

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

AHIRLAN SILVA DE CASTRO

**EFEITO DE *Morus nigra* L. COMO TERAPIA HORMONAL
EM RATAS OOFORECTOMIZADAS**

São Luís
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AHIRLAN SILVA DE CASTRO

**EFEITO DE *Morus nigra* L. COMO TERAPIA HORMONAL EM RATAS
OOFORECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges

Co-orientadora: Prof^a. Ms. Selma do Nascimento Silva

São Luís
2010

Castro, Ahirlan Silva de

Efeito de *Morus nigra* L. como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas / Ahirlan Silva de Castro. – São Luís, 2010.

65 f.

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marilene Oliveira da Rocha Borges

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós – Graduação em Ciências da Saúde, 2010.

1. *Morus nigra* 2. Terapia hormonal 3. Ooforectomia I. Título.

CDU 582.776.2 : 616 – 056.25

AHIRLAN SILVA DE CASTRO

**EFEITO DE *Morus nigra* L. COMO TERAPIA HORMONAL EM RATAS
OOFORECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges (Orientadora)
Doutora em Farmacologia
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
Doutora em Biologia Parasitária
Universidade Estadual do Maranhão

Profa. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito
Doutora em Ginecologia
Universidade Federal do Maranhão

A *Minha querida mãe,
Jucileide Maria Silva de
Castro, por todos esses
anos de dedicação e amor,
sendo fonte inspiradora de
caráter, honestidade, força e
perspicácia. E ao meu pai “in
memorian”.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que guia todos os meus passos, me direcionando sempre ao caminho certo.

À Prof^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges por ter me dado a oportunidade de ser seu orientando; pela educação, respeito e classe com que me tratou em todos os momentos; e principalmente por ter dividido comigo todo o seu conhecimento que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Às Professoras Selma do Nascimento Silva e Socorro Cartágenes, não só pela contribuição no trabalho, mas também pela amizade de grande valia.

Aos professores Antonio Carlos Romão Borges, Sônia Freire, e Rachel Melo pela importante colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro fundamental ao desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos Gustavo Andrade, Julyana Lima, Leonardo Fabrício, Lívia Costa e Taciana Costa, pela amizade que se faz presente em todos os momentos da minha vida, independente das circunstâncias.

Aos amigos e colegas de laboratório Lucas França e Joleen Lopes, pela amizade e contribuição para o desenvolvimento deste estudo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelos conhecimentos transmitidos e serviços prestados.

Aos professores, funcionários técnicos, doutorandos, mestrandos e alunos de graduação do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse trabalho.

***“Disciplina é liberdade,
Compaixão é fortaleza,
Ter bondade, é ter coragem”.***

Renato Russo

RESUMO

A terapia hormonal (TH) estrogênica ou estroprogestativa é empregada em geral para aliviar os sintomas provenientes do climatério; entretanto, a longa exposição aos estrogênios e aos progestagênios pode incrementar o risco de câncer mamário e endometrial. A busca por alternativas à TH a partir de plantas tem aumentado atualmente, porém estudos sobre seus efeitos colaterais ainda são escassos. *Morus nigra* L. (amora), é uma espécie largamente utilizada na prática popular para aliviar os sintomas do climatério, principalmente os fogachos. Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade estrogênica do extrato hidroalcoólico (EH) das folhas de *Morus nigra* em ratas Wistar ooforectomizadas. As folhas foram secas, pulverizadas e maceradas em etanol a 70% na proporção 1:3 (p/v), para obtenção do EH (13,7%). Foram utilizadas ratas adultas (70 dias) da espécie *Rattus norvegicus*, distribuídas em 5 grupos (n= 6-9): Falso-Operado (FO), administrado com salina (0,1mL/100g); ooforectomizado (OOF), administrado com salina (0,1mL/100g); ooforectomizado tratado com EH 150 mg/Kg (EH150) ou EH 250 mg/Kg (EH250) e ooforectomizado estroprogestativo (EP), administrado com estroprogestativo 0,05 mg/Kg. Com exceção do grupo FO, todos os grupos foram ooforectomizados. Após 21 dias da ooforectomia, receberam, diariamente, suas respectivas soluções, por via oral, durante 18 semanas. Neste período, foram avaliados parâmetros como ciclo estral, consumo alimentar e peso corporal. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados e sacrificados para coleta do sangue e posterior análises bioquímicas, hormonais, peso e histologia do útero. Na análise do ciclo estral, o grupo OOF permaneceu com maior frequência na fase diestro (75,4%) e os grupos EH150 e EH250 apresentaram um aumento da fase estro em 14,5% e 22,3%, respectivamente, quando comparados com o grupo OOF. Já no grupo EP foi observada maior frequência da fase estro (96,9%). A ooforectomia reduziu o peso uterino das ratas. O EH nas doses 150 mg/Kg e 250 mg/Kg promoveu aumento em 200% e 233,3%, respectivamente, quando comparados ao grupo OFF. No grupo EP esse aumento foi de 458,3%. Na análise histológica, os animais pertencentes ao grupo OOF apresentaram um epitélio hipotrófico em maior frequência, estando algumas com características de epitélio tipicamente atrófico. 67% das ratas dos grupos EH150 e 78 % do grupo EH250 apresentaram epitélio proliferativo. Ainda nos grupos EH 150 e EH250, 22% e 11%, respectivamente, apresentaram hiperplasia glandular sem atipia. Já no grupo EP, foi evidenciada uma maior diversidade de alterações nas células endometriais, estando 83% das ratas com epitélio característico de hiperplasia glandular cística simples, sem atipia. A avaliação dos níveis séricos de estradiol demonstra que o grupo OOF apresentou diminuição de 87% nos níveis séricos de estradiol quando comparado ao grupo FO. O EH nas doses de 150 mg/Kg e 250 mg/Kg aumentou em 40,8 % e 108,7 % os níveis séricos de estradiol quando comparados ao grupo OOF. O grupo EP apresentou 1369% de aumento dos níveis de estradiol quando comparado com o grupo OOF. Na avaliação do peso corpóreo, a ooforectomia promoveu aumento no ganho ponderal, porém a administração crônica do EH na dose de 250 mg/Kg e de estroprogestativos reduziu o efeito da castração a partir da 6ª semana de tratamento. Em relação às dosagens bioquímicas foi observado que o EH nas doses de 150 mg/Kg e 250 mg/Kg reduziu as concentrações de triglicérides em 42,4% e 45,3% respectivamente quando comparados ao grupo OOF. Estes resultados sugerem que o tratamento crônico oral com EH de *Morus nigra* em ratas ooforectomizadas reduz a atrofia genital ocasionada pela falência ovariana, além de melhorar os níveis séricos de triglicerídeos. Apesar do tratamento crônico com o EH de *Morus nigra* nas doses avaliadas não ter apresentado toxicidade, são necessários estudos complementarais para melhor avaliar a toxicidade do extrato, assim como para elucidar os mecanismos de ação do EH para os efeitos observados neste estudo.

Palavras-chave: *Morus nigra* L., terapia hormonal, ooforectomia.

ABSTRACT

Hormone replacement therapy is generally used to relieve symptoms from menopause. However, the long exposure to estrogen and progesterone may increase the risk of breast cancer and endometrial. The search for alternatives from plants for the hormone replacement therapy has increased today, but studies about its side effects are rare. *Morus nigra* L. (Mulberry) is a plant species widely used in popular practice to relieve symptoms of menopause, especially hot flushes. This study aims to evaluate the estrogenic activity of the hydroalcoholic extract (EH of the leaves of *Morus nigra* in ovariectomized female rats. The leaves were dried, ground and macerated in 70% ethanol in the ratio 1:3 (w / v) to obtain the EH (13,7%). We used adult rats (70 days) of the species *Rattus norvegicus*, divided into five groups (n = 6-9). SHAM-Operated (SHAM), administered with saline (0.1 mL/100 g), ovariectomized (OVX), administered with saline (0.1 mL/100 g), ovariectomized treated with EH 150 mg / kg (EH150) or EH 250 mg / kg (EH250) and oophorectomized estroprogestativo (EP), estroprogestativo administered with 0,05 mg/Kg. Except for group SHAM, all groups were ovariectomized. After 21 days of ovariectomy, received a daily basis, their solutions orally for 18 weeks. During this period, we assessed parameters such as the estrous cycle, food intake and body weight. At the end of treatment, animals were anesthetized and sacrificed for blood collection and subsequent biochemical, hormonal, weight and histology of the uterus. In the analysis of the estrous cycle in the OVX group remained more common in the diestrus phase (75,4%) and EH150 and EH250 groups showed an increase in the estrus phase in 14,5% and 22,3% respectively, compared with OVX group. In the EP group was a higher frequency of the estrus phase (96,9%). Ovariectomy reduced uterine weight of rats. The EH doses 150 mg/Kg and 250 mg/Kg caused an increase of 200% and 233,3%, respectively, when compared with OVX. The EP has promoted the increase in uterine weight at 458,3%, when compared with OVX. In histological analysis, the OVX group animals showed a higher frequency in hypotrophic epithelium, with some characteristics of a typical atrophic epithelium. 67% of the rats of groups 78% of the EH150 and EH250 group showed proliferative epithelium. Even in groups EH 150, EH250, 22% and 11%, respectively, present glandular hyperplasia without atypia. In the EP group were shown a wider range of changes in endometrial cells, with 83% of rats with glandular epithelium characteristic of cystic simple hyperplasia without atypia. The evaluation of serum estradiol shows that the OVX group showed 87% decrease in serum levels of estradiol when compared to SHAM. The EH the doses of 150 mg/Kg and 250 mg/Kg increased by 40,8% and 108,7% serum estradiol when compared with OVX. The EP group, filed in 1369% increase in the levels of estradiol compared to the OVX group. In the evaluation of body weight, ovariectomy led to increase in weight gain, but chronic administration of EH at 250 mg/Kg and estroprogestativos reduced the effect of castration from the 6th week of treatment. Regarding the biochemical was observed that the EH the doses of 150 mg/Kg and 250 mg/Kg reduced the concentrations of triglycerides in 42,4% and 45,3% respectively when compared with OVX. These results suggest that chronic treatment with oral EH *Morus nigra* L. ovariectomized rats, reduces genital atrophy caused by ovarian failure, and improve levels of serum triglycerides. Despite the chronic treatment with EH *Morus nigra* in the doses evaluated had not submitted toxicity, studies are necessary to better assess the toxicity of the extract, as well as to elucidate the mechanisms of action of EH to the effects observed in this study.

