, Claeys M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* **39**: 1-15.
- Dat NT, Binh PT, Quynh le TP, Van Minh C, Huong HT, Lee JJ. 2010. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. *Fitoterapia* **81**:1224-1227.

- de Mesquita Padilha M, Vilela FC, da Silva MJ, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. 2009. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *J Med Food* **12**: 1381-1385.
- de Queiroz GT, Santos TR, Macedo R, Peters VM, Leite MN, da Silveira ESRC, Guerra Mde O. 2012. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. *Food Chem Toxicol* **50**: 816-822.
- Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C. 1997. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* **337**: 1641-1647.
- Dugo P, Mondello L, Errante G, Zappia G, Dugo G. 2001. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *J Agric Food Chem* **49**: 3987-3992.
- Eden JA. 2001. Herbal medicines for menopause: do they work and are they safe? *Med J Aust* **174**: 63-64.
- Ercisli S, Orhan E. 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry* **103**: 1380-1384.
- Ferguson PJ, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ. 2004. A Flavonoid Fraction from Cranberry Extract Inhibits Proliferation of Human Tumor Cell Lines. *J Nutrit* **134**: 1529-1535.
- Folman Y, Pope GS. 1966. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. *J Endocrinol* **34**: 215-225.
- Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. 1998. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* **19**: 2151-2158.
- Gennari L, Merlotti D, Nuti R. 2010. Selective estrogen receptor modulator (SERM) for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women: focus on lasofoxifene. *Clin Interv Aging* **5**: 19-29.
- Greaves P, Goonetilleke R, Nunn G, Topham J, Orton T. 1993. Two-Year Carcinogenicity Study of Tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived Rats. *Cancer Res* **53**: 3919-3924.
- Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. 2005. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *J Agric Food Chem* **53**: 2928-2935.
- Hvid H, Thorup I, Sjogren I, Oleksiewicz MB, Jensen HE. 2012. Mammary gland proliferation in female rats: Effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. *Exp Toxicol Pathol* **64**: 321-332.
- Kanadaswami C, Lee L-T, Lee P-PH, Hwang J-J, Ke F-C, Huang Y-T, Lee M-T. 2005. The Antitumor Activities of Flavonoids. *In Vivo* **19**: 895-909.
- Karlsson S, Hirsimaki Y, Mantyla E, Nieminen L, Kangas L, Hirsimaki P, Perry CJ, Mulhern M, Millar P, Handa J, Williams GM. 1996. A two-year dietary carcinogenicity study of the antiestrogen toremifene in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol* **19**: 245-266.
- Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM. 1997. Antiestrogens: Mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **44**: 23-38.
- Kleijnen J, Knipschild P. 1992. *Ginkgo biloba* for cerebral insufficiency. *Br J Clin Pharmacol* **34**: 352-358.

