

VIVIANE CORDEIRO BOLZAN

EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DA *Morus nigra* SOBRE A
CITOLOGIA VAGINAL E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HORMÔNIOS
SEXUAIS FEMININOS EM RATAS WISTAR

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Médicas da Universidade
Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre

Orientador: Prof^a Dr^a Helena Maria Tannhauser Barros

Co-orientadores: Prof^a Dr^a Denise C. Mesquita Dantas

Prof^a Dr^a Vanusa Regina Lando

Porto Alegre – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B694e Bolzan, Viviane Cordeiro

Efeito do extrato das folhas da morus nigra sobre a citologia vaginal e níveis plasmáticos de hormônios sexuais femininos em ratas wistar / Viviane Cordeiro Bolzan ; Orientação Helena Maria Tannhauser Barros ; Co-orientação Denise C. Mesquita Dantas ; Vanusa Regina Lando. - Porto Alegre: Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.

59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.

1. Farmacoterapia. 2. Menopausa. 3. Morus nigra. 4.

Cromatografia. I. Título. 2. Barros, Helena Maria Tannhauser. 3.

Dantas, Denise C. Mesquita. 4. Lando, Vanusa Regina.

CDD 615.321

CDU 615.32

Eleonora Liberato Petzhold

CRB10/1801

Aos meus queridos pais, dos quais o estudo me pôs fisicamente distante muitas vezes, mas certamente perto de seus corações e eles do meu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a cada dia, por me mostrar novas oportunidades de aprender e crescer;

À minha família, especialmente aos meus pais Jacinto e Elisabete por todo o apoio emocional, pela paciência e por sempre me incentivarem e apoiarem na busca da realização deste projeto;

À professora Dr^a Helena Barros pela orientação e colaboração para o desenvolvimento deste estudo;

À professora Dr^a Denise Dantas pela sua orientação no desenvolvimento do estudo, auxílio na redação da dissertação e valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dr^a Vanusa Lando pela sua orientação no desenvolvimento do trabalho, colaboração no desenvolvimento do protocolo experimental deste estudo e dedicação ao laboratório onde foram feitas as análises químicas.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste estudo;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Alexandre Maslinkiewicz, Mário Pereira e Maria Letícia Vasques pelo auxílio com a preparação, organização e limpeza dos materiais relacionados aos animais e experimentos;

À funcionária do Departamento de Bioquímica Rosângela Berjek pela sua contribuição no preparo dos extratos.

Aos meus colegas de Laboratório Lucas Sagrillo Fagundes, Gabriel Natan Pires, Bianca Braga, Virgínia Lazzari, Vinícius Sgorla Couto e Tiago Heinen por suas colaborações que tornaram possível a realização deste trabalho;

Às colegas Viviane Toniazio e Darliza Calliari pelo apoio e por compartilharem as suas experiências comigo;

À Dr^a Clarice Luz pelo apoio dado através das dosagens hormonais.

Aos colegas de trabalho pelo apoio e compreensão.

A todos os amigos e familiares que me apoiaram e compreenderam o motivo da minha ausência em muitos momentos de confraternização;

À UFCSPA pela receptividade e pelo apoio financeiro.

A todos aqueles, que contribuíram de alguma forma, para realização deste trabalho, o meu mais profundo agradecimento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
3,1 Figure 1.....	56
3,2 Figure 2.....	57
3,3 Figure 3.....	58
3,4 Table 1.....	59

Abstract

EFFECT OF EXTRACT FROM THE *Morus nigra* LEAVES ON VAGINAL CITOLOGY AND FEMALE SEX HORMONES PLASMATIC LEVELS IN WISTAR RATS

Aluna: Viviane Cordeiro Bolzan

Orientador: Prof^ª Dr^ª Helena Maria Tannhauser Barros

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Departamento de Ciências Fisiológicas

Address: Sarmento Leite, 245

Phone: + 55 51 3303-8821

E-mail: helenbar@ffcmpe.edu.br

Keywords: *Morus nigra* leaves; ovariectomized rats; phytoestrogens; chromatography; dose-response curve.

Introduction: Deficiency of estrogens during menopause can lead to different symptoms such as hot flashes, osteoporosis, depression, etc ¹. Menopausal disorders are conventionally treated with synthetic or natural estrogens. However, postmenopausal Hormone Therapy (HT) is suspected to increase the risk of breast cancer and can cause other undesirable side effects (breast tenderness, uterine bleeding, etc)². Since ancient times, extracts of plants have been used for women's health to prevent postmenopausal symptoms. Phytoestrogens are natural compounds that exert estrogenic activity³. Popularly the *Morus nigra* leaves are used for the preparation of a tea that makes a regulation of symptoms produced by menopause without adverse effects of HT. In Brazil the *Morus nigra* is the mulberry most widespread due to our climate⁴ and their leaves are the most used for estrogenic effects, although no study about this action was found.

Objective: The purpose in our study was to evaluate the compounds of *Morus nigra* leaves and the effect of methanolic extract through the changes in plasmatic luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) and vaginal cytology in rats ovariectomized.

Material and Methods: The extracts were prepared in a *Soxhlet* apparatus. Five solvents were tested for preparation of the extracts and these extracts were submitted to both

chromatographic analyses by thin-layer chromatography (TLC) as by gas chromatography (GC). Study *in vivo* was performed with eighty female rats Wistar divided in the following groups: control (non-ovariectomized), ovariectomized (OVX), both receiving vehicle, OVX-conjugated estrogen 2mg/Kg/day, OVX-*Morus nigra* extract (150, 200, 250, 300 and 350mg/Kg/day). The treatments were administered orally for 15 days. The estrous cycle was checked everyday and blood sample were collected before and after the treatment to determine LH and FSH levels by radioimmunoassay.

Results and Discussion: By TLC and GC was determined that methanol was the solvent that extracted a larger amount of constituents from the leaves. Analysis chromatographic by TLC revealed that *Morus nigra* extract presented a spot with similar *R_f* (retention factor) to the 17 β -estradiol. Results obtained *in vivo* showed that the treatment with the extract have no significant difference in vaginal epithelium changes. However, a significant reduction of plasmatic LH concentration in doses 150 and 350mg/Kg was observed ($p = 0,049$) producing a similar bell shaped dose-response curve. In contrast, FSH levels were similar in both controls and treated rats. The results were in accordance with those of Malaivijitnond et al. (2004) and Circosta et al. (2006).

Conclusions: Our research is the first study *in vivo* depicting the probable estrogenic effect of *Morus nigra* extract. Thus further studies are required to investigate the active constituents in this plant.

References: 1. BECK et al. Comparasion of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardizes plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.84, p.259-268, 2003.
2. RUSSELL et al. Phytoestrogens: a viable option? *Am J Med Sci*, v.324, n.4, p.185-188, Oct. 2002.
3. MUELLER et al. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxico Sci*, v.80, n.1, p.14-25, Jul. 2004.
4. HASSIMOTTO et al. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*, v.13, p.17-25, 2007.
5. MALAIVIJITNOND et al. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *J Pharmacol Sci*, v.96, n.4, p.428-435, Dec. 2004.
6. CIRCOSTA et al. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytother Res*, v.20, n.8, p.665-669, Aug. 2006.

Resumo

EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DA *Morus nigra* SOBRE A CITOLOGIA VAGINAL E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS EM RATAS WISTAR

Aluna: Viviane Cordeiro Bolzan

Orientador: Prof^ª Dr^ª Helena Maria Tannhauser Barros

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Departamento de Ciências Fisiológicas

Endereço: Sarmiento Leite, 245

Telefone: (51) 3303-8821

E-mail: helenbar@fffcmpa.edu.br

Palavras-Chaves: folhas da *Morus nigra*; ratas ovariectomizadas; fitoestrógenos; cromatografia; curva dose-resposta.

Introdução: A deficiência de estrogênios durante a menopausa pode acarretar diferentes sintomas como fogachos, osteoporose, depressão, etc¹. As desordens da menopausa são tratadas convencionalmente com estrogênios sintéticos ou naturais. Entretanto, a terapia hormonal (TH) na menopausa é suspeita de aumentar o risco de câncer de mama e causar outros efeitos secundários desagradáveis (dor nas mamas, sangramento uterino, etc)². Desde os tempos antigos, extratos de plantas têm sido usados na saúde da mulher para prevenir os sintomas da menopausa. Fitoestrógenos são compostos naturais que exercem atividade estrogênica³. Popularmente as folhas da *Morus nigra* são usadas na preparação de um chá que regularia os sintomas acarretados pela menopausa sem os efeitos adversos da TH. No Brasil a *Morus nigra* é a amoreira mais disseminada devido ao nosso clima⁴ e suas folhas são as mais usadas para os efeitos estrogênicos, mas não há nenhum estudo encontrado sobre essa ação.

Objetivo: O propósito do nosso estudo foi avaliar os componentes das folhas da *Morus nigra* e os efeitos do extrato metanólico através de mudanças plasmáticas no hormônio

luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) e citologia vaginal em ratas ovariectomizadas.

Material e Métodos: Os extratos foram preparados em um extrator *Soxhlet*. Cinco solventes foram testados na preparação dos extratos e estes extratos foram submetidos tanto à cromatografia em camada delgada (CCD) quanto à cromatografia gasosa (CG). Estudo *in vivo* foi realizado com 80 ratas Wistar divididas nos seguintes grupos: controle (não-ovariectomizado), ovariectomizado (OVX), ambos receberam veículo, OVX-estrogênio conjugado 2mg/Kg/dia, OVX-extrato da *Morus nigra* (150, 200, 250, 300 e 350 mg/Kg/dia). Os tratamentos foram administrados via oral por 15 dias. O ciclo estral foi conferido todos os dias e amostras de sangue foram coletadas antes e depois do tratamento para determinação dos níveis de LH e FSH por radioimunoensaio.

Resultados e Discussão: Por CCD e CG determinou-se que o metanol foi o solvente que extraiu a maior quantidade de constituintes das folhas da *Morus nigra*. Análises cromatográficas por CCD revelaram que o extrato da *Morus nigra* apresentou uma mancha com um *R_f* (fator de retenção) semelhante ao 17 β -estradiol. Resultados obtidos *in vivo* demonstraram que o tratamento com o extrato não mostrou diferença significativa nas mudanças no epitélio vaginal. No entanto, uma diminuição significativa da concentração plasmática do LH em doses 150 e 350mg/Kg foi observada ($p = 0,049$) produzindo um tipo de curva dose-resposta em forma de sino. Em contraste, os níveis de FSH foram similares nos controles e nas ratas tratadas. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Malaivijitnond et al. (2004) e Circosta et al. (2006).

Conclusões: Nossa pesquisa é o primeiro estudo *in vivo* descrevendo o provável efeito estrogênico do extrato da *Morus nigra*. Dessa forma, mais estudos são necessários na investigação dos constituintes ativos desta planta.

Referências Bibliográficas: 1. BECK et al. Comparasion of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardizes plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.84, p.259-268, 2003.
2. RUSSELL et al. Phytoestrogens: a viable option? *Am J Med Sci*, v.324, n.4, p.185-188, Oct. 2002.
3. MUELLER et al. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxico Sci*, v.80, n.1, p.14-25, Jul. 2004.
4. HASSIMOTTO et al. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*, v.13, p.17-25, 2007.