Keywords: *Morus nigra* L., hormonal therapy, ovariectomy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	CAPÍTULO I	22
	Abstract	23
3.1	Introdução	24
3.2	Materiais e Métodos	26
	<i>3.2.1 Animais</i>	26
	<i>3.2.2 Material botânico</i>	26
	<i>3.2.3 Preparação do extrato hidroalcoólico (EH)</i>	27
	<i>3.2.4 Avaliação fitoquímica</i>	27
	<i>3.2.5 Sequência experimental</i>	27
	<i>3.2.5.1 Período de adaptação e critério de inclusão dos animais</i>	27
	<i>3.2.5.2 Ooforectomia</i>	27
	<i>3.2.5.3 Grupos experimentais</i>	28
	<i>3.2.5.4 Controle do peso corporal e consumo de alimento</i>	28
	<i>3.2.5.5 Determinação do ciclo estral</i>	29
	<i>3.2.5.6 Coleta do sangue e análises bioquímica, hematológica e hormonal</i>	29
	<i>3.2.5.7 Teste uterotrófico</i>	30
	<i>3.2.5.8 Avaliação histológica do epitélio endometrial</i>	30
	<i>3.2.6 Análise estatística</i>	30
3.3	Resultados	30

3.3.1 Avaliação fitoquímica.....	30
3.3.2 Avaliação do ciclo estral.....	31
3.3.3 Determinação do peso corpóreo e consumo de alimento.....	31
3.3.4 Teste uterotrófico.....	32
3.3.5 Avaliação do epitélio endometrial.....	33
3.3.6 Determinação dos parâmetros bioquímicos séricos.....	33
3.3.7 Determinação dos parâmetros hematológicos.....	34
3.3.8 Determinação dos níveis hormonais séricos.....	35
3.4 Discussão.....	35
Agradecimentos.....	39
Referências.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE.....	50
APÊNDICE A.....	51
ANEXO A.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do 17 β -estradiol.....	p. 18
Figura 2	Estrutura química de agliconas de isoflavonas presentes em extratos de soja....	19
Figura 3	Desenvolvimento ponderal de ratas dos grupos falso operado (FO), ooforectomizado (OOF), tratado com EH de <i>Morus nigra</i> na dose de 150 mg/Kg (EH150) e 250 mg/Kg (EH250), e estroprogestativo (EP), durante 18 semanas de tratamento.....	32
Figura 4	Valores do peso do útero (g)/ 100 g de peso corpóreo das ratas dos grupos falso operado (FO), ooforectomizado (OOF), tratado com EH de <i>Morus nigra</i> na dose de 150 mg/Kg (EH150) e 250 mg/Kg (EH250) e estroprogestativo (EP), durante 18 semanas de tratamento.....	33

LISTA DE TABELAS

		P.
Tabela 1	Frequências (%) das fases do ciclo estral das ratas dos grupos falso operado (FO), ooforectomizado (OOF), tratado com EH de <i>Morus nigra</i> na dose de 150 mg/Kg (EH150) e 250 mg/Kg (EH250) e estroprogestativo (EP), durante 18 semanas de tratamento.....	31
Tabela 2	Efeito de <i>Morus nigra</i> L. em parâmetros bioquímicos séricos de ratas dos grupos falso operado (FO), ooforectomizado (OOF), tratado com EH de <i>Morus nigra</i> na dose de 150 mg/Kg (EH150) e 250 mg/Kg (EH250) e estroprogestativo (EP), durante 18 semanas de tratamento.....	34
Tabela 3	Efeito de <i>Morus nigra</i> L. em parâmetros hematológicos de ratas dos grupos falso operado (FO), ooforectomizado (OOF), tratado com EH de <i>Morus nigra</i> na dose de 150 mg/Kg (EH150) e 250 mg/Kg (EH250) e estroprogestativo (EP), durante 18 semanas de tratamento.....	34
Tabela 4	Efeito de <i>Morus nigra</i> L. sobre a concentração sérica de estrógeno (E ₂) e progesterona (P ₄) de ratas dos grupos falso operado (FO), ooforectomizado (OOF), tratado com EH de <i>Morus nigra</i> na dose de 150 mg/Kg (EH150) e 250 mg/Kg (EH250) e estroprogestativo (EP), durante 18 semanas de tratamento.....	35

TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TH	Terapia Hormonal
EH	Extrato Hidroalcólico
OMS	Organização Mundial de Saúde
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
SERMs	Moduladores Seletivos para Receptores de Estrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EDSTAC	Comitê Consultivo de Testes e Triagem de Substâncias Desreguladoras Endócrinas

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o climatério é definido como a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo da vida da mulher, caracterizado pela redução na produção de hormônios esteróides ovarianos, principalmente estrogênio e progesterona, iniciado para a maioria das mulheres por volta dos 40 anos, terminando em meados da sexta década (WHO, 1996).

Atualmente, a expectativa de vida da mulher brasileira é de 76,7 anos (IBGE, 2009). Estima-se, assim, que as mulheres permaneçam aproximadamente um terço de suas vidas em estado de deficiência hormonal. Na menopausa, caracterizada pela última menstruação, com a falência da população folicular, o ovário deixa de produzir estrogênios, ocasionando um aumento dos níveis das gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), devido à falta do *feedback* negativo produzido pelo estrogênio (MESSINIS, 2006). Essas modificações, decorrentes do hipoestrogenismo, freqüentemente causam acentuadas alterações fisiológicas e somáticas, como a atrofia do útero, ressecamento vaginal, fadiga, ansiedade, irritabilidade, diminuição da libido, maior labilidade emocional, perda cognitiva, distúrbios do sono, diminuição do tônus muscular e da calcificação dos ossos, comprometimento do sistema nervoso central, que está relacionado à doença de Alzheimer, e os fogachos ou ondas de calor, caracterizados pelo enrubescimento da pele e sensações psíquicas de dispnéia (OLOFSSON e COLLINS, 2000; LAM et al., 2003).

Neste contexto, uma das opções de tratamento e prevenção dos sintomas e doenças após a menopausa é a terapia hormonal (TH), que pode melhorar as condições de saúde e qualidade de vida da mulher (GENAZZANI et al., 2002).

Atualmente, pode-se inferir que a TH utilizada de forma criteriosa e individualizada pode trazer benefícios no alívio de sintomas vasomotores, na proteção das mucosas, pele e anexos, no aparelho genital, urinário e nos ossos (GENAZZANI e GAMBACCIANI, 2001). Além disso, a TH tem mostrado excelentes resultados no controle de sinais e sintomas típicos do climatério como agitação, nervosismo, mudança de humor, ansiedade, irritabilidade, perda de memória, diminuição do desejo sexual, cansaço, dores articulares, principalmente em mulheres que apresentam sintomas vasomotores (VAN DER MOOREN e KENEMAS, 2004).

Contudo, a terapia hormonal não é isenta de complicações. Pesquisa realizada pelo Instituto de Saúde dos EUA, denominada *Women's Health Initiative* (WHI), demonstrou que a TH por cinco ou mais anos aumenta o risco relativo do câncer de mama, tanto nas usuárias de TH combinada (estrogênio associado à progesterona) ou TH isolada (somente estrogênio). Os dados obtidos demonstraram ainda um aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso (WHI, 2002). Porém, não está claro e é questionável a extensão desses resultados para outros esquemas de terapia hormonal, que diferem em dose, composição dos medicamentos e vias de administração (MODENA et al., 2005).

É importante levar em consideração que após a divulgação do WHI (2002) a conduta em relação à TH tem mudado em diferentes países. Segundo Kang et al. (2006) os médicos coreanos continuam prescrevendo a TH, no entanto reduziram as doses e o seu tempo de uso. Outro estudo realizado no Chile demonstrou que 65% dos médicos modificaram suas prescrições diminuindo as doses, utilizando estrogênio transdérmico, tibolona e outras alternativas, além da diminuição do tempo da TH (BLUMEL et al., 2004). Além desses estudos, outras pesquisas realizadas em países como Líbano (NASSAR et al., 2005), Bélgica (ENA e ROSEMBERG, 2003) e EUA (ROLNICK et al., 2007) também chegaram a conclusões semelhantes.

Além dos efeitos adversos associados ao uso da TH, há ainda, situações onde esta terapia apresenta contra-indicações, como nas mulheres tratadas de câncer de mama, com parentes de 1º grau (mãe, irmã ou filha) que tenham antecedentes de hiperplasias atípicas e neoplasias ductal ou lobular *in situ*. Também são relatadas como contra-indicações pacientes com casos de hipertensão grave, diabetes tipo I de difícil controle, cardiopatias descompensadas, doenças tromboembólicas, tumores hormônio-dependentes, câncer de mama ou de endométrio não tratados, hepatopatia aguda e sangramento genital de causa desconhecida (NAMS, 2004). Outro aspecto importante a ser considerado é que 35 a 40% das mulheres desistem da TH devido aos seus efeitos indesejáveis, tais como sangramento uterino, edema mamário, mastalgia e aumento do peso corpóreo (BAKER et al., 2000; GINSBURG e PREVELIC, 2000).

Por estas razões vem crescendo o interesse pela descoberta e desenvolvimento de compostos capazes de proporcionar os efeitos benéficos da terapia hormonal, sem

desencadear efeitos colaterais ou aumentar riscos de determinadas patologias (NELSON, 2008).

De consenso entre as discussões dos estudos realizados e a de especialistas em TH, tem-se que a terapia hormonal ideal seria aquela que incrementasse a adesão das pacientes com a ação estrogênica no coração, vasos, ossos e perfil lipídico, melhorando a função cognitiva e contribuindo também para prevenir a doença de Alzheimer, além de apresentar ação anti-estrogênia sobre as mamas e útero (RUSSELL et al., 2002).

Com estas características existem os moduladores seletivos para receptores de estrogênio (SERMs), representando agentes sintéticos não esteróides que se ligam aos receptores estrogênicos, resultando em efeitos agonista ou antagonista estrogênico de magnitudes variadas, em diferentes tecidos alvo (LOBO, 2007). Destes, os principais representantes e de aplicação clínica são raloxifeno e tamoxifeno. Apesar de algumas vantagens observadas com o uso do raloxifeno na pós-menopausa, principalmente a diminuição de fraturas vertebrais em mulheres com osteoporose (ETTINGER et al., 1999), diminuição do câncer invasivo de mama (CUMMINGS et al., 1999) e por não alterar o endométrio, o raloxifeno não apresentou melhora dos sintomas vasomotores nas mulheres climatéricas sintomáticas e, ao contrário, até pode aumentar a intensidade dos mesmos ou induzi-los nas pacientes assintomáticas. Devido a isto, e pelo seu preço elevado, apresentou pouca aceitação pelas pacientes (TREMOLLIERS e RIBOT, 2006).

Sendo assim, é cada vez maior a procura por terapias alternativas em substituição à TH. Estima-se que mais da metade das mulheres americanas procuram algum outro tipo de tratamento para seus problemas relacionados à menopausa, principalmente após a divulgação do WHI (2002), que fez com que o uso da TH diminuísse drasticamente e também com que apenas uma minoria reiniciasse seu uso (GOLD et al., 2007; NEWTON et al., 2008).

Um estudo recente com 230 participantes mostrou que 70% das mulheres que optaram por medicações fitoterápicas no climatério ao invés da terapia hormonal tradicional, o fizeram por medo do desenvolvimento do câncer de mama (LIMA et al., 2008).

A pesquisa intitulada *Women's Health Across the Nation* (SWAN) avaliou diferentes tratamentos alternativos à terapia hormonal tradicional em um grupo de 3.302 mulheres durante seis anos, onde 80% usavam alguma forma de terapia alternativa à TH. Neste estudo foram avaliados 21 tipos de terapias alternativas, dentre elas o uso da isoflavona de soja, que é

um dos fitoestrogênios mais estudados. Nessa pesquisa, autores observaram que a preferência pessoal deve ser levada em consideração pelos profissionais de saúde, para decidir sobre o tratamento, pois o tipo de terapia alternativa usada durante a menopausa é determinado pela experiência pessoal, estado de saúde na menopausa e acesso aos serviços de saúde pelas pacientes (GOLD et al., 2007; BAIR et al., 2008).