- Koyuncu F. 2004. Organic Acid Composition of Native Black Mulberry Fruit. *Chem Nat Comp* **40**: 367-369.
- Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, Bhat KPL, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HHS, Farnsworth NR, Bolton JL. 2001. Evaluation of Estrogenic Activity of Plant Extracts for the Potential Treatment of Menopausal Symptoms. *J Agric Food Chem* **49**: 2472-2479.
- Ma H, Chung MH, Lu Y, Nishihara T, Hattori M. 2010. Estrogenic effects of the herbal formula, menoprogen, in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull* **33**: 455-60.
- Mazimba O, Majinda RRT, Motlhanka D. 2011. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *Afr J Pharm Pharmacol* **5**: 751-754.
- Messina MJ, Wood CE. 2008. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr J* **7**: 17.
- Nahas EAP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Carvalho EP, Oliveira MLCS, Dias R. 2007. Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Maturitas* **58**: 249-258.
- NAMS. 2000. The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of The North American Menopause Society. *Menopause* **7**: 215-229.
- Oh S-M, Chung K-H. 2004. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Life Sci* **74**: 1325-1335.
- Palacios S. 2011. Selective estrogen receptor modulators: the future in menopausal treatment. *Minerva Ginecol* **63**: 275-286.
- Pérez-Gregorio MR, Regueiro J, Alonso-González E, Pastrana-Castro LM, Simal-Gándara J. 2011. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology* **44**: 1793-1801.
- Piovesan AC, Soares Júnior JM, Mosquette R, Simões MdJ, Simões RdS, Baracat EC. 2005. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. *Rev Bras Ginecol Obstetríc* **27**: 204-209.
- Powles TJ, Howell A, Evans DG, McCloskey EV, Ashley S, Greenhalgh R, Affen J, Flook LA, Tidy A. 2008. Red clover isoflavones are safe and well tolerated in women with a family history of breast cancer. *Menopause Int* **14**: 6-12.
- Santos LOM, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. 2001. Efeito dos Estrógenos Conjugados e da Medroxiprogesterona sobre a Mama: Estudo Experimental. *Rev Bras Ginecol Obstetríc* **23**: 507-513.
- Sartippour MR, Rao JY, Apple S, Wu D, Henning S, Wang H, Elashoff R, Rubio R, Heber D, Brooks MN. 2004. A pilot clinical study of short-term isoflavone supplements in breast cancer patients. *Nutr Cancer* **49**: 59-65.
- Silva SN, Borges MOR, Borges ACR. 2012. Evaluation of the Estrogenic Effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) Leaves in Ovariectomized Rats. *Maturitas*. The European Menopause Journal. Manuscrito em preparação- 2012.
- Smith PF, MacLennan K, Darlington CL. 1996. The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol* **50**: 131-139.
- Sreeja S, Anju V. 2010. In vitro estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds. *Indian J Med Res* **131**: 814-819.
- Sunita P, Pattanayak SP. 2011. Phytoestrogens in postmenopausal indications: A theoretical perspective. *Pharmacogn Rev* **5**: 41-47.
- Trivedi R, Kumar S, Kumar A, Siddiqui JA, Swarnkar G, Gupta V, Kendurker A, Dwivedi AK, Romero JR, Chattopadhyay N. 2008. Kaempferol has osteogenic

- effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. *Mol Cell Endocrinol* **289**: 85-93.
- Umland EM, Cauffield JS, Kirk JK, Thomason TE. 2000. Phytoestrogens as Therapeutic Alternatives to Traditional Hormone Replacement in Postmenopausal Women. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **20**: 981-990.
- Verheus M, van Gils CH, Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Peeters PHM, Grobbee DE, van der Schouw YT. 2008. Soy Protein Containing Isoflavones and Mammographic Density in a Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**: 2632-2638.
- Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. 1995. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect* **103**: 844-850.
- Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. 2011. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **138**: 691-696.
- Wang C, Kurzer MS. 1997. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer* **28**: 236-247.
- Wang L, Gong T, Chen RY. 2009. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. *Chinese Chemical Letters* **20**: 1469-1471.
- Whitsett T, Carpenter M, Lamartiniere CA. 2006. Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. *Journal of Carcinogenesis* **5**:1-11.
- Wollenweber E. 1982. The flavonoids- advances in research Chapman & Hall, London.
- Wood CE, Register TC, Franke AA, Anthony MS, Cline JM. 2006. Dietary Soy Isoflavones Inhibit Estrogen Effects in the Postmenopausal Breast. *Cancer Res* **66**: 1241-1249.
- Writing Group for the Women's Health Initiative I. 2002. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA* **288**: 321-333.
- Yager JD, Davidson NE. 2006. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* **354**: 270-282.
- Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP. 2000. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat* **62**: 35-49.
- Zoechling A, Reiter E, Eder R, Wendelin S, Liebner F, Jungbauer A. 2009. The Flavonoid Kaempferol Is Responsible for the Majority of Estrogenic Activity in Red Wine. *Am J Enol Vitic* **60**: 223-232.

Table 1. Histomorphometry of mammary gland in rats.