5. MALAIVIJITNOND et al. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *J Pharmacol Sci*, v.96, n.4, p.428-435, Dec. 2004.
6. CIRCOSTA et al. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytother Res*, v.20, n.8, p.665-669, Aug. 2006.

1 Introdução

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Veiga Jr et al., 2005).

Os medicamentos fitoterápicos são preparações padronizadas contendo extratos de uma ou mais plantas, amplamente comercializados em países pobres ou ricos. De acordo com a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) os medicamentos fitoterápicos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado (WHO, 1993). Na sua maioria, os constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica não são conhecidos e acredita-se que a ação farmacológica desses produtos envolva a interação de inúmeras moléculas presentes no extrato (Yunes e Calixto, 2001).

Exemplos marcantes da importância da fitoterapia para a humanidade vêm de países orientais. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (Viegas Jr et al., 2006).

Podemos dividir a história do desenvolvimento dos fármacos, a partir de plantas, basicamente em três fases segundo Lozoya (1997). A primeira vai desde as pesquisas iniciais até aproximadamente 1900. Nesta época, os químicos se dedicavam a isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas muito bem conhecidas e experimentadas pelo uso popular ao longo do tempo e, geralmente, incorporadas nas farmacopéias da época. Dessa forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica clínica,

permanecendo até os dias de hoje. Alguns exemplos podem ser citados como a morfina, isolada em 1803 por Setüner da *Papaver somniferum*, planta usada para acalmar dores abdominais. Sua fórmula estrutural foi proposta somente em 1925, por Robison. Posteriormente, da mesma planta, foram isoladas a codeína em 1932, por Robiquet, e a papaverina em 1948, por Merck. Das plantas cardiotônicas usadas pelos romanos e incorporadas à farmacopéia de Londres em 1650, foi isolado o digital a partir das folhas de *Digitalis purpurea* por Nativelle em 1869 (Yunes e Calixto, 2001).

A América Latina foi fonte de importantes princípios ativos, e muitas plantas tinham aplicação terapêutica na época. Podemos citar a *Cinchona calisaya*, planta usada como antimalárica no Peru, cujos efeitos foram reconhecidos pelos jesuítas. Em 1677, começou a fazer parte da farmacopéia de Londres e somente em 1877 foi isolado seu principal princípio ativo, a quinina, pelos cientistas franceses Pelletier e Caventou (Entralgo, 1989).

Um importante exemplo de estudo com plantas medicinais é o caso da *Salix alba*, cujas cascas foram usadas durante milênios em vários continentes para combater a febre e a dor, mas que somente em 1763 foi estudada cientificamente por Stone através de um trabalho de observação clínica mostrando o efeito analgésico das cascas dessa planta. Em 1828, Buchner isolou a salicina e em 1860, Kolbe e Lauteman sintetizaram o ácido salicílico. Somente em 1898, Felix Hofmann sintetizou o tão utilizado ácido acetilsalicílico (AAS) (Yunes e Calixto, 2001). Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária (Bruneton, 1993; Yunes e Calixto, 2001).

A segunda fase do desenvolvimento de fármacos (1900 até 1975) surge alguns anos após a descoberta do AAS quando aparecem novos fármacos de origem sintética (Viegas Jr et al., 2006). Alguns exemplos desses fármacos: barbital (1903), fenobarbital (1912), clorpromazina (1950), imipramina (1957), benzodiazepínicos (1964), indometacina (1963) (Goodman e Gilman, 2006; Rang et al., 2005). Como produtos naturais de importância à terapêutica, aparecem somente os antibióticos obtidos dos fungos, como a penicilina (1939), a estreptomicina e a bacitracina (1943), o cloranfenicol (1947), a neomicina (1949), entre outros (Yunes e Calixto, 2001).

É importante salientar que em 1943, o Yam Mexicano (*Dioscorea villosa*) atraiu a atenção da comunidade médica quando cientistas extraíram progesterona de sua raiz. A *Dioscorea villosa* é rica em diosgenina, esteróide vegetal utilizado como precursor na produção química, em laboratório, de esteróides sexuais. Entretanto, o organismo humano não é capaz de transformar a diosgenina em progesterona (Taylor, 2001).

Por volta de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu o valor das plantas medicinais, considerando os promissores e consagrados resultados da medicina tradicional chinesa. Ocorreu o retorno do interesse pelos produtos naturais como fonte de medicamentos, dessa forma muitos fármacos importantes foram desenvolvidos a partir de 1980 até o presente: ciclosporina A em 1983, que é um metabólito microbiano; a artemisinina, um poderoso agente antimalárico presente na *Artemísia annua* em 1987; a acarbose, obtida de micróbios e usada para tratamento de diabetes tipo II (1990); o paclitaxel, isolado de *Taxus brevifolia* para tratamento de alguns tipos de câncer (1993), entre outros (Grabley e Thiericke, 1999).

Também houve um grande crescimento da indústria de fitoterápicos nos países asiáticos. Entre os principais fitoterápicos produzidos podemos citar o extrato de *Crataegus bu-wang*, empregado para normalizar o nível de colesterol sangüíneo e o universalmente conhecido *Ginkgo biloba*, usado especialmente para o tratamento de problemas vasculares cerebrais (Ignjatovic et al., 2000).

Vários fatores influenciaram o novo cenário do mercado de obtenção de fármacos e o conseqüente retorno do interesse pelas plantas medicinais como: (I) o avanço da biologia molecular que com o mapeamento genético possibilitou o surgimento de novos alvos biológicos, (II) a química orgânica sintética que permite sintetizar milhares de compostos em um curto espaço de tempo, (III) as técnicas de *screening* de alta escala que testa milhares de compostos em um único dia e (IV) o emprego da informática que permite modelar novas moléculas ativas (Yunes e Calixto, 2001).

Os produtos naturais são usados como matéria-prima para síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico e principalmente como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos pelas grandes indústrias (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Isto tem levado as grandes indústrias farmacêuticas a redobram seus interesses no aproveitamento da biodiversidade mundial, atualmente concentradas nos países tropicais, visando o desenvolvimento de novos medicamentos (Lawrence, 1999).

Freqüentemente surgem novos estudos sobre plantas e suas ações terapêuticas na literatura científica baseados no uso empírico. Durante a década de 30, foram publicados os primeiros registros da presença de substâncias análogas aos hormônios sexuais femininos em plantas (Butenandt e Jacobi, 1993), os quais foram tratados com ceticismo. Contudo, com o avanço das

técnicas analíticas, a ocorrência dessas substâncias nas plantas foi confirmada e esses compostos foram denominados, então, fitoestrógenos devido ao fato de que, quando ingeridos, mimetizam os efeitos dos estrogênios. Os fitoestrógenos são compostos difenólicos não esteroidais originados ou derivados do metabolismo *in vivo* de precursores presentes em muitas plantas das quais os humanos se alimentam. As principais classes desses compostos são as isoflavonas, lignanas e cumestanos. Os fitoestrógenos mais estudados são derivados de várias plantas como: *Glycine max*, *Cimicífuga racemosa*, *Angelica sinensis* e *Trifolium pratense* (Brzezinski e Debi, 1999). Uma característica estrutural de todos os fitoestrógenos é a presença de um anel fenólico, que é um pré-requisito para a ligação ao receptor estrogênico (Song et al., 2002).

A redução na produção de hormônios femininos pelos ovários caracteriza o período na vida da mulher conhecido na primeira fase como climatério e depois chamado de menopausa. A deficiência de estrogênios no período do climatério / menopausa é responsável por efeitos do tipo: vasomotores, suor, osteoporose, ansiedade, depressão, atrofia urogenital, entre outros (Beck et al., 2003; Nelson, 2008). Na menopausa, com a falência da população folicular o ovário deixará de produzir estrogênios ocasionando um aumento dos níveis de gonadotrofinas: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteizante (LH) devido à falta do *feedback* negativo do estrogênio (Goodman e Gilman, 2006).

O uso terapêutico dos estrogênios é disseminado, sendo comumente utilizados na Terapia Hormonal (TH) na menopausa e na anticoncepção (Cos et al., 2003). Entretanto, após recentes estudos clínicos, eles têm sido culpados por aumentar o risco de câncer de mama e riscos cardiovasculares em mulheres na

menopausa, além de causar outros efeitos secundários desagradáveis (dor nas mamas, sangramento uterino, etc) (Nelson, 2004).

Na década de 90 o Instituto de Saúde dos EUA iniciou um estudo clínico controlado para avaliar se a TH realmente era capaz de trazer tantos benefícios às mulheres e quais os efeitos colaterais (risco X benefício). Este estudo denominado WHI (*Women's Health Initiative*) estudou um esquema terapêutico (somente estrogênios equinos conjugados ou em associação com medroxiprogesterona) e avaliou os efeitos da TH sobre os ossos, sistema cardiovascular, câncer de mama, fenômenos tromboembólicos e qualidade de vida. Apesar das críticas e limitações do estudo, concluiu-se que, apesar dos benefícios sobre o metabolismo ósseo e tratamento dos fogachos, não houve proteção cardiológica e o aumento do câncer de mama e o risco de trombose era acima de níveis toleráveis (Rossouw et al., 2002).

Desde 1986, receptores estrogênicos (ERs) têm sido identificados por técnicas de biologia molecular. Desta maneira foram encontrados dois receptores estrogênicos (ERs): α e β . O cDNA do ER α foi clonado em 1986. O ER α é a forma predominante no útero e tecido mamário. O cDNA do ER β foi clonado em 1995, e ele é predominante no sistema nervoso central (SNC), sistema cardiovascular (SCV), sistema imune, trato urogenital, ossos, rins e pulmão (Russell et al., 2002). Os receptores estrogênicos α e β são divididos em 6 regiões ou domínios, rotuladas de A a F. O receptor estrogênico β é 97% homólogo na seqüência de aminoácidos ao receptor α em seu domínio de ligação ao DNA, 59% homólogo no domínio de ligação hormonal, mas somente 17.5% homólogo no domínio regulador A/B. Devido a essas características o 17 β -estradiol tem afinidades por ambos os receptores (Miller et al., 2003). Diferentes preparações

estrogênicas têm afinidades variadas ao ER α ou β . Estrogênios equinos conjugados e 17 β -estradiol são os estrogênios mais comumente prescritos para TH. Ambos têm uma grande afinidade pelos ERs α ou β . Os estrogênios são solúveis nos lípidos que constituem a membrana que envolve as células e o seu núcleo, de modo que o hormônio passa facilmente para o núcleo. Uma vez lá dentro, o estrogênio liga-se a um receptor de estrogênio (ER), uma proteína dissolvida no meio aquoso nuclear. O ER localizado no citoplasma está inativado pela ligação com as HSPs (*Heat Shock Proteins*). Após a ligação do estrogênio ao receptor, este libera as HSPs e vai até o núcleo. O estrogênio se fixa num local específico do receptor chamado LBD (*Ligand Binding Domain*), tal como o efeito chave-fechadura. A interação do estrogênio com o ER é muito complexa, produzindo mudanças conformacionais no receptor e na célula. Apesar do estrogênio penetrar em muitos tipos de células, só aquelas com ER podem responder à sua presença. Dois receptores ocupados juntam-se para formar um dímero, que depois se liga a um centro regulador chamado elemento de resposta ao estrogênio (ERE), localizado em um gene. Os EREs estão localizados na região promotora de diversos genes. As proteínas adaptadoras, que são co-ativadoras ou co-supressoras, interagem com o ER dimerizado e a transcrição, desempenhando um importante papel na modulação da resposta pleitrópica ou estrogênica em um determinado órgão (Brzozowski et al., 1997) (Figura 1).