Os fitoestrógenos são compostos difenólicos, não esteroidais, derivados de plantas e que recebem essa denominação por se ligarem aos receptores de estrogênio e desenvolverem atividade estrogênica. A classe mais estudada é a das isoflavonas, encontradas em grandes concentrações na soja. Dentre estas, as principais são a genisteína, daidzeína e gliciteína (Figura 2) (SIRTORI et al., 2005). Uma característica estrutural de todos os fitoestrógenos é a presença de um anel fenólico que está relacionado com a ligação ao receptor estrogênico (SONG et al., 2002). O efeito biológico das isoflavonas varia de acordo com alguns fatores, como a concentração dos hormônios ovarianos, dose utilizada, duração do uso, afinidade a proteínas carregadoras, metabolismo individual, assim como a distribuição tecidual dos subtipos de receptores estrogênicos, alfa ou beta (MARITO et al., 2002). Os receptores estrogênicos do tipo alfa são encontrados principalmente na mama e no útero, e os receptores betas no osso e no sistema cardiovascular. O estradiol tem afinidade por ambos os receptores, enquanto que as isoflavonas são sete vezes mais seletivas para os receptores beta do que para os alfa (MARITO et al., 2002). Estudos mostraram que a isoflavona não aumenta a concentração do estradiol plasmático e que sua ação biológica é decorrente à interação com receptor beta-estrogênico (HAN et al., 2002; BALK et al., 2005).

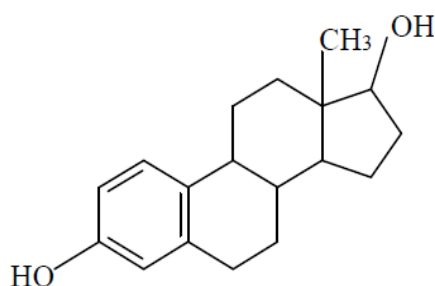


Figura 1. Estrutura química do 17 β -estradiol

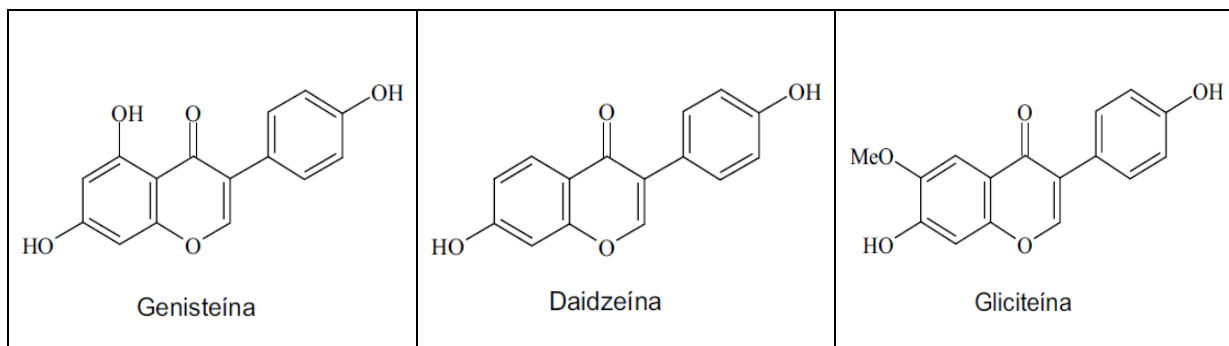


Figura 2. Estrutura química de agliconas de isoflavonas presentes em extratos de soja.

Além das isoflavonas isoladas da soja, outras plantas têm sido estudadas por apresentarem compostos químicos com efeitos semelhantes aos dos estrogênios. *Pueraria mirifica* é uma espécie vegetal que contém vários fitoestrógenos como a daidzina, daidzeína, genistina, genisteína e puerarina. Efeito estrogênico do extrato bruto das folhas de *Pueraria mirifica* foi observado em ratas ooforectomizadas pela constatação da diminuição de LH, FSH e através da cornificação do epitélio vaginal, após um tratamento de 14 dias. Neste estudo também foi avaliado o efeito do extrato em ratos castrados e também foi observada redução dos níveis de LH, mas sem alteração do FSH (MALAIVIJITNOND et al., 2004).

Wuttke et al. (2003) avaliaram o extrato padronizado de *Cimicifuga racemosa* (erva de São Cristóvão), denominado BNO 1055. Esse extrato mostrou muitos efeitos benéficos semelhantes ao 17 β -estradiol, em ratas ooforectomizadas, como a redução dos níveis de LH, prevenção da osteoporose, além de não apresentar efeito uterotrófico. Porém, a *Cimicifuga racemosa* tem sido associada com hepatopatias (WHITING et al., 2002).

A espécie *Morus nigra* L. conhecida pela população como amoreira, é empregada empiricamente no Brasil para aliviar os sintomas da menopausa. Apesar de não haverem estudos científicos relacionados a esta atividade farmacológica, o uso do chá das folhas de amoreira é relatado com frequência em consultórios e ambulatórios, por mulheres que residem principalmente no interior do Maranhão. *Morus nigra* é originária da Ásia, sendo frequente no Brasil em praticamente todas as regiões, onde cresce em qualquer tipo de solo e de clima. Esta espécie pertence à família Moraceae, comum nas regiões tropicais e subtropicais dos cinco continentes, e que se subdivide em cerca de sessenta gêneros, os quais abrangem em torno de mil e quatrocentas espécies (NOMURA e HANO, 1994).

Morus nigra L., é conhecida principalmente pelos valores nutricionais de seus frutos, as amoras, mas também por conter vários compostos com ação terapêutica, não apenas em seus frutos, como em outras partes da planta. O suco da fruta é utilizado no controle do *diabetes mellitus* do tipo II (MINCU, IONESCU-TIGOVISTE et al., 1989) e inflamações da garganta (QUER, 1995).

Desta espécie já foram identificados, isolados e estudados vários constituintes químicos. Compostos fenólicos presentes em várias espécies e no fruto de *Morus nigra* apresentam amplo espectro de atividade bioquímica tais como propriedades antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica, bem como a capacidade moduladora da expressão gênica (NAKAMURA et al., 2003), dentre eles podemos citar o ácido elágico, que além dessas funções tem ação antiinflamatória e atua como potente inibidor da indução química de vários tipos de câncer (ANTUNES et al., 2000). Estudos têm demonstrado ainda que a amora tem ação protetora contra danos oxidativos para biomoléculas e biomembranas (NADERI, ASGARY et al., 2004).

A atividade antinociceptiva ou analgésica foi atribuída à prenilflavonoíde morusina, substância encontrada na casca do caule de *Morus nigra* (de SOUZA, BITTAR et al., 2000).

O extrato alcoólico de folhas de *Morus nigra* reduziu a glicose sérica em ratos nos quais o diabetes foi induzido experimentalmente, mas não teve ação em ratos normoglicêmicos, não alterando os níveis de insulina nos animais estudados (ORYAN, EIDI et al., 2003).

Considerando o grande potencial farmacológico que a espécie *Morus nigra* apresenta e ainda, os relatos populares sobre o seu uso como alternativa à terapia hormonal tradicional é que este estudo avaliou a atividade do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* em ratas com hipoestrogenismo induzido.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o efeito do uso crônico do extrato das folhas de *Morus nigra* L. (amora) como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito de *Morus nigra* no trofismo do epitélio vaginal de ratas ooforectomizadas;
- Determinar o efeito de *Morus nigra* no desenvolvimento ponderal de ratas ooforectomizadas;
- Analisar o efeito de *Morus nigra* no perfil bioquímico e hormonal do sangue de ratas ooforectomizadas;
- Avaliar o efeito uterotrófico de ratas ooforectomizadas e tratadas cronicamente com *Morus nigra*.

3. CAPÍTULO 1

Artigo formatado conforme instruções da Revista Maturitas - The Official Journal of the European Menopause and Andropause Society. Fator de impacto: 2.032.

EFEITO DE *Morus nigra* L. (amora) COMO TERAPIA HORMONAL EM RATAS OOFORECTOMIZADAS

Ahirlan Silva de Castro^{a*}, Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Ciências Fisiológicas^a. Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, 65.085-580, Maranhão - Brazil.

**Corresponding author: Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Ciências Fisiológicas, Av. dos Portugueses, S/N - Campus Universitário do Bacanga, 65.085-580, São Luís – MA – Brazil. Tel.: (98) 3301- 8533; Fax: (98) 3301-8004
E-mail address: ahirlancastro@yahoo.com.br (Ahirlan Silva de Castro).*

ABSTRACT

Objective: To evaluate the estrogenic activity of the hydroalcoholic extract (HE) from leaves of *Morus nigra* in ovariectomized rats.

Methods: we used adult rats of the species *Rattus norvegicus*, divided into five groups, n = 6-9: SHAM-operated (SHAM), administered with saline (0.1 mL/100 g), ovariectomized (OVX), administered with saline (0,1ml/100g) ovariectomized estrogen-progestogen (EP), administered with estrogen-progestogen 50µg/Kg, and ovariectomized treated with EH at doses 150 mg/Kg (EH150) or 250 mg/Kg (EH250).

Except for group SHAM, all groups were ovariectomized. After 21 days of ovariectomy, received a daily basis, their solutions orally, for 18 weeks. During this period were rated the frequency of the estrous cycle, food intake and body weight. At the end of treatment were evaluated for biochemical, hormonal and weight and histology of the uterus.

Results: Analysis of the estrous cycle groups EH150 and EH250 showed an increase in the estrus phase in 14,5% and 22,3% respectively when compared with the OOF group. Ovariectomy reduced uterine weight of rats. The EH doses 150 mg/Kg and 250 mg/Kg caused an increase of 200% and 233,3% respectively, when compared with OVX. While the EP group promoted the increase in uterine weight at 458,3%. In histological analysis, the OVX group animals showed a hypotrophic and atrophic epithelium. 67% of the rats of groups 78% of the EH150 and EH250 group showed proliferative epithelium. The evaluation of serum estradiol shows that the OVX group showed 87% decrease in serum levels of estradiol when compared to SHAM. The EP group showed 1369% increase in the levels of estradiol compared to the OVX group. The EH the doses of 150 mg/Kg and 250 mg/Kg increased by 40,8% and 108,7% serum levels of estradiol when compared with OVX. In the evaluation of body weight, ovariectomy led to increase in weight gain, but chronic administration of EH at 250 mg/Kg and estroprogestativos reduced the effect of castration from the 6th week of treatment. Regarding the biochemical was observed that the EH the doses of 150 mg/Kg and 250 mg/Kg reduced the concentrations of triglycerides in 42,4% and 45,3% respectively when compared with OVX.

Conclusions: These results suggest that chronic oral treatment with *Morus nigra* EH ovariectomized rats reduces genital atrophy caused by ovarian failure, and improve levels of serum triglycerides.

Keywords: *Morus nigra* L., estrogenic activity, ovariectomy.

3.1 INTRODUÇÃO

O climatério, período de transição entre a fase reprodutiva e não-reprodutiva da mulher, apresenta-se em expansão devido ao aumento progressivo da vida média da população mundial. Atualmente, em países desenvolvidos, 95% das mulheres vivenciam a menopausa, e 50% atingem os 75 anos. Em nações subdesenvolvidas e em desenvolvimento, 86% das mulheres nascidas na década de 70 ultrapassarão os 75 anos [1].