PARAMETER	SHAM	OVX	OVX-EP	OVX-HE
<i>Area occupied by parenchymal (mm²)</i>	2.645±223.8	915.1±117.0**	3.232±218.2** ^{##}	985.2±93.93 ^{##}
<i>Secretion intra-ductal</i>	Present/Absent	Absent	Present	Absent
<i>%Area occupied by mammary tissue</i>	12.31±1.04	4.25±0.54**	15.04±1.01 ^{##}	4.58±0.43 [#]
<i>Numbers of ducts and alveoli/mm²</i>	4.22±0.41	2.05±0.24**	6.26±0.561 ^{##}	2.78±0.217** ^{##}

Values in the table are means ± S.E.M. (n=5). Values are statistically significant at ** $p < 0.05$, compared with the SHAM group; [#] $p < 0.05$, compared with the OVX group; ^{##} $p < 0.05$, compared with the OVX group (ANOVA, Newman Keuls test).

Table 2. Compounds identified by LC-ESI-MS/MS in the negative mode in *Morus nigra* L. HE; $\lambda_{\text{max}} = 350\text{nm}$ (see Figure 3b).

Peak	Proposed compound	RT (min)	m/z Value [M-H] ⁻	MS/MS fragments (m/z)
1a	Dimer of caffeic acid-O-hexose	2.7	683	341
1b	3-O-Caffeoylquinic acid- hexose	2.9	533	191
2	Unknown	7.8	613.5	567.2
3	Unknown	8.5	595.4	549.3
4a	Quercetin-diglucoside-rhamnoside	9.2	771.6	609.1
4b	Quercetin-3-O-glucoside-7-O-glucoside	9.2	625.5	463; 301
5	Kaempferol 3-O-glucoside-7-O-glucoside	10.0	609.7	447; 285
6	Unknown	10.7	579.4	533.2
7	Unknown	25.8	615.7	307.1; 211
8	Unknown	26.8	883.7	837.4
8	Unknown	26.8	837.7	559.2
9	Unknown	28.8	721.6	675.3
10	Unknown	31.2	647.5	601.3
11	Unknown	32.8	699.6	653.4
12	Unknown	34.1	609.6	293.1; 245.9
13	Unknown	35.8	647.5	629.3; 537.9; 468.8; 359.0
14	Unknown	44.3	631.6	277.1
15	Unknown	47.1	609.6	279.0
16	Unknown	48.0	637.4	593.3; 564.2; 503.3
17	Unknown	50.0	585.7	255.1