Os dois maiores co-ativadores são o GRIP1 (*Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1*) também conhecido como TIF2 (*Transcription Intermediary Factor 2*) e o SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator-1*) (Mueller et al., 2004).

A modulação exercida por esses fatores é responsável pelos efeitos benéficos, como a prevenção da osteoporose, e por outro lado, pelos efeitos maléficos, como o câncer do endométrio (Russell et al., 2002).

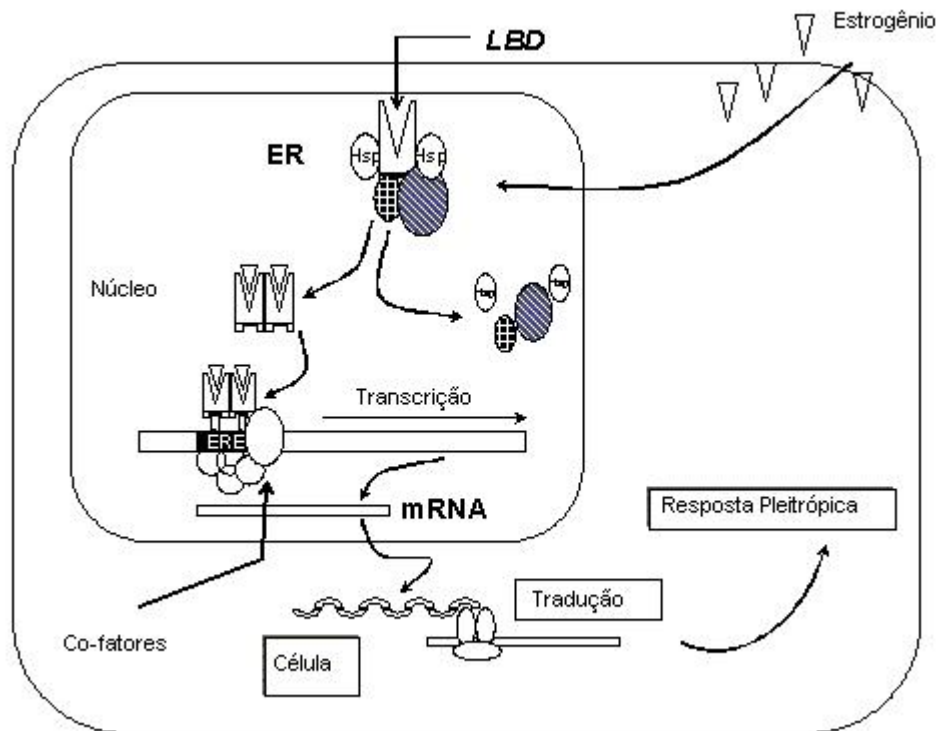


Figura 1. Mecanismo de ação do estrogênio

As preocupações sobre os efeitos adversos dos estrogênios, após os resultados publicados em 2002 do WHI, conduziram a um aumento de interesse por terapias não-hormonais para tratar os sintomas da menopausa (Nelson, 2008). Pesquisas vêm tentando desenvolver um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), que realize uma estimulação estrogênica nos ossos, SCV, cérebro, e sistema urogenital e efeitos anti-estrogênicos nas mamas e útero. Pode haver SERMs naturais em preparações com plantas usadas para sintomas da menopausa, particularmente as isoflavonas, que parecem ser fracamente

estrogênicas no cérebro, vagina, ossos e SCV, mas anti-estrogênicas no útero e nas mamas (Russell et al., 2002).

Entre os fitohormônios, as isoflavonas são as mais estudadas e com maior atividade estrogênica (King et al., 1999). A soja (*Glycine max*) é uma grande fonte de isoflavonas e contém aproximadamente 2 gr de isoflavonas por kg de peso fresco (Reinli e Block, 1996). Sabe-se que essa quantidade pode variar em relação à variedade dos grãos e também pelo processamento destes. Conseqüentemente nem todas as fontes de proteína de soja são iguais com respeito a suas composições de isoflavonas e isto deve ser levado em conta nos estudos epidemiológicos e nutricionais (Cos et al., 2003).

Um grande número de isoflavonas têm sido identificadas em plantas e as principais são a daidzeína e genisteína. Estas substâncias estão presentes nas plantas como glicosídeos inativos daidzina e genistina. Esses glicosídeos são metabolizados no trato gastrointestinal por enzimas da microflora natural para sua forma de agliconas (Day et al., 1998). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para pesquisar a absorção intestinal das isoflavonas na forma de glicosídeos. Os estudos *in vitro* mostraram que as agliconas são transportadas mais eficientemente nos enterócitos que seus correspondentes glicosídeos (Andlauer et al., 2000). Depois da absorção, as isoflavonas são conjugadas com o ácido glicurônico e também com sulfatos, e então excretadas na urina (Lampe et al., 1994). As isoflavonas têm uma afinidade maior ao ER β que ao ER α , mas são 10^2 a 10^5 vezes menos ativas que os estrogênios esteroidais (Cos et al., 2003).

Estudos com fitohormônios são muitas vezes difíceis de interpretar devido à variabilidade dos componentes e doses. A multiplicidade de sintomas estudados (vasomotores, físicos, psicossociais e sexuais) e os métodos utilizados

freqüentemente não permitem comparações entre os estudos, bem como as populações que representam. Dessa forma, há autores que questionam os efeitos das isoflavonas na distribuição de lipídios, massa óssea e sintomas vasomotores (Sacks et al., 2006). Salienta-se que a comparação entre os trabalhos da literatura é complexa, visto que existem várias formas de extração das isoflavonas, bem como formulações com diferentes concentrações de isoflavonas (Cos et al., 2003; Vergne et al., 2007).

Os efeitos adversos do uso de fitohormônios, especialmente a longo prazo, não são tão bem conhecidos como os dos estrogênios (Beck et al., 2003; Nelson, 2008). Sabe-se que mulheres asiáticas têm menos sintomas na menopausa primariamente devido ao alto consumo de soja em sua dieta (Umland et al., 2000).

A freqüência da osteoporose varia nas populações em diferentes regiões geográficas, com menor incidência em mulheres asiáticas que as dos países ocidentais (Cooper et al., 1992). Mulheres japonesas têm risco menor de sofrer fraturas de quadril que mulheres brancas (Boulet et al., 1994). Postula-se que tal fato se deve a fatores como estatura, exercícios físicos e o tipo de dieta adotada (incluindo consumo de fitohormônios e cálcio). Um estudo que comparou a taxa de fraturas em Hong-Kong e nos EUA demonstrou que, em Hong-Kong, aos 85 anos, observa-se uma taxa de 1/3 das fraturas observadas nos EUA (Ho et al., 1993).

Estudo em ratas ovariectomizadas observou incremento dos níveis séricos de osteocalcina (marcador de formação óssea oriunda dos osteoblastos) com o uso de genisteína, o mesmo não ocorrendo com as dosagens de D-piridinolina (marcador de atividade osteoclástica), que permaneceram inalteradas (Fanti et al.,

1998). Este resultado sugere uma ação essencial da genisteína na formação óssea e não anti-reabsortiva, como a ação dos estrogênios.

Ye et al. (2003) avaliaram a ação da genisteína e daidzeína sozinhas e também de um extrato com alta concentração de coumestrol em relação à reabsorção óssea em ratas ovariectomizadas. Concluíram que ambas as isoflavonas e o extrato diminuíram a perda óssea, mas que o coumestrol aumentou o peso do útero, diferentemente das isoflavonas.

Os melhores resultados na prevenção da osteoporose foram obtidos com a ipriflavon, que é uma isoflavona sintética, derivada da daidzeína e aproximadamente 10% é convertida em daidzeína no corpo (Petilli et al., 1995). Estudos clínicos para avaliar a administração de preparações contendo isoflavonas mostraram que essas apresentam efeito de diminuição da perda óssea (Potter et al., 1998; Clifton-Bligh et al., 2001).

Estudos clínicos para avaliar os efeitos das isoflavonas em relação aos fogachos em mulheres na menopausa produziram resultados diversos. Alguns estudos mostraram uma significativa redução de fogachos (Scambia et al., 2000), enquanto outro estudo onde mulheres que tiveram câncer de mama receberam uma preparação com isoflavonas não apresentou nenhuma redução na incidência de fogachos (Quella et al., 2000).

As mulheres japonesas parecem ter menos fogachos que as ocidentais, o que em parte pode ser devido à elevada ingestão de soja. Alguns estudos indicam um efeito mínimo sobre fogachos, com redução de 45% *versus* 30%, em comparação com placebo (Albertazzi et al., 1998), enquanto a TH convencional os reduz em 70% (Chung et al., 1996).

Os estudos em animais avaliando alterações do endométrio devido o consumo de isoflavonas mostraram resultados contraditórios, havendo em alguns, com o uso de altas doses, efeitos proliferativos semelhantes aos dos estrogênios (Hale et al., 2002).

Rimoldi et al. (2007) administraram oralmente genisteína em duas doses (5,4 e 54mg/Kg) cronicamente por 3 meses em ratas ovariectomizadas e constataram que a dose maior de genisteína aumentou o peso uterino, induziu uma hiperplasia no epitélio vaginal e não diminuiu os níveis do LH.

Em um estudo clínico, mulheres na menopausa foram divididas em 3 grupos e receberam diferentes tratamentos: proteína de soja sozinha (controle) e proteína de soja enriquecida com diferentes concentrações de fitoestrógenos (grupo com baixa concentração de isoflavonas e grupo com alta concentração de isoflavonas) e foi concluído que nenhum dos tratamentos apresentou efeitos estrogênicos no tecido endometrial, contrastando com o 17 β -estradiol (Duncan et al., 2000).

A gliciteína é uma isoflavona que representa de 5 a 10% do total de isoflavonas presente em produtos de soja e foi testada em camundongos onde demonstrou uma fraca ação estrogênica (proliferação endometrial) comparando-se com a genisteína e daidzeína, e ação muito menor comparando-se com o 17- β -estradiol (Song et al., 2002).

Cicero et al. (2004) constataram uma diminuição nos níveis de LH e nenhuma alteração nos níveis de FSH em ratos machos não-castrados tratados com um extrato padronizado de isoflavonas da soja.