A menopausa, definida como a data da última menstruação, está associada a um hipostrogenismo crescente, onde a deficiência na produção de estrogênio acarreta em uma série de mudanças clínicas como a atrofia genital, sintomas vasomotores, insônia, aumento da perda de massa óssea, dentre outros. Além disso, está associada com outras patologias como a doença de Alzheimer, osteoporose e alterações psicológicas como a labilidade emocional, irritabilidade, mudança de humor, insônia e depressão [2, 3].

Uma das opções de tratamento e/ou prevenção dos sintomas e doenças relacionados à menopausa é a terapia hormonal (TH), que pode melhorar as condições de saúde e de qualidade de vida da mulher [4]. A importância da TH na melhora dos sintomas climatéricos e no tratamento e prevenção da osteoporose e de alterações cognitivas está clara, contudo permanece incerto o impacto dessa terapia na qualidade de vida de mulheres na pós-menopausa [5].

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstram que o aparecimento de doenças crônicas degenerativas e a piora na qualidade de vida das mulheres, após a menopausa, têm íntima relação com o declínio na produção de estrogênio, conseqüentemente a TH isolada, somente com estrógeno, ou combinada, com estrogênio associado à progesterona, vem sendo empregada nas últimas décadas, para minimizar os efeitos adversos desta carência [6,7,8]. Contudo, a TH não é isenta de complicações. Em estudos de meta-análise foi demonstrado que a TH, empregada por cinco anos ou mais, aumentou o risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama, tanto nas usuárias de TH combinada, quanto de TH isolada [9]. Porém, não está claro e é questionável a extensão desses resultados para outros esquemas de terapia hormonal, que diferem em dose, composição dos medicamentos e vias de administração [10]. Outro aspecto importante a ser considerado é que 35 a 40% das mulheres desistem da TH devido aos seus efeitos indesejáveis, tais como sangramento uterino, edema mamário, mastalgia e aumento do peso corpóreo [11,12].

Por estas razões vem crescendo o interesse pela descoberta e desenvolvimento de compostos capazes de proporcionar os efeitos benéficos da terapia hormonal sem desencadear efeitos colaterais ou aumentar riscos de surgimento ou agravamento de determinadas patologias. Portanto, a terapia hormonal ideal seria aquela que incrementasse a adesão das usuárias apresentando efeitos indesejáveis leves, com ação estrogênica no coração, vasos, ossos e perfil lipídico, melhorando a função cognitiva e contribuindo também para prevenir a doença de Alzheimer, além de apresentar ação antiestrogênica sobre as mamas e útero. Com estas características são encontrados os fármacos moduladores seletivos para receptores de estrogênio (SERMs), como o raloxifeno e o tamoxifeno [13]. Porém, apesar de algumas vantagens observadas com o uso do raloxifeno, como a diminuição de fraturas vertebrais em mulheres com osteoporose [14], diminuição da incidência do câncer invasivo de mama [15] e por não estimular o endométrio, o principal inconveniente é o fato de não tratar os sintomas vasomotores nas mulheres climatéricas sintomáticas, podendo até aumentar a intensidade dos mesmos ou provocá-los nas assintomáticas. Por esse motivo e pelo seu elevado preço, acabou tendo pouca aceitação [16].

Em substituição à terapia com estrogênios conjugados, nos últimos 10 anos muitos clínicos têm indicado os fitoestrogênios ou fitohormônios como alternativa natural para mulheres com contra-indicação, medo ou receio de usar a TH [1].

Os fitoestrógenos são compostos difenólicos, não esteroidais, derivados de plantas e que recebem essa denominação por se ligarem aos receptores de estrógeno e desenvolverem atividade estrogênica. As classes mais estudadas são as isoflavonas encontradas em grandes concentrações na soja. Dentre estas, as principais são a genisteína, daidzeína e gliciteína [17]. 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 [18]. Alguns estudos mostraram que a isoflavona promove seu efeito pela ligação ao receptor beta estrogênico [19,20]. Os receptores alfa estrogênicos são encontrados principalmente na mama e no útero, e os receptores betas no osso e no sistema cardiovascular. O estradiol tem afinidade por ambos os receptores, enquanto que as isoflavonas são sete vezes mais seletivas para os receptores beta do que para os alfa [21].

O chá das folhas de *Morus nigra* é largamente empregado no Brasil a fim de aliviar principalmente os fogachos e as alterações que ocorrem no período pré-menstrual. *Morus nigra*, conhecida pela população como amoreira, é originária da Ásia, e amplamente

abrangente no Brasil, sendo encontrada praticamente em todas as regiões do país. Pertence à família Moraceae que subdivide-se em cerca de sessenta gêneros, os quais apresentam em torno de mil e quatrocentas espécies [22]. *Morus nigra* é conhecida pelos valores nutricionais de seus frutos, como também por conter vários compostos com ação terapêutica em várias partes da planta. Atividade antinociceptiva foi atribuída à presença da substância identificada como prenilflavonóide morusina, encontrada na casca do caule de *Morus nigra* [23]. Compostos fenólicos presentes em diversas espécies vegetais, incluindo os frutos de *Morus nigra* apresentam amplo espectro de atividade bioquímica tais como propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas, bem como a capacidade moduladora da expressão gênica [24,25]. O extrato alcoólico de folhas de *Morus nigra* reduziu a glicose sérica em ratos nos quais o diabetes foi induzido experimentalmente [26].

Portanto, considerando o grande potencial farmacológico que a espécie *Morus nigra* apresenta e ainda, os relatos populares sobre o seu uso como alternativa à terapia hormonal tradicional é que este estudo avaliou a atividade do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* em ratas com hipoestrogenismo induzido.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) variedade albinus, com aproximadamente 70 dias de idade e pesos variando entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos em ambiente com luz (12h claro/12h escuro) e temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), com acesso *ad libitum* à ração e água. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê em Ética e Pesquisa da Universidade Estadual do Maranhão sob parecer 026/2008.

3.2.2 Material botânico

Folhas da espécie *Morus nigra* foram coletadas no mês de maio de 2008, no horto Berta Lange de Morretes, do Campus do Bacanga, da Universidade Federal do Maranhão, onde encontra-se catalogada sob o número 1365.

3.2.3 Preparação do extrato hidroalcoólico

Após a coleta, as folhas foram secas em temperatura ambiente, pulverizadas em moinho para obtenção do pó. O pó foi submetido ao processo de extração, por maceração, durante 48 horas, com etanol 70%, na proporção de 1:3 p/v. Este procedimento foi repetido três vezes e o filtrado das três extrações foi reunido, concentrado em rotaevaporador e denominado extrato hidroalcoólico (EH). Foi determinado o peso seco e rendimento da extração.

3.2.4 Avaliação fitoquímica

A análise fitoquímica do EH de *Morus nigra* foi realizada de acordo com Matos modificado [27] a fim de verificar a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, chalconas, auronas, flavonas, flavonóis, xantonas, flavonononas, leucoantocianidinas, catequinas, esteróides, triterpenos, saponinas, alcalóides e glicosídeos cianogênicos. A intensidade destes compostos foi notificada como (+++) para fortemente positivo, (++) para moderadamente positivo, (+) para fracamente positivo, (-) para não detectados.

3.2.5 Seqüência experimental

3.2.5.1 Período de adaptação e critério de inclusão dos animais

A primeira etapa do estudo, com duração de duas semanas, deteve-se à adaptação e seleção dos animais oriundos do Biotério Central da UFMA. Nesta fase, foi realizada a determinação do ciclo estral das ratas, pela análise da citologia vaginal a fresco, sendo selecionadas as ratas que apresentaram as quatro fases do ciclo estral de forma regular [28].

3.2.5.2 Ooforectomia

Para realizar este procedimento, as ratas foram anestesiadas por via intraperitoneal com associação de Cetamina (40 mg/kg) e Xilazina (7,5 mg/kg). Foi realizada a tricotomia e a

antisepsia da região supra-púbica dos animais, para posterior laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana. As trompas foram identificadas e ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente, a incisão foi suturada. No grupo de animais controles foi realizado a laparotomia e em seguida o local foi suturado, sem haver a retirada dos ovários [29].

3.2.5.3 Grupos experimentais

Após 21 dias da ooforectomia e comprovação do anestro, pela análise do esfregaço vaginal, as ratas foram distribuídas em 5 grupos (n= 6-9): FO (falso operado) constituído por ratas controles submetidas a uma falsa cirurgia que receberam diariamente, por via oral, solução de NaCl 0,9% (0,1mL/100g) por um período de 18 semanas. Grupo OOF (ooforectomizado) no qual os ovários das ratas foram retirados cirurgicamente conforme técnica descrita anteriormente e os animais foram administrados diariamente, por via oral, com solução NaCl 0,9%, por um período de 18 semanas. Grupo EP, constituído por ratas ooforectomizadas que foram administradas diariamente, por via oral, por um período de 18 semanas, com solução de estroprogestativo de 0,5 mg/Kg de estradiol e 0,25 mg/Kg de acetato de noristerona. Grupo EH150 constituído por ratas ooforectomizadas que foram tratadas com o EH de *Morus nigra* na dose de 150 mg/Kg diariamente, por um período de 18 semanas. Grupo EH250, onde as ratas ooforectomizadas foram tratadas com EH de *Morus nigra* na dose de 250 mg/Kg, por um período de 18 semanas.

3.2.5.4 Controle do peso corporal e consumo de alimento

Durante todo o período de tratamento foi realizado o controle de peso corporal das ratas. O peso corporal foi determinado pela pesagem dos animais em balança digital, três vezes por semana. A ingestão alimentar dos animais foi determinada em dias alternados na semana, pelo cálculo da diferença entre a quantidade de ração ofertada por gaiola e a sobra em 24 horas.

3.2.5.5 Determinação do ciclo estral

A determinação das fases do ciclo estral foi realizada sempre pela manhã, entre 8 e 10 horas, pela análise da citologia vaginal a fresco. A coleta da secreção vaginal foi realizada com inserção de pipeta de plástico com ponteira contendo 20µL de solução de NaCl 0,9% estéril, na vagina do animal. O material aspirado foi colocado sobre lâmina de vidro e visualizado a fresco, em microscópio óptico, em aumento de 40 vezes. A fase do ciclo estral de cada animal foi classificada de acordo com a proporção de tipos celulares, como: *Diestro*, caracterizada pela presença de abundantes leucócitos e escassas células epiteliais basais; *Proestro*, com escassos leucócitos, abundantes células epiteliais basais e escassas células epiteliais cornificadas; *Estro*, com escassos leucócitos e células epiteliais basais e, abundantes células epiteliais cornificadas; *Metaestro*: com diminuição de células epiteliais cornificadas e aumentando o número de leucócitos e de células epiteliais basais [29].