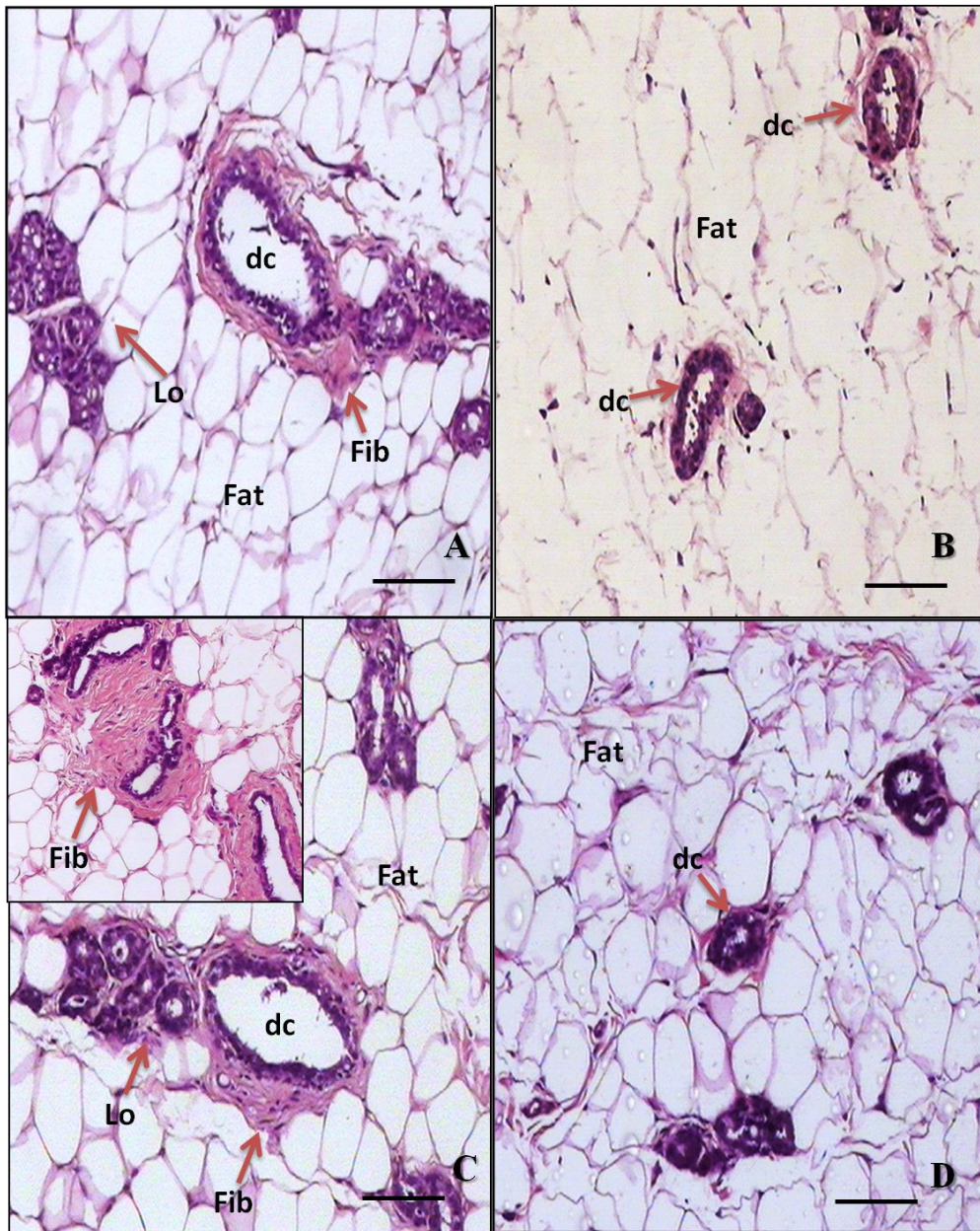


Figure 1. Histology of the mammary gland from female rats: SHAM (A), OVX (B), OVX-EP (C) and OVX-HE (D). Intralobular ducts and alveoli from females given saline (B) or *M. nigra* HE (D) are lined by a single layer of cuboidal epithelial cells with scant cytoplasm and atrophic ducts (du) with the absence of lobulo-glandular elements (Lo). Intralobular ducts in OVX-EP group (C) are lined by 2 or more layers of epithelial cells with abundant, vacuolated, eosinophilic cytoplasm. SHAM group rats (A) have ducts and alveoli comparable to vehicle (B). Lo (lobules); dc (ducts) and Fib (fibrosis). Scale bar: 20µm. Hematoxylin and eosin; magnification 100x.