Além das isoflavonas da soja, outras plantas têm sido estudadas por possuírem fitohormônios. A *Pueraria mirifica* é uma planta que contém vários

fitoestrógenos como: daidzina, daidzeína, genistina, genisteína e puerarina. O efeito estrogênico do extrato bruto da *Pueraria mirifica* (0, 10, 100 e 1000mg/Kg) foi comprovado em ratas ovariectomizadas através da diminuição do aumento dos níveis de LH e FSH na dose de 1000mg/Kg quando comparada com o controle. A cornificação do epitélio vaginal foi observada nas ratas ovariectomizadas nas doses de 100 e 1000mg/Kg. Neste estudo também foi avaliado o efeito do mesmo extrato em ratos castrados e também foi visto que somente a dose mais alta da suspensão foi capaz de alterar os níveis de LH, mas não alterou os de FSH (Malaivijitnond et al., 2004).

A *Cimicifuga racemosa* (black cohosh) é uma planta nativa da América do Norte e também contém fitohormônios. O extrato dessa planta é capaz de reduzir os níveis de LH fazendo, dessa maneira, que haja uma redução nos sintomas da menopausa. O FSH não é alterado por sua ação (Russell et al., 2002). Wuttke et al. (2003) publicaram resultados onde descrevem a ação de um extrato padronizado de *Cimicifuga racemosa* chamado BNO 1055. Esse extrato demonstrou muitas das ações benéficas relacionadas com o 17 β -estradiol, como os efeitos no cérebro e hipotálamo por reduzir os níveis de LH em ratas ovariectomizadas levando possivelmente a uma redução da taquicardia que está associada aos fogachos quando pensamos em humanos, também efeitos desejáveis por prevenir a osteoporose e não possuir efeito uterotrófico. Porém, a black cohosh tem sido associada com dano hepático (Whiting et al., 2002).

Os efeitos estrogênicos do *Trifolium pratense*, que contém as isoflavonas genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A, têm sido estudados em ratas ovariectomizadas. Observou-se que a administração oral do extrato desta planta que contém 15% de isoflavonas (250, 500 e 750 mg/Kg) aumentou o peso

uterino de uma maneira dose-dependente e promoveu uma cornificação celular vaginal nas duas maiores doses (Burdette et al., 2002).

Entretanto, um estudo clínico com o *Trifolium pratense* demonstrou que não houve melhora na frequência ou severidade dos fogachos e o nível de gonadotropinas em ensaio controlado com placebo (Atkinson et al., 2004).

Um extrato etanólico padronizado da *Angélica sinensis* contendo 1% de ligustilida (principal constituinte) foi obtido de suas raízes e testado em ratas onde apresentou ação estrogênica por apresentar uma significativa cornificação do epitélio vaginal e diminuição dos níveis de LH (Circosta et al., 2006).

Devido à contínua necessidade da descoberta de novos medicamentos, muitas plantas continuam sendo estudadas baseadas na sua utilização empírica.

A amoreira é utilizada como fitoterápico para diversas ações terapêuticas. Seu nome científico é *Morus sp* e é uma planta medicinal que pertence à família das Moráceas. A *Morus sp* já foi alvo de diferentes estudos para comprovação desses efeitos terapêuticos. As principais espécies pesquisadas de amoreira são: *Morus bombycis*, *Morus indica*, *Morus alba* e *Morus nigra*.

O suco de amora demonstrou atividade anti-stress em camundongos submetidos a um modelo de stress por imersão em água devido à captura de radicais livres (ânion superóxido, radical hidroxila), tanto quando o suco foi administrado antes ou após o teste de stress (Sakagami et al., 2006). Os frutos da amoreira possuem grande quantidade da antocianina cyanidin 3-glucoside (C3G), sendo o seu principal componente. A C3G possui atividade *in vitro* comprovada quanto à ação antioxidante e antiinflamatória. Dessa forma, o extrato metanólico das frutas foi testado como antiinflamatório em modelo murino de artrite induzido

pela carragenina e diminuiu o edema caracterizado pelo acúmulo de fluidos, ácido úrico e fatores reumatóides (Kim e Park, 2006).

Pesquisas foram realizadas com o composto 2,5-dihydroxy-4,3'-di (beta-D-glucopyranosyloxy)-*trans*-stilbene isolado das raízes da *Morus bombycis* e foi comprovada sua ação antioxidante e hepatoprotetora em ratos com dano hepático induzido por CCl₄ (tetracloreto de carbono) (Jin et al., 2006; Jin et al., 2007). O extrato alcoólico da *Morus bombycis* inibiu a produção de NO *in vitro* mostrando-se útil no tratamento de doenças inflamatórias (Ryu et al., 2003).

Também foi realizado estudos com um extrato etanólico das raízes da *Morus bombycis* Koidzumi (MK) em ratos hipertensos (SHRs) para se avaliar os efeitos deste sobre as funções cardíacas e respostas vasculares. Os resultados sugerem que o tratamento crônico com MK exerce um efeito antihipertensivo em SHRs por meio de efeitos vaso-relaxantes, inotropismo negativo e propriedades antioxidantes (Oh et al., 2007).

Um efeito antiinflamatório e antipirético foi observado em ratos quando utilizou-se um extrato metanólico de raízes da *Morus indica* em condições artríticas (Chatterjee et al., 1983).

Efeito hipoglicemiante e antioxidante foi constatado quando uma dieta padrão recebeu 25% de folhas da *Morus indica* e foi oferecida para ratos machos submetidos a um modelo experimental de diabetes utilizando a estreptozotocina (STZ) (Andallu e Varadacharyulu, 2003). Em outro estudo o extrato aquoso das folhas da *Morus indica* apresentou uma ação hipoglicemiante em pacientes portadores de diabetes tipo 2 após 30 dias de tratamento utilizando a glibenclamida como padrão (Andallu et al., 2001).

A partir das raízes da *Morus alba* obteve-se compostos flavonóides (Nomura, 1988) que, ao serem isolados, demonstraram, *in vitro*, uma atividade contra o vírus da herpes simplex tipo 1 (Du et al., 2003).

O extrato aquoso das raízes induziu apoptose em células tumorais através da inibição da organização de microtúbulos *in vitro* (Nam et al., 2002). O componente Kuwanon G extraído de extrato metanólico das raízes da *Morus alba* demonstrou ser um agente antibacteriano contra patógenos orais *in vitro* (Park et al., 2003).

Singab e colaboradores demonstraram em 2005 o efeito hipoglicemiante do extrato das raízes da *Morus alba* em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de diabetes utilizando estreptozotocina (STZ) como indutor, onde os ratos diabéticos demonstraram diminuição significativa nos níveis de glicose e diminuição da peroxidação das células lipídicas após a administração oral do extrato de *Morus alba*.

Ratos submetidos a uma dieta hipercalórica e hiperlipídica à base de óleo de coco (25%) e colesterol (2%) apresentaram níveis altos de colesterol e triglicerídios. Cada grupo de ratos recebeu frações de extratos diferentes de raízes da *Morus alba* denominados MRBF-1 (aquoso), MRBF-2 (50% metanol) e MRBF-3 (100% metanol). Comparando com o controle (dieta hipercalórica sem tratamento), os grupos que foram submetidos ao tratamento com as frações 2 e 3 do extrato tiveram diminuição significativa nos triglicerídios, no colesterol total e frações, sugerindo que a presença de flavonóides com ação antioxidante favorece a diminuição do colesterol e suas frações (El-Beshbishy et al., 2006).

O extrato das raízes da *Morus alba* denominado HEMA (hot-water extract *Morus alba*) inibiu significativamente os processos anafiláticos, tanto sistêmicos

como locais, em camundongos que receberam o componente 48/80 e gamma globulina de galinha (CGG), respectivamente. Dessa forma o HEMA é uma possível opção de tratamento para doenças alérgicas (Chai et al., 2005).

O mulberroside F isolado do extrato de uma mistura de água e metanol das folhas da *Morus alba* demonstrou efeito *in vitro* sobre a biossíntese da melanina podendo ser uma alternativa de agente clareador da pele (Lee et al., 2002).

O extrato aquoso das folhas da *Morus alba* demonstrou efeito hipoglicemiante pelo aumento da sensibilidade à insulina em ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes utilizando a estreptozotocina (STZ) (Chen et al., 1995). Outros autores utilizando o extrato aquoso das folhas e o mesmo modelo experimental demonstraram uma efetividade do extrato, como hipoglicemiante, via modulação da expressão do óxido nítrico (NO), pela redução da óxido nítrico sintase (NOS) no hipotálamo (Jang et al., 2002).

O extrato butanólico das folhas da *Morus alba* teve 3 componentes isolados e com a estrutura elucidada (duas fenilflavonas e um glicosídeo de uma das fenilflavonas). Esses componentes foram investigados quanto à ação antioxidante sobre o LDL humano *in vitro*. Apenas as duas fenilflavonas apresentaram ação antioxidante sobre o LDL assim como a quercitina que foi utilizado como controle positivo (Doi et al., 2001). Também esse extrato e seu maior constituinte, isoquercitina, demonstraram ação inibitória sobre a fração LDL (Doi et al., 2000).

Os flavonóides presentes nas folhas da *Morus alba* também diminuíram as frações lipídicas de camundongos hiperlipidêmicos tratados com triton WR-1339 (Chen e Li, 2007).

Camundongos machos foram divididos em 4 grupos e alimentados com uma dieta hiperlipídica composta de manteiga de cacau (15%) e colesterol (3%).

O grupo controle recebeu somente a dieta hiperlipídica e os outros 3 grupos receberam a mesma dieta enriquecida com os seguintes tratamentos: quercitina, quercetin 3-(6-malanylglicoside) (Q3MG) (maior constituinte isolado das folhas da *Morus alba*) e folhas da *Morus alba*. O tratamento com a Q3MG e as folhas da *Morus alba* inibiram efetivamente a progressão de lesões ateroscleróticas quando comparados com o grupo controle e o grupo quercitina. Esse efeito protetor foi devido à presença da Q3MG, flavonóide que apresenta atividade antioxidante (Enkhmaa et al., 2005).

Estudos *in vitro* utilizando o extrato metanólico das folhas da *Morus alba* demonstraram uma atividade antiinflamatória pela inibição da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) podendo ser considerado um antiinflamatório (Hong et al., 2002). Corroborando com os dados anteriores, Chung et al. (2003) isolaram dois componentes do extrato metanólico, o mulberroside A e o oxyresveratrol, que apresentaram ação antiinflamatória por reduzir o edema de pata em ratos, pela inibição da iNOS e da cicloxigenase-2 (COX-2).

O extrato metanólico das folhas da *Morus alba* e suas frações (clorofórmio, butanol e aquoso) apresentaram capacidade de suprimir a produção de alguns mediadores inflamatórios (NO, PGE₂ e TNF- α) em macrófagos, demonstrando possuir ação antiinflamatória (Choi e Hwang, 2005).

Várias desordens neurológicas como Alzheimer e Parkinson têm sido atribuídos a depleção de GABA no cérebro. Um estudo submeteu as folhas de *Morus alba* a vários tratamentos anaeróbicos para obter um extrato com acúmulo da GABA chamado GAML, o qual foi utilizado *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* o GAML reduziu a citotoxicidade ocasionada pela privação da oxigênio-glucose nas células PC12. *In vivo* o efeito neuroprotetor do GAML foi demonstrado usando um

modelo de oclusão da artéria cerebral em ratos, GAML diminui significativamente o volume de infarto no cérebro comparado com o grupo controle. Esses resultados demonstraram que o tratamento com GAML tem efeito neuroprotetor *in vivo* e *in vitro* contra um modelo de isquemia cerebral (Kang et al., 2006).