3.2.5.6 Coleta do sangue e análises bioquímica, hematológica e hormonal

Após o período de tratamento, as ratas de todos os grupos experimentais foram anestesiadas. Posteriormente, foi feita uma incisão abdominal para identificação e punção da artéria aorta abdominal, de onde foi coletado sangue, com auxílio de scalpe, em tubos de ensaio. Após este procedimento, foi realizada, imediatamente, a separação do soro por centrifugação (3000 rpm/10 min), favorecendo-se a coagulação do sangue por incubação em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos. Em tubo de ensaio contendo anticoagulante EDTA foi colocada uma alíquota de sangue para realização do hemograma completo. As dosagens quantitativas de amilase, albumina, colesterol total, colesterol-HDL, creatinina, fosfatase alcalina, glicose, transaminase oxalacética, transaminase pirúvica, triglicérides e uréia foram realizadas utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático modelo BIO-2000 IL de acordo com a orientação do fabricante dos reagentes (LABTEST®).

A determinação quantitativa sérica dos hormônios estradiol e progesterona foi feita pelo método de imunensaio enzimático (ELISA), utilizando-se kits da Diagnostic Biochem Canada Inc. (Montreal, Canada)®.

3.2.5.7 Teste uterotrófico

Após a exsanguinação das ratas, os cornos uterinos foram isolados e retirados em toda sua extensão para determinação do peso úmido em balança analítica. Os valores dos pesos dos úteros foram expressos como peso relativo à massa corporal de cada animal (g/100g) [30].

3.2.5.8 Avaliação histológica do epitélio endometrial

O útero foi fixado separadamente em solução de formol líquido tamponado a 10%, onde 24h após a cirurgia foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 59°C para a produção de um bloco. Os blocos foram submetidos a cortes seriados de 4 a 6 micrômetros de espessura, em micrótomo do tipo Minot. Estes foram desparafinados e corados pela técnica de hematoxilina e eosina [31]. Seguida da avaliação da atividade proliferativa endometrial por um único observador.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (e.p.m.). As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste Newman – Keuls. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Avaliação fitoquímica

Na avaliação fitoquímica do EH de *Morus nigra* foi possível detectar a presença de fenóis e saponinas com intensidade fracamente positiva e de flavonas, flavonóis, xantonas e esteróides com intensidade fortemente positiva.

3.3.2 Determinação do ciclo estral

A Tabela 1 mostra as frequências percentuais das fases do ciclo estral dos grupos avaliados durante 18 semanas de tratamento.

No início do tratamento as ratas ooforectomizadas encontraram-se nas fases metaestro e diestro. A maior frequência foi da fase diestro, com 75,4%. Ao longo do experimento esse padrão se manteve apenas no Grupo OOF. No grupo falso-operado (FO), ocorreu a presença das quatro fases do ciclo estral de forma regular. As ratas ooforectomizadas e tratadas com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* nas doses de 150 mg/Kg e 250 mg/Kg apresentaram maior frequência da fase diestro que foi de 62% (EH150) e de 50,7% (EH250). Porém, quando se compara a frequência do ciclo das ratas tratadas com o EH e das ooforectomizadas tratadas apenas com veículo, observa-se que enquanto no grupo OOF a frequência da fase estro foi 0, nos grupos tratados com EH nas doses de 150 mg/kg e 250 mg/kg foi de 14,5% e 22,3%, respectivamente. O Grupo tratado com estroprogestativo (EP) apresentou padrão citológico compatível com a fase estro (96,9%), comprovado pela presença exclusiva de células cornificadas.

Tabela 1. Frequências (%) das fases do ciclo estral de ratas falso-operadas (FO), ooforectomizadas (OOF), ooforectomizadas e tratadas com EH 150 mg/Kg (EH150); ooforectomizadas e tratadas com EH 250 mg/Kg (EH250) ou ooforectomizadas e tratadas com estroprogestativo 0,05 mg/Kg de estradiol (EP), por via oral, durante 18 semanas de tratamento, n = 6 - 9.

Fases do ciclo estral	Frequência (%) das fases ciclo estral				
	FO	OOF	EH150	EH250	EP
PROESTRO	17,6	0	0,5	1,8	2,2
ESTRO	26,8	0	14,5	22,3	96,9
METAESTRO	12,1	24,6	23	25,1	0,8
DIESTRO	43,4	75,4	62	50,7	0

3.3.3 Determinação do peso corpóreo e consumo de alimento

Os resultados da evolução do peso corporal, em relação ao peso inicial, estão dispostos na Figura 3. Observou-se que os animais do grupo OOF apresentaram um aumento progressivo do peso corpóreo em relação ao grupo FO. O tratamento com o EH 250 mg/Kg e estroprogestativo preveniu o aumento do peso corporal ocasionado pela ooforectomia, a partir

da 6ª semana de tratamento, tornando-os semelhantes ao grupo FO. Este efeito permaneceu até o final do tratamento. Em relação ao consumo de ração não houve diferença significativa entre os grupos experimentais avaliados, durante 18 semanas de tratamento.

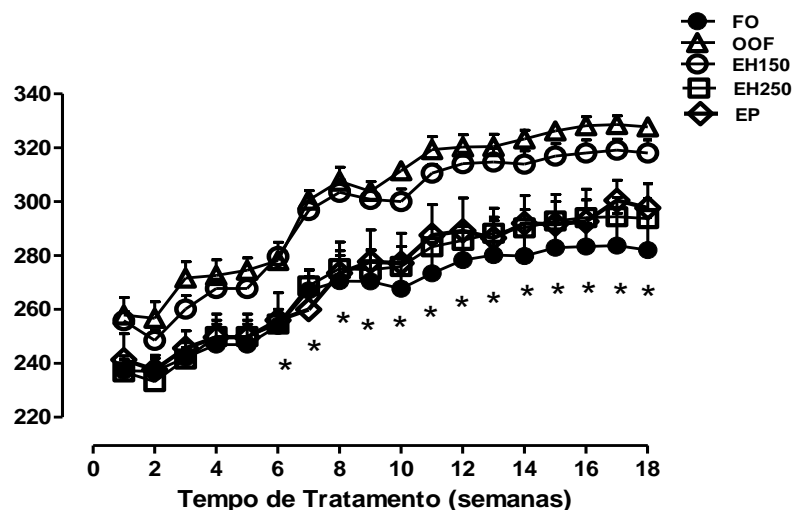


Figura 3. Evolução ponderal de ratas do grupo falso operado (FO); ooforectomizado (OOF); ooforectomizado e tratados com EH de *Morus nigra* na dose de 150 mg/Kg (EH150); ooforectomizado e tratado com EH de *Morus nigra* na dose de 250 mg/Kg (EH250) e ooforectomizado e tratado com estroprogestativo 0,05 mg/Kg de estradiol (EP); por via oral, durante 18 semanas de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm epm de cada grupo, n=6-9. * significa diferença em relação ao grupo OOF ($p < 0,05$).

3.3.4 Teste uterotrófico

Os valores das médias do peso dos úteros dos animais de cada grupo estão dispostos na Figura 3. No grupo FO, o peso uterino foi de $0,12 \pm 0,012$ g. Já no grupo OOF, o peso uterino foi de $0,02 \pm 0,0017$ g. Sendo assim, a ooforectomia promoveu uma redução de 80% no peso do útero nas ratas. O tratamento dos animais com o EH de *Morus nigra* nas doses de 150 mg/Kg e 250 mg/Kg estimulou o trofismo uterino das ratas ooforectomizadas em 200% e 233,3%, respectivamente, quando comparados ao grupo OOF. Nos úteros dos animais tratados com o estroprogestativo (EP) houve um aumento de 458,3% em relação ao útero dos animais do grupo ooforectomizado (OOF).

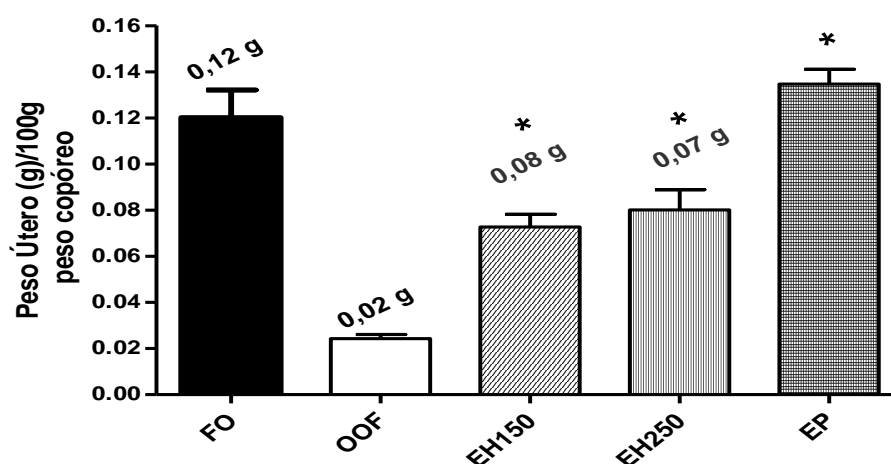


Figura 4. Valores do peso do útero (g)/ 100 g de peso corporal das ratas FO: ratas com ovários que receberam o veículo; OOF: ratas ooforectomizadas e tratadas com o veículo; EH150: ratas ooforectomizadas e tratadas com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* na dose de 150 mg/Kg; EH250: ratas ooforectomizadas e tratadas com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* na dose de 250 mg/Kg ou EP: ratas ooforectomizadas e tratadas com 0,05 mg/Kg de estradiol, por via oral, durante 18 semanas de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm epm de cada grupo, n = 6-9. * significa diferença em relação ao grupo OOF ($p < 0,05$).

3.3.5 Avaliação histológica do epitélio endometrial

Após 18 semanas de tratamento, foi realizada a análise histológica do tecido endometrial dos grupos experimentais. Nas ratas do grupo FO, o epitélio endometrial apresentou-se proliferativo, com estroma denso. Já os animais pertencentes ao grupo OOF apresentaram um epitélio hipotrófico em maior frequência, estando algumas com características de um epitélio tipicamente atrófico. 67% das ratas dos grupos EH150 e 78 % do grupo EH250 apresentaram epitélio proliferativo, com hiperplasia glandular sem atipia em 22% e 11%, respectivamente. No entanto, nos animais do grupo tratado com estroprogestativo (EP), foi evidenciada uma maior diversidade de alterações nas células endometriais, estando 83% das ratas com epitélio característico de hiperplasia glandular cística simples, sem atipia.

3.3.6 Determinação de parâmetros bioquímicos séricos

Na tabela 3 estão descritos a média e o erro padrão das médias dos analitos bioquímicos séricos determinados nos grupos experimentais. A terapia estroprogestativa e o EH 150 mg/Kg e 250 mg/Kg não alteraram os parâmetros bioquímicos quando comparados ao grupo OOF, exceto os triglicérides. O EH 150 mg/Kg reduziu em 42,4% e o EH 250 mg/Kg reduziu em 45,3% os níveis séricos de triglicérides, quando comparados ao grupo OOF.