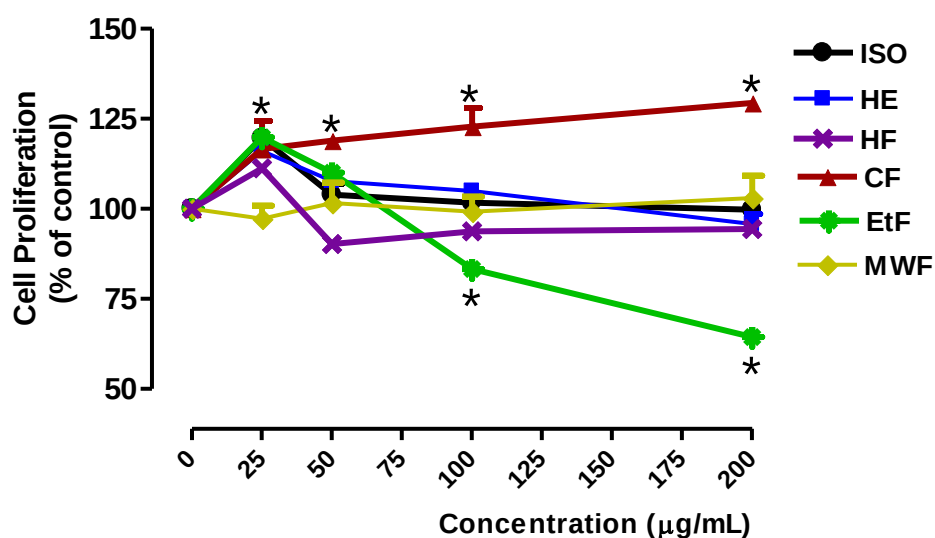


Figure 2. Effect of *Morus nigra* L. leaves extracts and isoflavones on proliferation of MCF-7 cells. Cells were exposed to extract or fractions (25- 200 µg/ml) for 48 hours. C=control, ISO=Isoflavone, HE= hydroalcoholic extract, HF= hexane fraction, CF= chloroform fraction, EtF= ethyl acetate fraction and MWF=methanol/water fraction. Each value represents the mean±SEM of four experiments. Asterisks denote significant differences from the control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