Os trabalhos existentes da *Morus nigra* mostraram que três diferentes extratos (água, hidroalcolólico e polifenólico) da sua fruta apresentam um efeito protetor contra danos peroxidativos a biomembranas e a biomoléculas *in vitro* (Naderi et al., 2004), também mostraram que o morusin é um fenil-flavonóide presente nas raízes da amoreira preta que produz um efeito analgésico em modelo animal de dor (Souza et al., 2000), e que o extrato etanólico das folhas apresentou um efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes induzida por aloxano (Petlevski et al., 2001).

No Brasil a espécie *Morus nigra* é a mais abundante (Hassimotto et al., 2007) e é popularmente conhecida como amoreira-preta, suas folhas são simples, cartáceas, obovadas, variáveis e profundamente lobadas em exemplares jovens e apenas de margens serradas em plantas adultas, com nervação saliente e superfície superior brilhante, de 6 a 12 cm de comprimento (Lorenzi et al., 2003).

No século XVI, na Europa, empregavam-se empiricamente os frutos, a casca e as folhas da amoreira-preta. O fruto para as inflamações e hemorragias, a casca para as dores de dentes e as folhas para as mordidas de cobra e também como antídoto de envenenamento por acônito (Botsaris, 1995).

As folhas da *Morus nigra* são utilizadas popularmente para a preparação de um chá que regularia os sintomas produzidos pela deficiência de estrogênio sem apresentar efeitos adversos, dessa maneira as folhas de amoreira poderiam ser uma fonte de fitohormônios.

Apesar do uso empírico das folhas da *Morus nigra*, ainda não existe nenhum estudo publicado a respeito de sua possível ação estrogênica, dessa forma o objetivo do nosso estudo foi investigar os componentes das folhas da *Morus nigra* e suas atividades farmacológicas através de mudanças nos níveis plasmáticos de hormônios sexuais femininos e de alterações no epitélio vaginal em um modelo de ovariectomia em ratas Wistar.

2 Referências Bibliográficas

ALBERTAZZI, P.; PANSINI, F.; BONACCORSI, G.; ZANOTTI, L.; FORINI, E.; DE ALOYSIO, D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*, v.91, n.1, p.6-11, Jan. 1998.

ANDALLU, B.; VARADACHARYULU, N.C.H. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta*, v.338, n.1-2, p.3-10, Dec. 2003.

ANDALLU, B.; SURYAKANTHAM, V.; SRIKANTHI, B. L.; REDDY, G. K. Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. *Clin Chem Acta*, v.314, p.47-53, 2001.

ANDLAUER, W.; KOLB, J.; FÜRST, P. Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. *J Nutr*, v.130, n.12, p.3021-3027, Dec. 2000.

ATKINSON, C.; WARREN, R.M.; SALA, E.; DOWSETT, M.; DUNNING, A.M.; HEALEY, C.S.; RUNSWICK, S.; DAY, N.E.; BINGHAM, S.A. Red-clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res*, v.6, n.3, p.170-179, Feb. 2004.

BECK, S.; UNTERRIEDER, E.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; JUNGBAUER, A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.84, p.259-268, 2003.

BOTSARIS, A.S. Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras. São Paulo: Ed. Ícone, 1995.

BOULET, M.J.; ODDENS, B.J.; LEHERT, P.; VEMER, H.M.; VISSER, A. Climacteric and menopause in seven South-east Asian countries. *Maturitas*, v.19, n.3, p.157-176, Oct. 1994.

BRUNETON, J. Pharmacognosie et Phytochimie, Plantes médicinales, technique et documentation. Paris: Ed. Lavoisier, 1993.

BRZEZINSKI, A.; DEBI, A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.85, p.47-51, Jul. 1999.

BRZOZOWSKI, A.M.; PIKE, A.C.; DAUTER, Z.; HUBBARD, R.E.; BONN, T.; ENGSTRÖM, O.; OHMAN, L.; GREENE, G.L.; GUSTAFSSON, J.A.; CARLQUIST, M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, v.389, n.6652, p.753-758, Oct. 1997.

BURDETTE, J.E.; LIU, J.; LANTVIT, D.; LIM, E.; BOOTH, N.; BHAT, K.P.; HEDAYAT, S.; VAN BREEMEN, R.B.; CONSTANTINOU, A.I.; PEZZUTO, J.M.; FARNSWORTH, N.R.; BOLTON, J.L. *Trifolium pratense* (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, v.132, n.1, p.27-30, Jan. 2002.

BUTENANDT, A.; JACOBI, H. *Physiol.Chem*, v.218, p.104-112, 1993.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, v.21, n.1, p.99-105, Jan / Feb. 1998.

CHAI, O.H.; LEE, M.S.; HAN, E.H.; KIM, H.T.; SONG, C.H. Inhibitory effects of *Morus alba* on compound 48/80-induced anaphylactic reactions and anti-chicken gamma globulin IgE- mediated mast cell activation. *Biol Pharm Bull*, v.28, n.10, p.1852-1858, Oct. 2005.

CHATTERJEE, G.K.; BURMAN, T.K.; NAGCHAUDHURI, A.K.; PAL, S.P. Antiinflammatory and Antipyretic Activities of *Morus indica*. *Planta Med*, v.48, n.6, p.116-119, Jun. 1983.

CHEN, F.; NAKASHIMA, N.; KIMURA, I.; KIMURA, M.; ASANO, N.; KOYA, S. Potentiating effects on pilocarpine-induced saliva secretion, by extracts and N-containing sugars derived from mulberry leaves, in streptozotocin-diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, v.18, p.1676-1680, 1995.

CHEN, J.; LI, X. Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice. *Asia Pac J Clin Nutr*, v.16 n.1, p.290-294, 2007.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*, v.76, n.7-8, p.608-613, Dec. 2005.

CHUNG, T.K.; YIP, S.K.; LAM, P.; CHANG, A.M.; HAINES, C.J. A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study on the effect of oral oestradiol on acute menopausal symptoms. *Maturitas*, v.25, n.2, p.115-123, Oct. 1996.

CHUNG, K.O.; KIM, B.Y.; LEE, M.H.; KIM, Y.R.; CHUNG, H.Y.; PARK, J.H.; MOON, J.O. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J Pharm Pharmacol*, v.55. p.1695-1700, Dec. 2003.

CICERO, A.F.; DEROSA, G.; ARLETTI, R. Effect of oral chronic isoflavones supplementation on male rat sexual performances and sexual hormone plasma levels. *Phytother Res*, v.18, n.10, p.849-852, Oct. 2004.

CIRCOSTA, C.; PASQUALE, R.D.; PALUMBO, D.R.; SAMPERI, S.; OCCHIUTO, F. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytother Res*, v.20, n.8, p.665-669, Aug. 2006.

CLIFTON-BLIGH, P.B.; BABER, R.J.; FULCHER, G.R.; NERY, M.L.; MORETON, T. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. *Menopause*, v.8, n.4, p.259-265, Jul – Aug, 2001.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON, L.J. 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int*, v.2, n.6, p.285-289, Nov. 1992.

COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; VANDEN BERGHE, D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med*, v.69, n.7, p.589-599, Jul. 2003.

DAY, A.J.; DUPONT, M.S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M.J.; MORGAN, M.R.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*, v.436, n.1, p.71-75, Sep. 1998.

DOI, K.; KOJIMA, T.; MAKINO, M.; KIMURA, Y.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. *Chem Pharm Bull*, v.49, p.151-153, 2001.

DOI, K.; KOJIMA, T.; FUJIMOTO, Y. *Biol Pharm Bull*, v.23, p.1066-1071, 2000.

DU, J.; HE, Z.D.; JIANG, R.W.; YE, W.C.; XU, H.X.; BUT, P.P. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry*, v.62, p.1235-1238, 2003.

DUNCAN, A.M.; UNDERHILL, K.E.; XU, X.; LAVALLEUR, J.; PHIPPS, W.R.; KURZER, M.S. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, v.85, n.1, p.448, Jan. 2000.

EL-BESHBISHY, H.A.; SINGAB, A.N.; SINKKONEN, J.; PIHLAJA, K. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sci*, v.78, n.23, p.2724-2733, May. 2006.

ENKHMAA, B.; SHIWAKU, K.; KATSUBE, T.; KITAJIMA, K.; ANUURAD, E.; YAMASAKI, M.; YAMANE, Y. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, v.135, n.4, p.729-734, Apr. 2005.

ENTRALGO, L. Historia de la Medicina. Barcelona: Ed. Salvat, 1989.

FANTI, P.; MONIER-FAUGERE, M.C.; GENG, Z.; SCHMIDT, J.; MORRIS, P.E.; COHEN, D.; MALLUCHE, H.H. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, v.8, n.3, p.274-281, 1998.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Drug Discovery from Nature. Berlin: Ed. Springer, 1999.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 5ª edição, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2006.

HALE, G.E.; HUGHES, C.L.; CLINE, J.M. Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk", and isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, n.1, p.3-15, Jan. 2002.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F. M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*, v.13, p.17-25, 2007.

HO, S.C.; BACON, W.E.; HARRIS, T.; LOOKER, A.; MAGGI, S. Hip fracture rates in Hong Kong and the United States, 1988 through 1989. *Am J Public Health*, v.83, n.5, p.694-697, May. 1993.

HONG, H. C.; HUR, S. K.; OH, O.; KIM, S. S.; NAM, K. A.; LEE, S. K. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J Ethnopharmacol*, v.83. p.153-159, 2002.

IGNJATOVIC, V.; OGRU, E.; HEFFERNAN, M.; LIBINAKI, R.; LIM, Y.; NG, F. *Pharmac.Biol*, n.38, p. 30, 2000.

JANG, M. H.; KIM, H.; SHIN, M. C.; LIM, B. V.; LEE, T. H.; JUNG, S.B. KIM, C. J.; KIM, E. H. Administration of *folium mori* extract decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol*, v.90. p.189-192, Oct. 2002.

JIN, Y.S.; KIM, M.K.; HEO, S.I.; HAN, W.; WANG, M.H. Identification and properties of 2,5-dihydroxy-4,3'-di(beta-D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from *Morus bombycis* Koidzumii roots. *Phytother Res*, v.21, n.7, p.605-608, Jul. 2007.

JIN, Y.S.; LEE, M.J.; HAN, W.; HEO, S.I.; SOHN, S.I.; WANG, M.H. Antioxidant effects and hepatoprotective activity of 2,5-dihydroxy-4,3'-di(beta-d-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from *Morus bombycis* Koidzumii roots on CCl₄-induced liver damage. *Free Radic Res*, v.40, n.9, p.986-992, Sep. 2006.

KANG, T.H.; OH, H.R.; JUNG, S.M.; RYU, J.H.; PARK, M.W.; PARK, Y.K.; KIM, S.Y. Enhancement of neuroprotection of mulberry leaves (*Morus alba* L.) prepared by the anaerobic treatment against ischemic damage. *Biol Pharm Bull*, v.29, n.2, p.270-274, Feb. 2006.