Tabela 2. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* em parâmetros bioquímicos séricos de ratas falso-operadas (FO), ooforectomizadas (OOF), ooforectomizadas e tratadas com EH 150 mg/Kg (EH150); ooforectomizadas e tratadas com EH 250 mg/Kg (EH250) ou ooforectomizadas e tratadas com estroprogestativo 0,05 mg/Kg de estradiol (EP), por via oral, durante 18 semanas de tratamento.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPOS				
	FO	OOF	EH150	EH250	EP
GL mg/dL	109,5 ± 8,2	102,8 ± 8,8	102,1 ± 7,7	100,1 ± 8,4	98,9 ± 7,4
CT mg/dL	73,7 ± 9,5	80,3 ± 7,9	74,1 ± 6,4	77,3 ± 9,3	70,7 ± 10,2
HDL mg/dL	46,2 ± 2,5	44,6 ± 2,3	47,9 ± 5,5	50 ± 4,3	43,2 ± 6,8
TRI mg/dL	57,5 ± 6,6	63,3 ± 3,1	36,5 ± 4,6 *	34,6 ± 7,5 *	43,2 ± 6,8
Ur mg/dL	59,2 ± 2,9	62,8 ± 2,9	65,1 ± 4,2	72,2 ± 4,3	58,5 ± 2,7
CR mg/dL	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
AU mg/dL	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,3
ALB g/dL	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1
ALP U/L	67,2 ± 2,1	68,2 ± 1,4	65,2 ± 5,3	68 ± 9,1	63,5 ± 8,5
AST U/L	179,3 ± 6,1	173,5 ± 11,4	183,1 ± 11,0	179,7 ± 5,3	195,3 ± 9,2
ALT U/L	84,7 ± 9,4	84,2 ± 8,8	90 ± 10,6	86,8 ± 7,7	102 ± 8,9
Amilase U/dL	696,8 ± 6,1	679 ± 13,1	702,5 ± 14,5	656,9 ± 12,6	696 ± 16,1

* indica diferença em relação ao grupo ooforectomizado (OOF). Anova, Newman-Keuls ($p < 0,05$), $n = 6 - 9$.

3.3.7 Determinação dos parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros hematológicos estão descritos na tabela 4, constatando que não houve diferença estatística entre nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 3. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* em parâmetros hematológicos de ratas falso-operadas (FO), ooforectomizadas (OOF), ooforectomizadas e tratadas com EH 150 mg/Kg (EH150); ooforectomizadas e tratadas com EH 250 mg/Kg (EH250) ou ooforectomizadas e tratadas com estroprogestativo 0,05 mg/Kg de estradiol (EP), por via oral, durante 18 semanas de tratamento.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPOS				
	FO	OOF	EH150	EH250	EP
Eritrócitos ($\times 10^6$ cells/mm ³)	7,9 ± 1,3	7,5 ± 1,3	7,6 ± 1,1	7,6 ± 1,2	7,7 ± 1,3
Hb (g/dL)	15,9 ± 2,3	15,6 ± 1,7	15,1 ± 1,3	15,3 ± 1,4	14,2 ± 1,2
Ht (%)	47,7 ± 1,1	45,7 ± 2,2	44,2 ± 1,0	44,4 ± 1,5	42,9 ± 1,7
MCV (fl)	56,8 ± 1,6	56,1 ± 0,9	57,4 ± 1,4	56,1 ± 1,9	56,3 ± 1,6
MCH (pg)	19,5 ± 1,2	19,6 ± 2,3	19,7 ± 2,2	19,8 ± 2,1	18,7 ± 1,2
MCHC g/dL	34,3 ± 2,5	34,1 ± 1,5	34,6 ± 1,3	34,4 ± 1,3	33,5 ± 1,6
Leucócitos ($\times 10^3$ cells/mm ³)	9,2 ± 1,2	7,6 ± 1,1	6,4 ± 1,3	6,2 ± 1,2	9,1 ± 0,9
Plaquetas (K/uL)	755500 ± 25207	683833 ± 21434	633125 ± 25451	653889 ± 19801	760000 ± 16442

* indica diferença em relação ao grupo ooforectomizado (OOF). Anova, Newman-Keuls ($p < 0,05$), $n = 6 - 9$.

3.3.8 Determinação dos hormônios gonadais séricos

A tabela 5 apresenta a concentração sérica média de estradiol e progesterona de ratas falso-operadas ou ooforectomizadas sob diferentes tratamentos.

O grupo OOF ($13,7 \pm 0,9$ pg/mL) apresentou diminuição de 87% nos níveis séricos de estradiol quando comparado ao grupo FO ($108,5 \pm 11,7$ pg/mL). O EH nas doses de 150 mg/Kg e 250 mg/Kg aumentaram em 40,8 % e 108,7 % os níveis séricos de estradiol quando comparados ao grupo OOF. O grupo tratado com estroprogestativo, EP, apresentou 1369% de aumento dos níveis de estradiol quando comparado com o grupo OOF.

A concentração sérica média de progesterona nas fêmeas OOF de foi $2,5 \pm 0,9$ ng/mL, enquanto no Grupo FO foi $4,63 \pm 0,79$ ng/mL. Portanto a ooforectomia diminuiu em 45,7% os valores de progesterona. O nível de progesterona nas fêmeas tanto dos grupo EP, EH150 e EH250 não se apresentaram diferentes do grupo OOF.

Tabela 4. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* sobre a concentração sérica de estrógeno e progesterona de ratas falso-operadas (FO), ooforectomizadas (OOF), ooforectomizadas e tratadas com EH 150 mg/Kg (EH150); ooforectomizadas e tratadas com EH 250 mg/Kg (EH250) ou ooforectomizadas e tratadas com estroprogestativo 0,05 mg/Kg de estradiol (EP), por via oral, durante 18 semanas de tratamento.

Hormônios Gonadais Séricos	Grupos tratados				
	FO	OOF	EP	EH150	EH250
Estradiol (pg/mL)	$108,5 \pm 11,7$	$13,7 \pm 0,9$	$201,3 \pm 19,2^*$	$19,3 \pm 1,0$	$28,6 \pm 4,3^*$
Progesterona (ng/mL)	$4,6 \pm 0,8$	$2,50 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,4$

* indica diferença em relação ao grupo ooforectomizado (OOF). Anova, Newman-Keuls ($p < 0,05$), $n = 6 - 9$.

3.4 DISCUSSÃO

Apesar dos relatos populares indicarem que o chá das folhas de *Morus nigra* melhora sintomas decorrentes à menopausa, principalmente os fogachos, não existe nenhum estudo farmacológico para comprovar estes efeitos relacionados à planta. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de *Morus nigra* em ratas com hipoestrogenismo induzido pela retirada cirúrgica dos ovários.

A ooforectomia leva à alteração do ciclo estral dos animais devido à diminuição na produção dos estrógenos endógenos. Os estrogênios agem sobre o trofismo da mucosa uretral e vaginal, além do tecido conjuntivo dos tratos urinário e genital, logo a sua ausência

compromete a maturação destas células, chegando, inclusive, a culminar em esfregaços colpocitológicos hipotróficos, ou até atróficos [32]. Como consequência, a secreção vaginal torna-se escassa, havendo maior frequência da fase diestro nos animais ooforectomizados [28]. Este efeito foi observado em nosso estudo, nos animais do grupo OOF, os quais 75,4% estiveram na fase diestro, caracterizada pela presença de abundantes leucócitos, escassas células epiteliais basais e cornificadas, provavelmente decorrentes da baixa concentração de estradiol, que nestas ratas foi de 87% menor que no grupo falso-operado (FO), onde os ovários foram preservados.

Por outro lado, o tratamento prolongado de ratas ooforectomizadas com extrato de *Morus nigra* induziu à proliferação do epitélio vaginal, uma vez que houve aumento da frequência na fase estro em 14,5% com a dose de 150 mg/Kg e 22,3% com a dose de 250 mg/Kg, seguida de aumento da fase metaestro e redução da fase diestro, em relação ao grupo apenas ooforectomizado (OOF). A maturação das células epiteliais da vagina decorre do aumento de estrogênio no organismo e caracteriza a fase estro do ciclo [28]. De fato, foi observado neste estudo que a concentração de estradiol aumentou em 41% e 109%, respectivamente, nos grupos EH150 e EH250 em relação ao OOF, sendo estatisticamente significativa na maior dose. Apesar de não ter sido um aumento muito intenso, muito provavelmente foi o responsável pelos efeitos proliferativos no esfregaço vaginal.

Efeitos semelhantes a estes foram obtidos com o extrato de outras plantas. O extrato de *Angelica sinensis*, *Pueraria mirifica* e *Cemicifuga racemora*, quando testados em ratas ooforectomizadas, apresentaram potente ação estrogênica por promoverem significativa cornificação do epitélio vaginal [33,34,35]. Ensaio biológico realizado com *Chichorium intybus* e *Stryphnodendron barbatiman martius* mostraram ação estrogênica no epitélio vaginal, sem alteração significativa no peso uterino, demonstrando ausência de ação estrogênica no útero [36].

Nos animais do grupo EP, tratados com estroprogestativo, houve uma frequência de 96% da fase estro, evidenciado pela proliferação do epitélio vaginal das ratas, provavelmente relacionado ao aumento de 1369% na concentração endógena de estrogênio neste grupo, quando comparado ao grupo OOF.

Além de induzir a maturação do epitélio vaginal, o EH de *Morus nigra* aumentou o peso do útero das ratas ooforectomizadas. O teste uterotrófico é utilizado na triagem de substâncias com atividade estrogênica, recomendado pelo EDSTAC da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. O aumento na massa do útero é considerado a melhor variável

indicativa de estrogenicidade *in vivo* quando medido em ratas ooforectomizadas ou imaturas após três dias de tratamento [37].

Neste teste, observou-se que a administração de diferentes doses do EH de *Morus nigra* foi capaz de estimular o desenvolvimento uterino, inibindo os efeitos do hipoestrogenismo induzidos pela ooforectomia. O peso úmido do útero das ratas apresentou-se aumentado em 200% e 233%, nos grupos EH150 e EH250, respectivamente, quando comparados com o grupo OOF, apesar de que este estímulo foi bem menor quando comparado ao grupo EP, que foi de 458,3%. Esse aumento foi comprovado após a análise histológica do epitélio endometrial, uma vez que este apresentou-se proliferativo nas ratas tratadas com o EH em ambas as doses, diferentemente dos animais do grupo OOF, que apresentaram endométrio com características hipotróficas e atróficas.

Os resultados observados para *Morus nigra* tanto no útero quanto no epitélio vaginal podem estar relacionados à presença de esteróides e flavonóides detectados na análise química, que possivelmente apresentam atividade estrogênica, por interagir com os receptores de estrogênio presentes no útero ou por estimular a produção de estrógenos endógenos adrenais. Também foi verificado que o tratamento crônico com estroprogestativos promoveu um maior aumento da massa uterina, em relação a todos os outros grupos, efeito trófico esperado e característico do estrógeno no trato reprodutivo feminino, comprovado pela análise histológica endometrial, que apresentou alterações significativas no epitélio das ratas, como hiperplasia glandular cística não atípica. Outros estudos também relacionam hiperplasia, hipertrofia e metaplasia escamosa uterina com o uso de estroprogestativos em ratas. Porém, as características e intensidade desta estimulação estão muito relacionadas com a dose e o tempo de uso de estroprogestativos [38,39].

Estudos experimentais em ratas mostraram que doses de genisteína, isoflavona isolada de soja, entre 50 e 100 mg/Kg ao dia, são efetivas para estimular o crescimento dos cornos uterinos e o trofismo da citologia vaginal [40]. Outro estudo mostrou também que, com a dose de 300 mg/Kg por dia de genisteína, houve alteração significativa no peso uterino e modificações morfológicas e morfométricas no miométrio de ratas [41]. Por estes efeitos os autores acreditam que a ação estimulatória das isoflavonas deve-se à sua ação direta no receptor de estrogênio, principalmente pela ativação do receptor beta estrogênico [42].