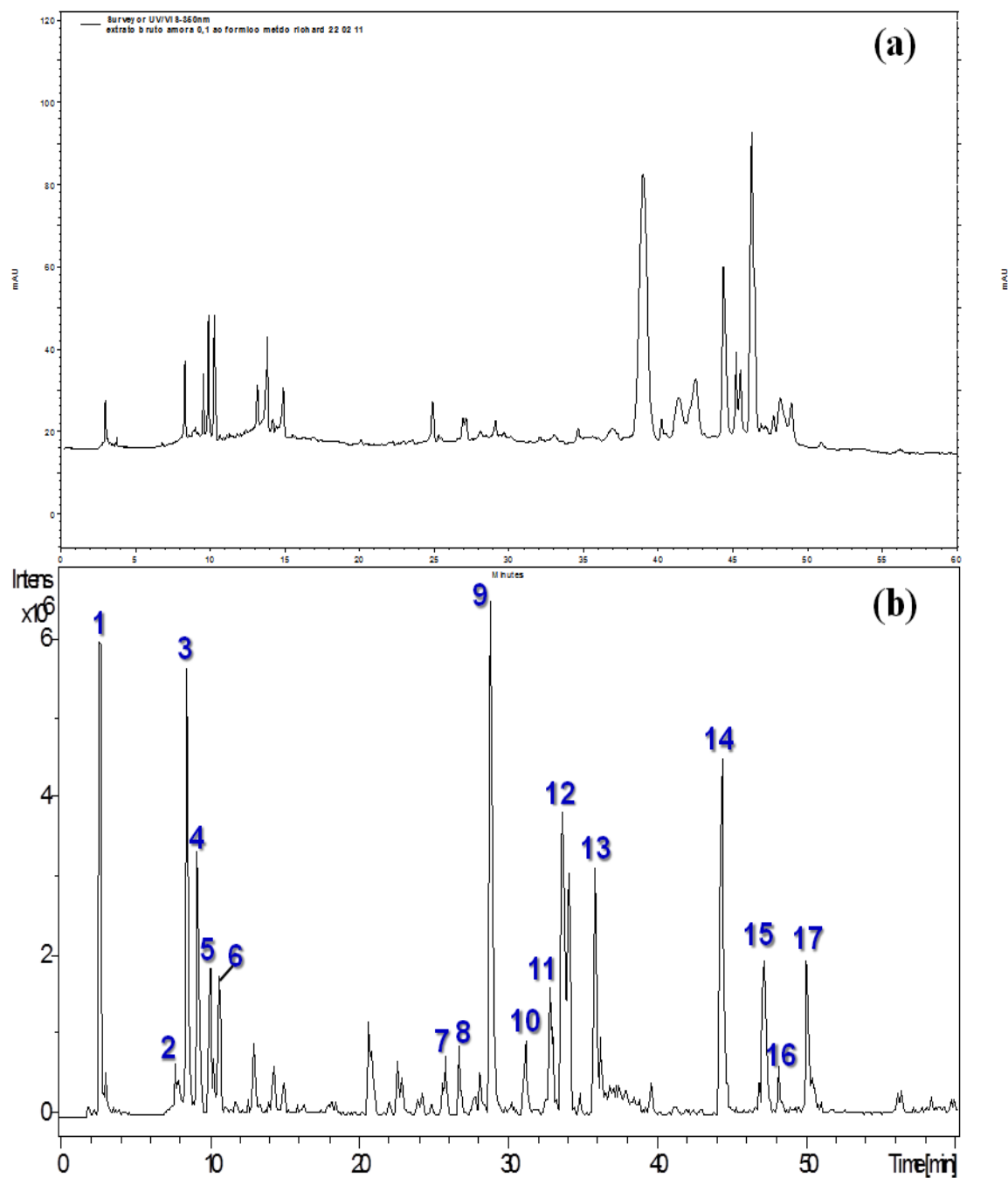


Figure 3. HPLC-DAD-ESI-MS_n analysis of the hydroalcoholic extract of *M. nigra*. (a) HPLC-UV chromatogram of extract, $\lambda=350$ nm. (b) Total ion chromatogram (TIC) of negative model of extract from LC-(-) ESI-MS. For the identification of peaks signed from 1 to 17 see **Table 2**.