KIM, A.J.; PARK, S. Mulberry extract supplements ameliorate the inflammation-related hematological parameters in carrageenan-induced arthritic rats. *J Med Food*, v. 9, n.3, p.431-435, 2006.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc*, v.99, n.2, p.213-218, Feb. 1999.

LAMPE, J.W.; MARTINI, M.C.; KURZER, M.S.; ADLERCREUTZ, H.; SLAVIN, J.L. Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *Am J Clin Nutr*, v.60, n.1, p.122-128, Jul. 1994.

LAWRENCE, R.N. *Drug Discovery Today*, v.4, p.449-451, 1999.

LEE, S.H.; CHOI, S.Y.; KIM, H.; HWANG, J. S.; LEE, B. G.; GAO, J.J.; KIM, S. Y. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull*, v.25, p.1045-1048, 2002.

LORENZI, H; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 255-256, 2003.

LOZOYA, X. *Investigación y Ciencia*, v. 254, p.4, 1997.

MALAIVIJITNOND, S.; KIATTHAIPIPAT, P.; CHERDSHEWASART, W.; WATANABE, G.; TAYA, K. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *J Pharmacol Sci*, v.96, n.4, p.428-435, Dec. 2004.

MILLER, C.P.; COLLINI, M.D.; HARRIS, H.A. Constrained phytoestrogens and analogues as ERbeta selective ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.21, n.13(14), p.2399-2403, Jul. 2003.

MUELLER, S.O.; SIMON, S.; CHAE, K.; METZLER, M.; KORACH, K.S.; Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxico Sci*, v.80, n.1, p.14-25, Jul. 2004.

NADERI, G.A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; OROOJY, H.; AFSHIN-NIA, F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytother Res*, v.18, p.365-369, 2004.

NAM, S.Y.; YI H.K.; KIM, J.C.; SONG, C.H.; PARK, J.W.; LEE, D.Y.; KIM, J.S.; HWANG, P.H. Cortex mori extract induces cancer apoptosis through inhibition of microtubule assembly. *Arch Pharm Res*, v.25, p.191-196, 2002.

NELSON, H.D. Commonly used types of postmenopausal estrogen for treatment of hot flashes: scientific review. *JAMA*, v. 291, n.13, p.1610-1620, Apr. 2004.

NELSON, H.D. Menopause. *Lancet*, v.371, n.9614, p.760-770, Mar. 2008.

NOMURA, T. "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products", v.53. New York: Ed. Springer-Verlag, p.87-2001, 1988.

OH, K.S.; HAN, W.; WANG, M.H.; LEE, B.H. The effects of chronic treatment with *Morus bombycis* KOIDZUMI in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*, v. 30, n.7, p.1278-1283, Jul. 2007.

PARK, K.M.; YOU, J.S.; LEE, H.Y.; BAEK, N.I.; HWANG, J.K. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *J Ethnopharmacol*, v.84.p.181-185, 2003.

PETILLI, M.; FIORELLI, G.; BENVENUTI, S.; FREDIANI, U.; GORI, F.; BRANDI, M.L. Interactions between ipriflavone and the estrogen receptor. *Calcif Tissue Int*, v.56, n.2, p.160-165, Feb. 1995.

PETLEVSKI, R.; HADZIJA, M.; SLIJEPCEVIC, M.; JURETIC, D. Effect of "antidiabetic" herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol*, v.75, p.181-184, 2001.

POTTER, S.M.; BAUM, J.A.; TENG, H.; STILLMAN, R.J.; SHAY, N.F.; ERDMAN JW, J.R. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, v.68 (6 Suppl), p.1375S-1379S, Dec. 1998.

QUELLA, S.K.; LOPRINZI, C.L.; BARTON, D.L.; KNOST, J.A.; SLOAN, J.A.; LAVASSEUR, B.I.; SWAN, D.; KRUPP, K.R.; MILLER, K.D.; NOVOTNY, P.J. Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: A North Central Cancer Treatment Group Trial. *J Clin Oncol*, v.18, n.5, p.1068-1074, Mar. 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 5ª edição, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2005.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods a compendium of literature values. *Nutr Cancer*, v.26, n.2, p.123-148, 1996.

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*, v.115, Suppl.1, p.62-68, Dec. 2007.

ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.L.; LACROIX, A.Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M.L.; JACKSON, R.D.; BERESFORD, S.A.; HOWARD, B.V.; JOHNSON, K.C.; KOTCHEN, J.M.; OCKENE, J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, v. 288, n.3, p.321-333, Jul. 2002.

RUSSELL, L.; HICKS, G.S.; LOW, A.K.; SHEPHERD, J.M.; BROWN, C.A. Phytoestrogens: a viable option? *Am J Med Sci*, v.324, n.4, p.185-188, Oct. 2002.

RYU, J.H.; AHN, H.; KIM, J.Y.; KIM, Y.K. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother Res*, v.17, n.5, p.485-489, May. 2003.

SACKS, F.M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, W.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, v.113, n.7, p.1034-1044, 2006.

SAKAGAMI, H.; ASANO, K.; SATOH, K.; TAKAHASHI, K.; TERAUBO, S.; SHOJI, Y.; NAKASHIMA, H.; NAKAMURA, W. Anti-stress activity of mulberry juice in mice. *In Vivo*, v.20, n.4, p.499-504, Jul - Aug. 2006.

SCAMBIA, G.; MANGO, D.; SIGNORILE, P.G.; ANSEMI ANGELI, R.A.; PALENA, C.; GALLO, D.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; MANCUSO, S. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. *Menopause*, v.7, n.2, p.105-111, Mar – Apr. 2000.

SINGAB, A.N.; EL-BESHBISHY, H.A.; YONEKAWA, M.; NOMURA, T.; FUKAI, T. Hypoglycemic effect of *Egyptian Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, v.100, n.3, p.333-338, Sep. 2005.

SONG, T.T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J Agric Food Chem*, v.50, n.8, p.2470, Apr. 2002.

SOUZA, M.M.; BITTAR, M.; FILHO, V.C.; YUNES, A.; MESSANA, I.; MONACHE, F.D.; FERRARI, F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Z Naturforsch*, v.55, p.256-260, 2000.

TAYLOR, M. Botanicals: medicines and menopause. *Clin Obstet Gynecol*, v.44, n.4, p.853-863, Dec. 2001.

UMLAND, E.M.; CAUFFIELD, J.S.; KIRK, J.K.; THOMASON, T.E. Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy*, v.20, n.8, p.981-990, 2000.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?. *Quím. Nova*, v.28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERGNE, S.; TITIER, K.; BERNARD, V.; ASSELINEAU, J.; DURAND, M.; LAMOTHE, V.; POTIER, M.; PEREZ, P.; DEMOTES-MAINARD, J.; CHANTRE, P.; MOORE, N.; BENNETAU-PELISSERO, C.; SAUVANT, P. Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of soy-based supplements formulation and equol production. *J Pharm Biomed Anal*, v.43, n.4, p.1488-1494, 2007.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

WHITING, P.W.; CLOUSTON, A.; KERLIN, P. Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *Med J Australia*, v.177, n.8, p.440-443, 2002.

WHO, World Health Organization pages Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. Geneva, p.1, 1993.

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.14, n.44 Suppl 1, p.S9-S20, Mar. 2003.

YE, S.F.; SAGA, I.; ICHIMURA, K.; NAGAI, T.; SHINODA, M.; MATSUZAKI, S. Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats. *Endocr Regul*, v.37, n.3, p.145-152, 2003.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 1ª ed. Chapecó: Ed. Argos, 2001.

**EFFECT OF EXTRACT FROM THE *Morus nigra* LEAVES ON VAGINAL
CITOLOGY AND FEMALE SEX HORMONES PLASMATIC LEVELS IN WISTAR
RATS**

Viviane C. Bolzan¹, Helena M. T. Barros², Vanusa R. Lando², Clarice Luz³ and
Denise C. M. Dantas^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

²Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre, Brazil

³Lab.Vitrus - Análises e Pesquisas Clínicas, Brazil

*Correspondence to: Dra D. C. M. Dantas, Departamento de Ciências
Fisiológicas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

ADDRESS: Sarmiento Leite, 245

ZIP CODE: 90050-170

PHONE: +55 51 3303-8755

E-mail: ddantas@ufcspa.edu.br

Abstract

Deficiency of estrogens during menopause can lead to different symptoms such as hot flashes, osteoporosis, etc. The benefits of plant extracts as alternatives to postmenopausal hormonal therapy (HT) have been discussed because its undesirable effects. Phytoestrogens are natural compounds that exert the estrogenic activity. Popularly the *Morus nigra* leaves are used as a tea that regulates the symptoms caused by menopause without the adverse effects of HT. This study evaluated the compounds of *Morus nigra* leaves and the effect of methanolic extract through the changes in plasmatic LH and FSH and vaginal cytology in rats ovariectomized. The methods thin-layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC) demonstrated that methanol was the solvent that extracted a larger amount of constituents from the leaves. Analysis chromatographic by TLC revealed that *Morus nigra* extract presented a spot with similar *R_f* (retention factor) to the 17 β -estradiol. Results obtained *in vivo* demonstrated that the treatment with the extract have no significant difference in vaginal epithelium changes. However, a significant reduction of plasmatic LH concentration in doses 150mg/Kg and 350mg/Kg was observed producing a similar bell shaped dose-response curve. In contrast, FSH levels were similar in controls and treated rats. Further studies are required to investigate the active constituents responsible for possible activity estrogenic of *Morus nigra*.

Keywords: *Morus nigra* leaves; ovariectomized rats; phytoestrogens; sexual hormones; chromatography; dose-response curve.

Introduction

The imbalance in the production of female hormones by the ovaries characterizes a period in the woman's life known as menopause which is responsible for effects such as: hot flashes, sweats, osteoporosis, anxiety, depression, urogenital atrophy, and others (Beck *et al.*, 2003).

Postmenopausal women make use of Hormone Therapy (HT) with estrogen that, although it is used, it is being changed because of the adverse effects as the development of tumors estrogen-dependent, cardiovascular risks, etc (Russell *et al.*, 2002).

The use of some plants containing phytohormones could be an alternative to HT. The first records of the presence of substances similar to the female sex hormones in plants were published in the decade of 1930 (Butenandt and Jacobi, 1993).

The main classes of these compounds are isoflavones, lignans and coumestans. Phytoestrogens are found in many plants such as *Glycine max*, *Cimicífuga racemosa*, *Angelica sinensis* and *Pueraria mirifica* (Brzezinski and Debi, 1999), with similar chemical and structural properties to those of estrogens. Many phytoestrogens have an affinity for estrogen receptors and this characteristic apparently plays a role in their health-promoting effects (Mueller *et al.*, 2004)

Popularly the leaves from *Morus sp* are used for the preparation of a tea that makes a regulation of symptoms produced by menopause without any adverse effects of HT.