Outro parâmetro de avaliação que é alterado em decorrência à redução dos estrogênios na pós-menopausa é o ganho ponderal. Alguns autores descreveram aumento do peso corporal em animais ooforectomizados [43,44,45]. Segundo os estudos, o ganho ponderal pós-

ooforectomia deve estar relacionado com a redução do consumo energético consequente à supressão dos hormônios ovarianos, tendo em vista que o estrogênio aumenta o metabolismo energético e, como consequência, diminui o peso corporal. Portanto, se houver supressão estrogênica, o consumo de energia será menor e os animais terão aumento de peso corporal [43,44,45]. Este efeito foi observado nas ratas ooforectomizadas, que após a castração cirúrgica apresentaram um aumento significativo no peso corpóreo, que foi mantido ou intensificado até o final do tratamento no grupo OOF. Porém, nas ratas ooforectomizadas que foram tratadas, foi observado que a maior dose do extrato (250 mg/Kg) inibiu o ganho ponderal ocasionado pela ooforectomia, a partir da 6ª semana de tratamento, mantendo-se constante até a 18ª semana. No grupo EP o ganho de peso causado pela ooforectomia também foi revertido pela reposição do estradiol, que como citado anteriormente, apresenta efeito no metabolismo energético, diminuindo o ganho de massa corporal [45].

Neste trabalho, os resultados de variação de peso corpóreo induzido pelo EH parecem não se relacionar com alterações na ingestão alimentar, pois em nenhum dos tratamentos houve alteração do consumo de ração que pudesse acompanhar as variações ponderais.

Além do aumento de peso corporal, estudos têm relacionado alterações nos lipídeos séricos com a redução nas concentrações de hormônios ovarianos [46,47]. Neste estudo, não foi evidenciada diferença significativa nos lipidogramas avaliados, com exceção dos triglicerídeos, que foram reduzidos após o tratamento com EH nas duas doses utilizadas. Esse achado sugere que o EH de *Morus nigra* apresenta um efeito benéfico no perfil lipídico de ratas ooforectomizadas, uma vez que nessa fase climatérica, como descrito anteriormente, há uma tendência à elevação do lipidograma.

Indicadores das funções hepática (ALT, AST e Fosfatase Alcalina) e renal (uréia, creatinina e ácido úrico), bem como os hematológicos, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados, sugerindo que o uso crônico do extrato de *Morus nigra* não induziu toxicidade hepática ou renal nas ratas tratadas. Esses dados são importantes como preliminares na avaliação de toxicidade crônica de produtos fitoterápicos em atendimento às determinações normativas vigentes [48].

Portanto, neste estudo, concluiu-se que a administração oral do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* por período crônico promoveu maturação do epitélio vaginal e efeito uterotrófico em ratas ooforectomizadas, apresentando grande potencial farmacológico para o emprego na terapia hormonal. Contudo, há necessidade de estudos químicos biomonitorados a fim de se elucidar o mecanismo de ação dos componentes ativos do extrato

de *Morus nigra* antes de considerá-lo como alternativa ao esquema terapêutico na pós-menopausa.

Agradecimentos

Esse estudo recebeu o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA); assim como, o suporte técnico oferecido pelos Laboratórios de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia e de Fisiologia, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Brasil.

REFERÊNCIAS

- [1] Nelson HD. Menopause. *Lancet*, 2008; 371: 760-70.
- [2] Vieira CS, Navarro PAA. Como diagnosticar e tratar: síndrome climatérica. *Rev Bras Med*, 2007; 64: 99-109.
- [3] Lam PM, Leung TN, Haines C, Chung TK. Climacteric symptoms and knowledge about hormone replacement therapy among Hong Kong Chinese women aged 40 - 60 years. *Maturitas*, 2003; 45: 99-107.
- [4] Genazzani AR, Niccolucci A, Campagnoli P, Crosignania, et al. Assessment of the QoL in Italian menopausal women: comparison between HRT users and non users. *Maturitas*, 2002; 4: 267-280.
- [5] Hilditch Jr, Lewis J, Ross AH, Peter A, Van Maris B, Franssen E, et al. A comparison of the effects of oral conjugated equine estrogen and transdermal estradiol-17 beta combined with and oral progestin on quality of life in postmenopausal women. *Maturitas*, 1996; 24: 177-84.
- [6] Duetz MS, Abel T, Meier C, Niemann S. Self-rated health, life satisfaction and personal characteristics of post-menopausal women under estrogen replacement therapy. *Maturitas*, 2000; 35: 71-79.
- [8] Evio S, Pekkarinem T, Sintonen H. et al. The effect of hormone therapy on the health-related quality of life in elderly women. *Maturitas*, 2007; 56(2): 122-128.
- [9] Gammacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Monteleone P, Benussi C, Bevilacqua G, Genazzani AR. Effects of low- dose, continuous combined estradiol and noretisterone acetate on menopausal quality of life in early postmenopausal women. *Maturitas*, 2003; 44(2): 157-63.

- [10] World Health Organization. Research on the menopause. Geneva, WHO Technical Report Series, 2002.
- [9] Modena MG, Simondi P, Muec AO, et al. New evidence regarding hormone replacement therapies is urgently required Transdermal postmenopausal hormone therapy differs from oral hormone therapy in risks and benefits. *Maturitas*, 2005; 52: 1-10.
- [11] Baker VL, Leitman D, Jaffe RB. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstet Gynecol Surv*, 2000; 55(Suppl 2): S21-47.
- [12] Ginsburg J, Prevalic G. Lack of Significant Hormonal Effects and Controlled Trials of Phytoestrogens. *The Lancet*, 200; 355: 163-4.
- [13] Lobo R. Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinic Aspects. 3rd ed. New York: Academic Press; 2007.
- [14] Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Ganant HK, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA*, 1999; 282(7): 637-45.
- [15] Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA*, 1999; 281(23):2189-97.
- [16] Tremolliers F, Ribot C. Raloxifene in postmenopausal women. *Gynecol Obster Fertil*, 2006; 34(2): 147-53.
- [17] Sirtori, CR, Arnoldi, A, Johnson, SK. Phytoestrogens: End of a tale? *Ann. Med*, 2005; 37: 423-438.
- [18] Song TT, Hendrish S, Murphy PA. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J Agric Food Chem*, 2002; 50(8): 2470.
- [19] Han KK, Soares JM, Haidar MA, de Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*, 2002; 99: 389-394.
- [20] Urbanetz AA, Ribeiro MC. Fitoestrogênios: verdade ou mito? *Reprod Clim*, 2001; 16: 92-7.
- [21] Morito K, Aomori T, Hiroshi T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull*, 2002; 25(1): 48-52.
- [22] Nomura T, Hano Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. *Nat Prod Rep*, 1994; 11(2): 205-18.

- [23] De Souza, MM, M. Bittar, et al. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Z Naturforsch*, 2000; 55: 256-60.
- [24] Nakamura Y, Watanabe S, Miyake N, Kohno H, Osawa T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51: 3309-3312.
- [25] Hassimotto, NMA, et al. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009; doi:10.1016/j.jfca04.002
- [26] Oryan S, M Eidi, et al. Hypoglycaemic effect of alcoholic extract of *Morus nigra* L. Leaves in normal and diabetic rats. *J. of Medical Plants*, 2003; 2: 27-32.
- [27] Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.
- [28] Marcondes, FK, Bianchi, FJ, et al. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, 2002; 62(4): 609-14.
- [29] Vasconcellos, LDS, Sabino, KR, et al. Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. *Rev. Col. Bras. Cir.* [online], 2005; 32(3).
- [30] Cherdshewasart, WS, Sriwatcharakul, et al. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. *Maturitas*, 2008; 61(4): 350-7.
- [31] Masson P. Tumeurs Humaines. Histologic. Diagnostics et Techniques. 2^a e. Paris. Libraire Maloine, 1956; 106-148.
- [32] Lustosa ABM, Castello JBG, Sartori MGF, Baracat EC, Lima GR. Citologia hormonal do trato urinário baixo e da vagina de mulheres na pós-menopausa, antes e durante estrogenoterapia oral e transdérmica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 2002; 24: 573-577.
- [33] Circosta C, Pasquale RD, Palumbo DR, Samperi S, Occhiuto F. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytother Res*, 2006; 20(8): 665-669.
- [34] 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*, 2004; 96(4): 428-35.
- [35] Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christofell V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas*, 2003; 14(44) Suppl 1: pS9-S20.
- [36] Garcia RC, Louredo VF, Mattedi WC, Garcia RP. Biological assays of Chicory (*Chicorium intybis* L.) and Barbatiman (*Stryphnodendron barbatiman* Martius) in rats with surgical menopause. *Revista eletrônica de farmácia*, 2010; 7(1): 65-80.

- [37] EDSTAC – Endocrine Screening and Testing Advisory Committee. Screening and testing. Final Report, 1998; 489- 591.
- [38] Rimoldi et al. Effects of chronic genisteína treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environmental Health Perspectives*, 2007; 115.
- [39] Murray MJ. et al. Soy protein isolate with isoflavones does not prevent estradiol-induced endometrial hyperplasia in postmenopausal women: a pilot trial. *Menopause*, 2005; 10(6).
- [40] Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr*, 1997; 127: 263-9.
- [41] Mosquette R. et al. Efeitos das isoflavonas sobre o miométrio de ratas adultas. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* [online], 2006; 28(4): 227-231.
- [42] Totta P. et al. Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. *J. Nutr*, 2005; 135(11): 2687-2693.
- [43] Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav*, 1999; 67(1): 141-7.
- [44] Szabo J, Ibrahim WH, Sunvold GD, et al. Effect of dietary protein quality and essential fatty acids on fatty acid composition in the liver and adipose tissue after rapid weight loss in overweight cats. *Am J Vet Res*, 2007; 64(3): 310-5.
- [45] Shimomura K, Shimizu H, Tsuchiya T. et al. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endocr J*, 2002; 49(4): 417-23.
- [46] Genazzani AR , Gambacciani M. Controversial issues in climacteric medicine I: Cardiovascular disease and hormone replacement therapy. *Climacteric*, 2000; 3: 233-240.
- [47] Schneider HP. The International Menopause Society Report on the 10th World Congress on the Menopause 10–14 June 2002, Berlin, Germany. *Climacteric*, 2002; 5: 219-228.
- [48] Brazil. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brazil, DF, 12 ago. 1996. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 20/12/2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tradicionalmente, o chá das folhas de *Morus nigra* é utilizado pela população para o controle de sinais e sintomas decorrentes à menopausa, principalmente as ondas de calor, porém não existem estudos comprovando estes efeitos na terapia hormonal. No presente estudo realizado com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* (EH) em ratas cujo ovário foi excisado pelo procedimento de ooforectomia, foi observado que nas doses utilizadas o EH:

- aumentou a frequência da fase estro do ciclo estral das ratas ooforectomizadas;
- aumentou a massa do útero e a concentração sérica de estradiol nas ratas ooforectomizadas;
- reduziu o peso corporal e a concentração de triglicérides nestes animais.