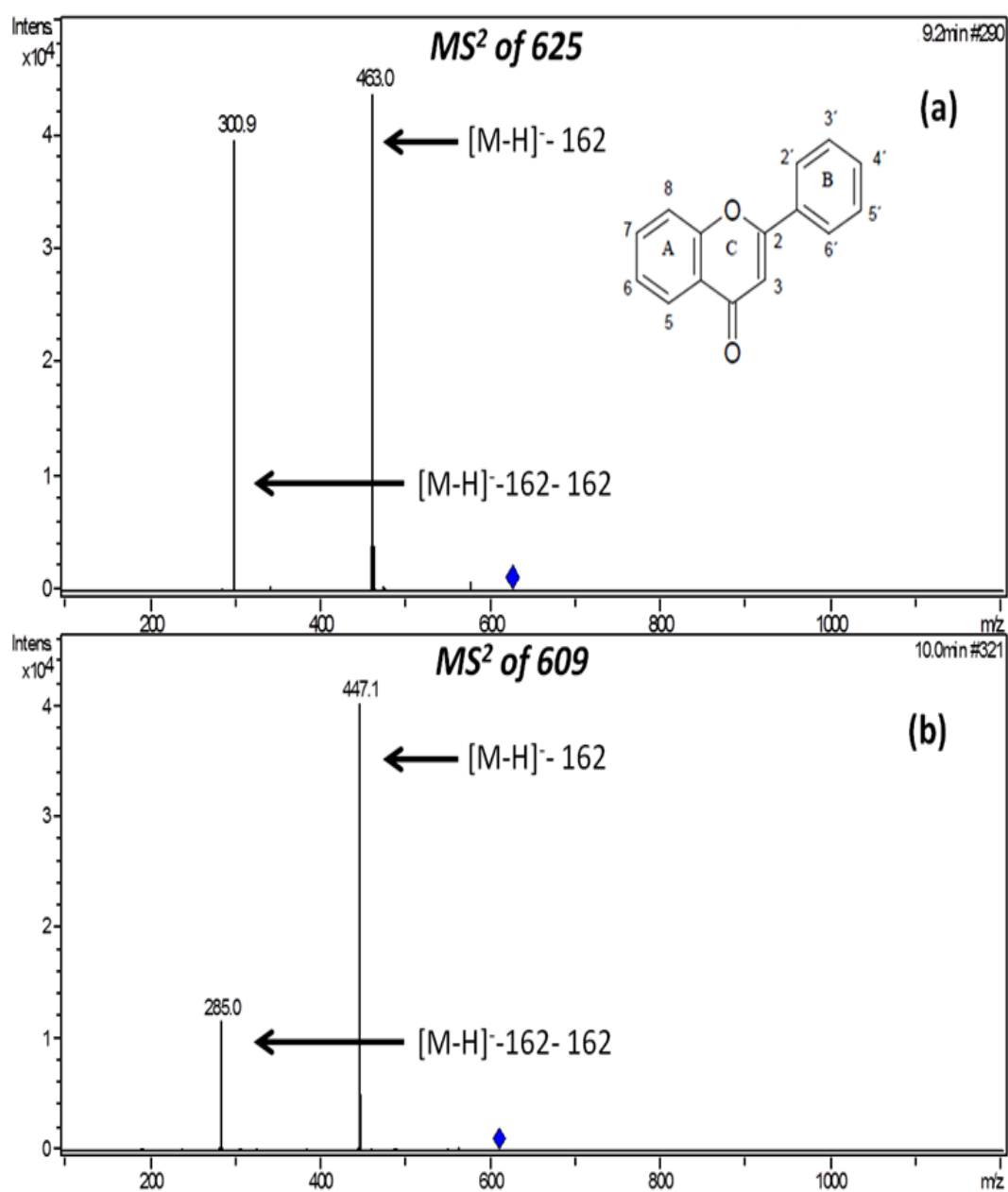


Figure 4. Fragmentation of **Quercetin-3-O-glucoside-7-O-glucoside** (MS/MS scan of compound 4 *m/z* 625) **(a)** and fragmentation of **Kaempferol 3-O-glucoside-7-O-glucoside** (MS/MS scan of compound 4 *m/z* 609) **(b)**.

6 CAPÍTULO III

Patente depositada (Instituto Nacional da Propriedade Intelectual):

INVENTORES:

NOME: SELMA DO NASCIMENTO SILVA

QUALIFICAÇÃO: MESTRE

E-MAIL: selmansilva@ufma.br

NOME: ANTONIO CARLOS ROMÃO BORGES

QUALIFICAÇÃO: DOUTOR

E-MAIL: romao@ufma.br

RESUMO

“Formulação de composição farmacêutica de liofilizado do extrato hidroalcoólico e/ou frações ativas das folhas trituradas ou moídas de *Morus nigra* e seu uso no alívio dos sintomas da menopausa”

Nº 000125- Depositada em 16/12/2011

Patente Nº PI 1105827-7

Esta invenção trata-se de um processo para obtenção da formulação farmacêutica e seu uso no auxílio do tratamento dos sintomas da menopausa. A formulação é produzida por meio de evaporação de água e álcool, à pressão reduzida com temperatura entre 40°C a 100 °C, seco por meio de liofilização, com temperatura variável entre -50°C a -20°C, de um extrato hidroalcoólico e/ou de frações obtidos de folhas da espécie *Morus nigra* L. As formulações farmacêuticas contendo o resíduo seco têm uso terapêutico das composições no auxílio do tratamento de sintomas da menopausa com redução da atrofia vaginal e regulação do metabolismo lipídico de mulheres na menopausa.

A patente depositada corresponde às páginas 123 e 124 do texto da tese (anexo).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Morus nigra L. (amora) da família Moraceae, é popularmente indicada para o tratamento de enfermidades crônicas como o diabetes, bem como para o alívio dos sintomas do climatério.

Neste trabalho foi realizado um estudo pré-clínico com o extrato hidroalcoólico (EH) das folhas de *M. nigra*, incluindo aspectos químicos, toxicológicos e farmacológicos da planta, visando pesquisar sua atividade fitoestrogênica e avaliar a utilização da mesma como terapia alternativa de reposição hormonal.

O EH foi testado em ensaios *in vivo* em ratas ovariectomizadas para avaliação da atividade fitoestrogênica. O EH foi fracionado forneceu frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e a residual que foram submetidas em ensaios *in vitro* de proliferação celular em células específicas para avaliação estrogênica.