Plants of genus *Morus sp* are known to be rich in flavonoids, a group of chemicals that shows a potent antiviral activity against herpes simplex virus (Du *et al.*, 2003). Also the *Morus sp* showed antiallergic (Chai *et al.*, 2005) and anti-inflammatory

activity (Chung *et al.*, 2003). This herb has been long used empirically as antiphlogistic, diuretic and expectorant and it is also applied in controlling inflammation, diabetes, and bronchial asthma (Bown, 1995).

In Brazil the *Morus nigra* is the most widespread *Morus sp* due to our climate (Hassimotto *et al.*, 2007) and its leaves are the most used leaves for estrogenic effects, although no study about this action was found.

The *Morus nigra* is a medicinal plant that belongs to the family of Moraceae and is popularly known as blackberry.

The studies with *Morus nigra* showed that three different extracts from the fruit of *Morus nigra* had a protective action against peroxidative damage to biomembranes and biomolecules *in vitro* (Naderi *et al.*, 2004), they also showed that morusin is a phenylflavonoid in the mulberry black root barks that produces an analgesic effect in animal model of pain (Souza *et al.*, 2000), and that ethanolic extract from the leaves caused a hypoglycemic effect in rats with diabetes that was induced by aloxano (Petlevski *et al.*, 2001) .

The purpose in our study was to evaluate the compounds from the leaves of *Morus nigra* and their pharmacological activities through the eventual changes in plasmatic sexual hormone concentrations and vaginal cytology in female rats.

Material and Methods

Collection of plants:

Morus nigra leaves were collected in the city of Cerro Largo, in the South of Brazil, distant from pollution of the city. Samples of the leaves were taken to evaluate and to confirm the specie.

Preparation of crude extracts:

Powdered, air dried leaves of *Morus nigra* compounds were extracted with different solvents in a *Soxhlet* apparatus. The solvent extractions were chosen in a mixture of ethanol and water in a proportion of 60% and 40%, respectively, methanol, ethyl acetate, dichloromethane, n-hexane. These solvents were chosen according to their polarity. The resulting solution was filtered with filter paper and stored in refrigerator. The solvents were removed by a rotating evaporator (Quimis, model Q-344 to 1 / 2) under vacuum and the crude extract was obtained. Samples of the crude extract were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) utilizing the system ethyl acetate / cyclohexane (1:1) on silica gel F₂₅₄. Spots were visualized under ultraviolet (UV) light. The standard used to investigate the compounds of *Morus nigra* extract by TLC was 17 β -estradiol (Sigma®).

Gas chromatography (GC):

Analysis was performed in a chromatograph Perkin Elmer Auto System XL equipped with the flame ionization detector, which provides a capillary column PE-01 (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) and also a gas pressure for drag (Nitrogen) on the head of the column of 15psi. Therefore, the best conditions for analysis after several tests were: Injection port: 200°C; Detector: 250°C and column 100°C (1 min), followed by heating of 15°C/minute, up to 250°C. The 250°C temperature

remained for 14 minutes. For the analyses by GC was used the standard 17 β -estradiol (Sigma®).

Animals:

Eighty female Wistar rats weighing 250-300g from the breeding stock of the animal house of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) were used. Rats were maintained in polypropylene cages (33x17x40cm), five rats per cage, under standard environmental conditions of illumination (lights on from 7am to 7pm), humidity (55%) and temperature (22 \pm 2°C). Food and water were available *ad libitum*. Breeding, housing and experimental procedures followed guidelines published in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and obeyed by the current Brazilian laws. The study was approved by the UFCSPA Committee of Ethics (n° 162/06).

Treatment protocol:

Animals were divided into eight groups with ten rats in each one. Conjugated equine estrogen and *Morus nigra* extract were solubilized in distilled water (vehicle). Oral administration (gavage) was chosen. The animals were assigned to one of the following groups: control (non-ovariectomized), ovariectomized (OVX), both receiving vehicle, OVX-conjugated equine estrogen (Galena®) 2mg/Kg/day, OVX-*Morus nigra* extract (150, 200, 250, 300 and 350mg/Kg/day). The treatments were administered orally during 15 days.

Procedures:

Rats were ovariectomized bilaterally under intraperitoneal ketamine and xilasine anesthesia. The skin and muscle of the abdomen were incised. Both ovaries were removed and the muscle and overlaying skin were then sutured with silk. One week later the animals were assigned to an experimental group performed.

The estrous cycle was checked and followed by microscopic analysis of cytological alterations on de vaginal smear from the animals during one week validating the surgery in the case the rats remained in a quiescent, non-ovulatory period (diestrus).

Blood sample

Before and after the last day of treatment rats were anesthetized and blood sample were collected by intraorbital puncture. To determine the luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in the plasma were used kits MAIA clone in liquid phase using a counter gamma (DPC Gamma-C12) by radioimmunoassay.

Estrous cycle:

The vaginal smear of each rat was examined daily during the 15 days of treatment and classified in proestrus (characterized by nucleated epithelial cells, the preovulatory stage), estrus (characterized by cornified epithelial cells, the ovulatory stage), metestrus (characterized by a mixture of cornified and nucleated epithelial cells with an infiltration of leukocytes, the pos-ovulatory stage) or diestrus (characterized by leukocytes and mucus).

Statistical Analysis

Statistical analysis of alterations of the estrous cycle was performed by the Fisher Exact Test. Student's *t*-test was used to make a statistical comparison between the groups non-OVX and OVX. Statistical analysis of differences between individual groups was carried out by one-way ANOVA and *post hoc* analyses were performed using Fisher LSD Method. Analyses were performed by software *Sigma-Stat 3.1* (SPSS). Results are expressed as means \pm S.E.M. Significant statistical differences were accepted when $p < 0,05$.

Results and Discussion

Qualitative studies were performed to determine the best extraction solvent for the leaves of *Morus nigra*. Firstly five solvents were tested for preparation of the extracts and these extracts were submitted to both chromatographic analyses by TLC and GC. The solvent that extracted a larger amount of constituents from the leaves was methanol. The extracts prepared with methanol showed a more concentrated spot in the TLC (Figure 1) and a larger area in the chromatogram curve obtained in the GC. The solvent methanol is widely employed in the preparation of different extracts due to a high polarity. Methanol has been used previously in other studies such as Choi and Hwang (2005) where *Morus alba* leaf methanolic extract and its fractions (chloroform, butanol and aqueous fractions) showed anti-inflammatory action to reduce some inflammatory mediators (nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor α (TNF- α)) in RAW264.7 macrophages. Also, methanolic extract from the leaves of *Morus alba* showed to be a potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS) *in vitro* (Hong *et al.*, 2002).

After choosing the solvent, *Morus nigra* extracts were analyzed by TLC to investigate the components similarities of the extract with the standard 17 β -estradiol. It was found that the extracts had a spot with very similar *R_f* (retention factor) to the standard 17 β -estradiol in TLC (Figure 2). However, subsequent analysis by GC did not identify the similar compound to the 17 β -estradiol (retention time: 24min).

Since no similarity with 17 β -estradiol was found other compounds with estrogenic action will be tested by GC to find structural similarities between themselves and the components of the extract of *Morus nigra*.

In the evaluation of vaginal smears our results demonstrated that the control group, with endogenous hormonal production, was cycling normally, the OVX group remained in diestrus and the OVX group that received conjugated equine estrogen became estrus and remained until the end of the study. Similar results were also found in the study by Hascalik *et al.* (2005). The group that received 150mg/Kg of the extract showed little change in vaginal cytology. In this group only two rats changed from diestrus to estrus and proestro. However, these changes were observed in isolated days and they did not remain. Besides there was no significant difference ($p = 0,474$) compared to the group ovariectomized (OVX) in respect to vaginal smear changes. In other doses the rats remained in diestrus.

The measure of gonadotropins before starting the treatment with *Morus nigra* showed that there was no difference in the levels of FSH and LH between the control group non-ovariectomized ($3,266 \pm 0,647$ ng LH/ ml and $2,353 \pm 0,389$ ng FSH / ml) and ovariectomized ($3,234 \pm 0,257$ ng LH / ml and $3,603 \pm 0,313$ ng FSH / ml) ($p = 0,967$ and $p = 0,143$, respectively). This result was due to the fact that the ovariectomy of the 70 animals were realized 7 days before the beginning of the treatment stimulating a rise of LH and FSH while the control group without surgery presented 7 rats in diestrus on the day of the blood collect also resulting in high gonadotropins levels .

The evaluation of gonadotropins showed that the levels of LH decreased after 15 days of treatment in the groups that received 150 and 350 mg / kg of *Morus nigra* extract compared to group ovariectomized (OVX) ($p = 0,049$) (Figure 3). As described in other studies (Rachoń *et al.*, 2007), the rats that received conjugated equine estrogen also presented decreased levels of LH. On the other hand, the FSH levels demonstrated no differences among the groups (Table 1).

Our results demonstrated that *Morus nigra* extract produced a similar bell shaped dose-response curve. It is difficult to explain the appearance of this type of dose-response curve because this is unusual in pharmacological studies *in vivo*, but studies *in vitro* demonstrated a similar curve (Emos *et al.*, 1984; Emons *et al.*, 1986).

Similar results were observed in studies of Emos *et al.* (1984) that tested the effects of estradiol (E_2) in various concentrations on rat pituitary cells culture. The LH-response of these cultures to gonadotrophin releasing hormone (GnRH) was monitored. The results demonstrated that when the cells were treated for 24h with E_2 , the typical bell shaped dose-response curve was observed. Low E_2 -concentrations led to a dose dependent positive effect on pituitary LH-secretion. At higher E_2 -concentrations this positive effect is less expressed and finally turns into a negative effect at extremely high E_2 -concentrations.

The effects of some selective estrogen receptor modulators (SERMs) (clomiphene, tamoxifen) was tested by another study on rat pituitary cells in culture resulting in bell shaped dose-response curves (Emons *et al.*, 1986).

Our results suggest that the *Morus nigra* effects (negative or positive) on LH secretion is dose dependent, but further studies *in vitro* and *in vivo* are required to confirm these results.

In ovariectomized rats, as well as in postmenopausal women, LH release occurs in large pulses, which is due to an overactivation of the hypothalamic GnRH pulse generator. Neurotransmitters driving the GnRH pulse generator are spilled over to other hypothalamic neurons, which are regulatory to the body temperature and to the cardiovascular regulatory neurons. Therefore, LH pulses in the blood often coincide with hot flashes and tachycardiac episodes. The negative feedback action

of estrogens in the hypothalamus on the GnRH pulse generator is therefore the major reason for a reduction of tachycardiac-associated hot flashes. Thus, suppression of pulsatile LH secretion may be beneficial to women suffering from hot flashes (Tataryn *et al.*, 1980). Consequently, the extract of *Morus nigra* leaves and other substances with estrogenic activity may be in the future a clinically useful alternative to reduce hot flashes (Seidlová-Wuttke *et al.*, 2004).

The behavior of gonadotropins in studies *in vivo* is diverse. As in the study with gonadectomized female and male rats of Malaivijitnond *et al.* (2004) that tested the effect of *Pueraria mirifica* crude extract (0, 10, 100 and 1000mg/Kg), which contains several phytoestrogens such as daidzin, daidzein, genistin, genistein and puerarin. It was found that a dose capable of altering the vaginal epithelium (100mg/Kg) was unable to reduce the levels of FSH and LH in ovariectomized rats. Still in the same study was seen that *Pueraria mirifica* can only reduce the levels of LH and FSH in the largest dose (1000mg/Kg) in female rats. However, in male rats the largest dose attenuated only the increase of serum LH levels. Cicero *et al.* (2004) also found a decrease in the levels of LH in male rats treated with soy isoflavones, and the levels of FSH did not change. Circosta *et al.* (2006) evaluated the action of standardized extract of *Angelica sinensis* and found estrogen action by cornification in the vaginal epithelium in ovariectomized rats and decreased levels of LH, but not FSH.

Through our results we can suggest that *Morus nigra* may have estrogenic activity responsible for the decrease in the levels of LH in some doses producing a similar bell shaped dose-response curve, but further studies *in vitro* are required to investigate the active constituents responsible for such activity. Studies *in vivo* are

also necessary to elucidate the mechanism of the action of *Morus nigra* extract components.

Recently, the chromatograms of *Morus nigra* extract have been compared to the chromatograms of isoflavone by GC. Similar peaks were observed but further studies are required to confirm.

The isolation and structural elucidation of active compounds from the leaves are already in progress and certainly will bring new perspectives regarding *Morus nigra*.

References

Beck S, Unterrieder E, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. 2003. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**:259-68.

Bown D. *Encyclopedia of Herbs and Their Uses*. London: Dorling Kindersley; p.313-314, 1995.

Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? 1999. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **85**:47-51.

Butenandt A, Jacobi H. 1993. *Physiol.Chem* **218**:104-12.

Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. 2005. Inhibitory effects of *Morus alba* on compound 48/80-induced anaphylactic reactions and anti-chicken gamma globulin IgE-mediated mast cell activation. *Biol Pharm Bull* **28**(10):1852-858.

Choi EM, Hwang JK. 2005. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia* **76**(7-8):608-13.

Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, Moon JO. 2003. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J Pharm Pharmacol* **55**:1695-700.

Cicero AF, Derosa G, Arletti R. 2004. Effect of oral chronic isoflavones supplementation on male rat sexual performances and sexual hormone plasma levels. *Phytother Res* **18**(10):849-52.

Circosta C, Pasquale Rd, Palumbo Dr, Samperi S, Occhiuto F. 2006. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytother Res* **20**(8):665-69.

Du J, He ZD, Jiang RW, Ye WC, Xu HX, But PP. 2003. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry* **62**:1235-38.

Emons G, Knuppen R, Ball P, Catt KJ. 1984. Biphasic modulation of pituitary sensitivity to GnRH by oestrogens: the effects of A- and D-ring substitution on LH release in cultured pituitary cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* **107**(3):317-27.

Emons G, Ortmann O, Thiessen S, Knuppen R. 1986. Effects of estradiol and some antiestrogens (clomiphene, tamoxifen, and hydroxytamoxifen) on luteinizing hormone secretion by rat pituitary cells in culture. *Arch Gynecol* **237**(4):199-211.

Hascalik S, Celik O, Tamser M, Mizrak B. 2005. Effects of resveratrol, raloxifene, tibolone and conjugated equine estrogen on vaginal squamous cell maturation of ovariectomized rats. *Gynecol Obstet Invest* **60**(4):186-91.

Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. 2007. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International* **13**:17-25.

Hong HC, Hur SK, Oh O, Kim SS, Nam KA, Lee SK. 2002. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J Ethnopharmacol* **83**:153-59.

Malaivijitnond S, Kiatthaipipat P, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. 2004. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *J Pharmacol Sci* **96**(4):428-35.

Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. 2004. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxico Sci* **80**(1):14-25.

Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. 2004. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytotherapy Res* **18**:365-69.

Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M, Juretic D. 2001. Effect of "antidiabetic" herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol* **75**:181-84.

Rachoń D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W. 2007. Effects of dietary equol on the pituitary of the ovariectomized rats. *Horm Metab Res* **39**(4):256-61.

Russell L, Hicks GS, Low AK, Shepherd JM, Brown CA. 2002. Phytoestrogens: a viable option? *Am J Med Sci* **324**(4):185-88.

Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Rimoldi G, Thelen P, Christoffel V, Wuttke W. 2004. *Belamcanda chinensis* and the thereof purified tectorigenin have selective estrogen receptor modulator activities. *Phytomedicine* **11**(5):392-403.

Souza MM, Bittar M, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Messana I, Monache FD, Ferrari F. 2000. Antinociceptive properties of Morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Z. Naturforsch.* **55c**:256-60.

Tataryn IV, Lomax P, Bajorek JG, Chesarek W, Meldrum DR, Judd HL. 1980. Postmenopausal hot flushes: a disorder of thermoregulation. *Maturitas* **2**(2):101- 7.

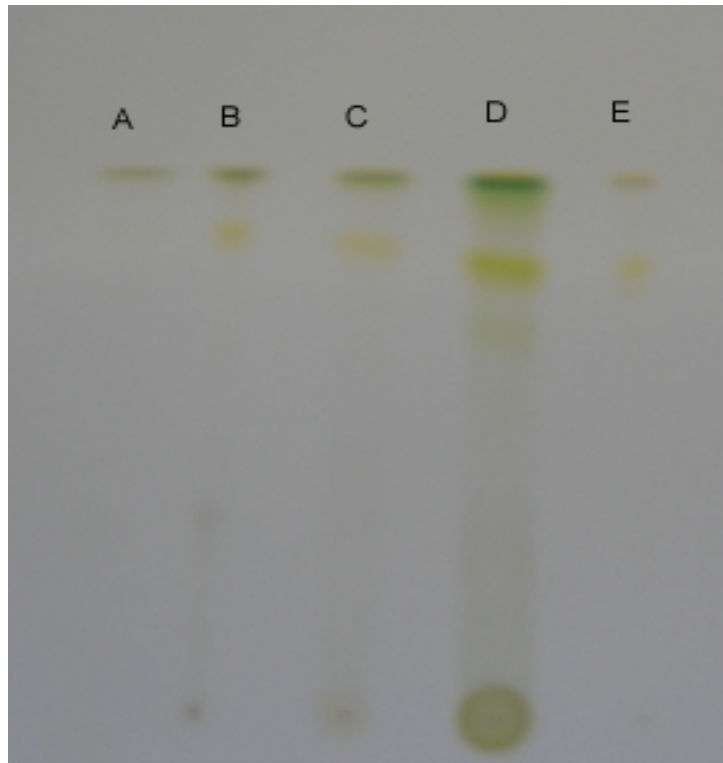


Figure 1. Thin-Layer Chromatography (TLC) with the five different solvents used in preparation of *Morus nigra* extracts. A: Dichloromethane B: Ethanol/H₂O C: Ethyl Acetate D: Methanol E: n-Hexane.



Figure 2. Thin-Layer Chromatography (TLC) with the standard 17 β -estradiol and methanolic extract from the leaves of *Morus nigra*. A:17 β -estradiol B:methanolic extract from the leaves of *Morus nigra*.

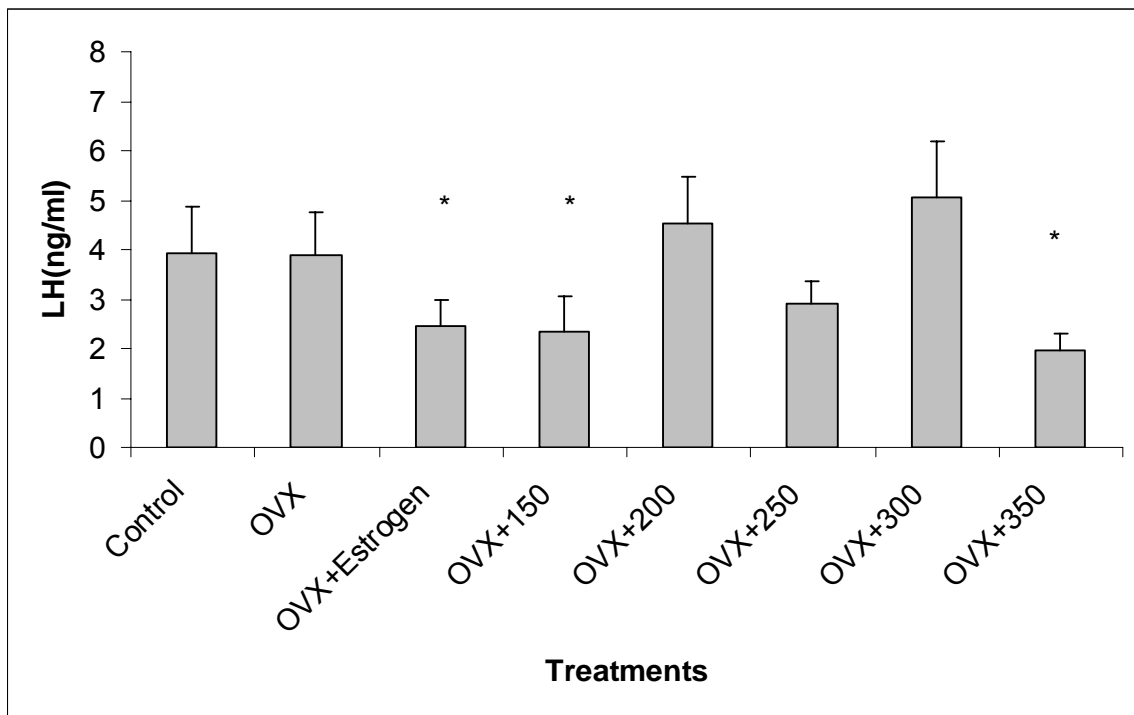


Figure 3. Luteinizing Hormone (LH) levels of rats after 15 days of treatment. Group control received vehicle, group OVX received vehicle, group OVX + Estrogen received 2mg/Kg of conjugated equine estrogen, groups OVX + 150, OVX + 200, OVX + 250, OVX + 300, OVX + 350 received 150mg/Kg , 200mg/Kg, 250mg/Kg, 300mg/Kg and 350mg/Kg of *Morus nigra* extract, respectively. Mean \pm S.E.M. OVX: ovariectomized.

* $p < 0,05$

Table 1. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) levels of rats after treatment during 15 days

<i>Treatment</i>	<i>N</i>	<i>FSH after treatment (ng/ml)</i>
Control	10	3,948 ± 1,441
OVX	10	3,961 ± 0,717
OVX+Estrogen	10	2,908 ± 0,622
OVX+150	10	3,043 ± 0,789
OVX+200	10	1,892 ± 0,584
OVX+250	10	3,509 ± 0,698
OVX+300	10	3,194 ± 0,587
OVX+350	10	2,779 ± 0,622

Group control received vehicle, group OVX received vehicle, group OVX + Estrogen received 2mg/Kg of conjugated equine estrogen, groups OVX + 150, OVX + 200, OVX +250, OVX + 300, OVX + 350 received 150mg/Kg , 200mg/Kg, 250mg/Kg, 300mg/Kg and 350mg/Kg of *Morus nigra* extract, respectively. Mean ± S.E.M. OVX: ovariectomized.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)