O HE de *M. nigra* administrado em ratas Wistar ovariectomizadas apresenta indícios de efeitos fitoestrogênico na dose de 500mg/Kg apresentando discreta estimulação uterina.

Para sintomas urogenitais atroficos, o uso do extrato hidroalcoólico mostrou-se eficaz, uma vez que evitou uma atrofia severa do epitélio vaginal de ratas em estado de menopausa induzido.

Para risco de câncer de mama, a utilização de *Morus nigra* parece não aumentar o risco, mas trata-se de trabalhos em animais e observacionais. A via, a dose e o tipo de substâncias extraídas deste extrato não alteram o risco deste câncer.

Na avaliação estrogênica do EH e frações em células cancerígenas da mama (MCF-7), os resultados apontam para a presença de substâncias agonistas de estrógenos, bem como para substâncias anticancerígenas.

A análise dos resultados permitiu o depósito de patente quanto a uma formulação farmacêutica do extrato de *M. nigra* e seu uso na redução de alguns sintomas da menopausa.

Desta forma, os resultados do presente trabalho dão suporte ao uso etnofarmacológico da espécie vegetal *Morus nigra* L., mostrando seu potencial uso como fitoterápico na terapia alternativa da reposição hormonal. Os resultados obtidos mostram que no modelo e dose utilizada da planta foram efetivos como substância fitoestrogênica, mas torna-se necessário a realização de outros bioensaios para confirmar os resultados obtidos e, também para buscar detalhes sobre o mecanismo de ação, possibilitando o uso da planta como fitoterápico.

ANEXOS

1. Documento de aprovação no comitê de ética.
2. Cópia do comprovante do depósito de patente.



Universidade Estadual do Maranhão

**COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

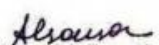
DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado **“Efeito de fitoestrógenos com terapia de reposição hormonal em ratas ooforectomizadas.”** foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal -CEEAA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, conforme protocolo nº 026/2008, em atendimento às normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 879 de 15/02/2008.

Equipe Executora:

Selma do Nascimento Silva
Ahirlan Silva de Castro
Antônio Carlos Romão Borges
Marilene Oliveira da Rocha

São Luís (Ma) 08 de julho de 2009


Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA
(Matrícula 9357)

< Uso exclusivo do INPI >

UFMA
 16/12/2011 13:38 000125
 Espaço reservado ao protocolo



PI1105827-7

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

1.2 Qualificação AUTARQUIA FEDERAL

1.3 CNPJ/CPF: 06.279.103/000119

1.4 Endereço Completo: AV. DOS PORTUGUESES S/N, CAMPUS BACANGA

1.5 CEP: 65080-040

1.6 Telefone: 98-3301 8533

1.7 Fax:

1.8 E-mail: romao@ufma.br



☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção

☐ Modelo de Utilidade

☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

"FORMULAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE LIOFILIZADO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E/OU FRAÇÕES ATIVAS DAS FOLHAS TRITURADAS OU MOÍDAS DE Morus nigra E SEU USO NO ALÍVIO DOS SINTOMAS DA MENOPAUSA"

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº

Data de Depósito:

5. Prioridade:

☐ interna

☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: SELMA DO NASCIMENTO SILVA

6.2 Qualificação MESTRE

6.3 CPF: 832.421.393-72

6.4 Endereço completo RUA 01, QUADRA 01, CASA 07, CONJ. PLANALTO ANIL I, SÃO LUÍS-MA

6.5 CEP: 65053-500

6.6 Telefone: 98-3244 5994

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: selmansilva@ufma.br

☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	01 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	05 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	02 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☐	11.7 Desenhos	fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	01 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)				03 fls.
	ANEXO-6 (72). INVENTORES				

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 12 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

São Luís, 16 de Dezembro de 2011

Local e Data

Natalino Salgado Filho

REITOR

Assinatura e Carimbo
Mat. UFMA - 3525-4