Sendo assim, neste estudo foi observado que a administração oral do extrato de *Morus nigra* L. por período crônico e nas doses aqui avaliadas, apresenta grande potencial farmacológico para emprego na terapia hormonal, uma vez que foi observada maturação do epitélio vaginal e efeito uterotrófico discreto em ratas ooforectomizadas, possivelmente por ação direta ou pelo aumento da disponibilidade de estrogênios endógenos. Contudo, há necessidade de estudos farmacológicos e químicos para se elucidar o mecanismo de ação dos componentes ativos do extrato de *Morus nigra* antes de considerá-lo como alternativa ao esquema terapêutico na pós-menopausa.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, L. E. C.; RENATO, T.; GONÇALVES, E. D.; FRAZON, R. C. Fenologia e produção de variedades de amora-preta nas condições do planalto de Poços de Caldas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 1, p. 89 - 95, 2000.

BAIR, Y. A.; GOLD, E. B.; ZHANG, G.; RASOR, N.; UTTS, J.; UPCHURCH, D. M.; CHYU, L.; GREENDALE, G. A.; STERNFELD, B.; ADLER, S. R. Use of complementary and alternative medicine during the menopause transition: longitudinal results from the Study of Women's Health Across the Nation. **Menopause**, v. 15, n. 1, p. 32 - 43, 2008.

BAKER, V. L.; LEITMAN, D.; JAFFE, R. B. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 55, n. 2, p. 21 - 47, 2000.

BALK, E.; CHUNG, M.; CHEW, P.; IP, S.; RAMAN, G.; KUPELNICK, B.; TATSIONI, A.; SUN, Y.; WOLK, B.; DEVINE, D.; LAU, J. Agency for healthcare Research Quality. Evidence report/technology assessment. **AHRQ publication**. v.5, n. 126, p. 24 - 32, 2005.

BLUMEL, J. E.; CASTELO-BRANCO. C.; CHEDRAUI, P. A.; BINFA, L.; DOWLANI, B.; GÓMEZ, M. S.; SARRÁ, S. Patients' and clinicians' attitudes after the Women's Health Initiative study. **Menopause**, v. 11, n. 1, p. 57 - 61, 2004.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasil, DF, 12 ago. 1996. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 20/12/2009.

CHERDSHEWASART, W. S.; SRIWATCHARAKUL.; MALAIVIJITNOND, S. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. **Maturitas**, v. 61, n. 4, p. 350 - 7, 2008.

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

CUMMINGS, S. R.; ECKERT, S.; KRUEGER, K. A.; GRADY, D.; POWLES, T. J.; CAULEY, J. A.; NORTON, L.; NICKELSEN, T.; BJARNASON, N. H.; MORROW, M.; LIPPMAN, M. E.; BLACK, D.; GLUSMAN, J. E.; COSTA, A.; JORDAN, V. C. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the more randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation Investigators. **Jama**, v. 281, n. 23, p. 2189 – 2197, 1999.

DE SOUZA, M. M.; BITTAR, M.; CECHINEL, F. V.; YUNESB, R. A.; MESSANAC, I.; MONACHEC, F. D.; FERRARI, F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p. 256 - 260, 2000.

DUETZ, M. S.; ABEL, T.; MEIER, C.; NIEMANN, S. Self-rated health, life satisfaction and personal characteristics of post-menopausal women under estrogen replacement therapy. **Maturitas**, v. 35, p. 71 – 79, 2000.

EDSTAC – Endocrine Screening and Testing Advisory Committee. Screening and testing. **Final Report**, p. 489- 591, 1998.

ENA, G.; ROSENBERG, S. Issues to debate on the women's health initiative (WHI) study. Prescription attitudes among Belgian gynaecologists after premature discontinuation of the WHI study. **Human Reproduction**, v. 18, p. 2245 – 2248, 2003.

ETTINGER, B.; BLACK, D. M.; MITLAK, B. H.; KNICKERBOCKER, R. K.; NICKELSEN, T.; GENANT, H. K.; CHRISTIANSEN, C.; DELMAS, P. D.; ZANCHETTA, J. R.; STAKKESTAD, J.; GLÜER, C. C.; KRUEGER, K.; COHEN, F. J.; ECKERT, S.; ENSRUD, K. E.; AVIOLI, L. V.; LIPS, P.; CUMMINGS, S. R. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation Investigators. **Jama**, v. 282, n. 7, p. 637 - 45, 1999.

EVIO, S.; PEKKARINEM, T.; SINTONEN, H.; TIITINENA, A.; VÄLIMÄKI, M. J. The effect of hormone therapy on the health-related quality of life in elderly women. **Maturitas**, v. 56, n. 2, p. 122-128, 2007.

GAMNACCIANI, M.; CIAPONI, M.; CAPPAGLI, B.; MONTELEONE, P.; BENUSSI, C.; BEVILACQUA, G.; GENAZZANI AR. Effects of low- dose, continuous combined estradiol and noretisterone acetate on menopausal quality of life in early postmenopausal women. **Maturitas**, v. 44, n. 2, p. 157 – 63, 2003.

GARCIA, R. C.; LOUREDO, V. F.; MATTEDI, W. C.; GARCIA, R. P. Ensaios biológicos do Almeirão-roxo (*Chicorium intybis* L.) e Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius) em ratas com menopausa cirúrgica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. p. 65-80, 2010.

GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. **Physiology & Behavior**, v. 67, n. 1, p. 141 - 147, 1999.

GENAZZANI, A.R.; GAMBACCIANI, M. Controversial issues in climacteric medicine I: Cardiovascular disease and hormone replacement therapy. **Climacteric**, v. 3, p. 233 - 240, 2000.

GENAZZANI, A.R.; GAMBACCIANI, M. HRT in the thrid millenium. **Maturitas**, v. 38, n. 1, p. 49 - 55, 2001.

GENAZZANI, A.R.; NICCOLUCCI A.; CAMPAGNOLI P.; CROSIGNANI A.; NAPPI, C.; SERRA, G. B.; BOTTIGLIONI, E.; CIANCI, A.; DE ALOYSIO, D.; DONATI, S. C.; GAMBACCIANI, M.; MONTELEONE, P.; GENAZZANI, A. D.; GUASCHINO, S.; PALUMBO, G.; PETRAGLIA, F.; SCHONAUER, S.; VOLPE, A.; DI PAOLANTONIO, T.; NAGNI, M.; TEMPESTA, A.; CORONEL, G. A. Assessment of the QoL in Italian menopausal women: comparision between HRT users and non users. **Maturitas**, v. 4, p. 267 – 280, 2002.

GINSBURG, J.; PREVELIC, G. Lack of Significant Hormonal Effects and Controlled Trials of Phytoestrogens. **The Lancet**, v. 355, p. 163 - 164, 2000.

GOLD, E. B.; BAIR, Y.; ZHANG, G., GUILI, U.; JESSICA, P.; GREENDALE, G. A.; UPCHURCH, D.; CHYU, L. M. A.; STERNFELD, B.; ADLER, S. Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Menopause**, v. 14, n . 4, p. 612 - 23, 2007.

HAN, K. K.; SOARES, J. M.; HAIDAR, M. A.; GIRÃO, M. C.; NUNES, M. G.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Efeitos dos Fitoestrogênios sobre Alguns Parâmetros Clínicos e Laboratoriais no Climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetetrícia**, v. 24, n. 8, p. 547 - 552, 2002.

HAN, K.K.; SOARES, J. M.; HAIDAR, M. A.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. **Obstetrics & Gynecology**, v. 99, p. 389 - 394, 2002.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of Food Composition and Analysis**, doi:10.1016/j.jfca04.002, 2009.

HILDITCH, J. R.; LEWIS, J.; ROSS, A. H.; PETER, A.; VAN MARIS, B.; FRANSSEN, E.; CHARLES, J.; NORTON, P.; DUNN, E. V. A comparison of the effects of oral conjugated equine estrogen and transdermal estradiol-17 beta combined with and oral progestin on quality of life in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 24, p. 177 - 84, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Brasil: Tábua Completa de Mortalidade – sexo feminino – 2008 [acesso em 20 dez. 2009]. Disponível em <Http://www.ibge.gov.br>.

KANG, B. M.; KIM, M. R.; PARK, H. M.; YOON, B. K.; LEE, B. S.; CHUNG, H. W.; CHO, S. H.; CHOI, H.; KIM, J. G. Attitudes of Korean clinicians to postmenopausal hormone therapy after the Women's Health Initiative studys. **Menopause**, v. 13, p. 125 – 129, 2006.

LAM, P. M.; LEUNG, T. N.; HAINES, C.; CHUNG, T. K. Climacteric symptoms and knowledge about hormone replacement therapy among Hong Kong Chinese women aged 40-60 years. **Maturitas**, v. 45, p. 99 - 107, 2003.

LIMA, S. M. R. R.; REIS, B.; SAITO, S.; RUGGERO, A.; AOKI, T. Reason of demand for phytotherapy drugs in the climacteric. **Climacteric**, v. 11, p. 223 – 335, 2008.

LOBO, R. Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinic Aspects. **Academic Press**, 3ed, 2007.

LUSTOSA, A. B. M.; CASTELLO, J. B. G.; SARTORI, M. G. F.; BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. Citologia hormonal do trato urinário baixo e da vagina de mulheres na pós-menopausa, antes e durante estrogenoterapia oral e transdérmica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, p. 573 - 577, 2002.

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. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 4, p. 428 - 435, 2004.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 609 - 14, 2002.

MORITO, K.; AOMORI, T.; HIROSI, T.; KINJO, J. HIRAKAWA, T.; OKAWA, M.; NOHARA, T.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M.; MASAMUNE, Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 48-52, 2002.

MASSON, P. **Tumeurs Humaines Histologiques Diagnostiques et Techniques**. Paris. Libraire Maloine, 2ed, p. 106-148, 1956.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**, Fortaleza: Edições UFC, 141p., 1997.

MESSINIS, I. E. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. **Human Reproduction Update**, v.12, n. 5, p. 557 - 571, 2006.

MINCU, I. C.; IONESCU-TIRGOVISTE. Diabetic neuropathy: clinical and electrophysiologic results of the use of a plant extract rich in myoinositol. **Revista de Medicina Interna, Neurologie, Psihiatrie, Neurochirurgie, Dermato-venerologie**, v. 41, n. 3, p. 265 - 269, 1989.

MODENA, M.G.; SIMONDI P.; MUECK A.O.; KUTTENN F.; LIGNIÈRES, B.; VERHAEGHE, J.; FOIDART, J. M.; CAUFRIEZ, A.; GENAZZANI, A. R. New evidence regarding hormone replacement therapies is urgently required Transdermal postmenopausal hormone therapy differs from oral hormone therapy in risks and benefits. **Maturitas**, v. 2, p. 1 - 10, 2005.

MOSQUETTE, R.; CAMPOS, M. P.; GOMES, L.; SIMÕES, R. C.; HAIDAR, M. A.; SIMÕES, M. J.; SOARES, J. M.; BARACAT, E. C. Efeitos das isoflavonas sobre o miométrio de ratas adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 4, p. 227 - 231, 2006.

MURRAY, M. J.; MEYER, W. R.; LESSEY, B. A.; OI, R. H.; DEWIRE, R. E.; FRITZ, M. A. Soy protein isolate with isoflavones does not prevent estradiol-induced endometrial hyperplasia in postmenopausal women: a pilot trial. **Menopause**, v. 10, n. 6, 2005.

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

NAHÁS, E. A. P.; NETO, J. N.; LUCA, L. A.; TRAIMAN, P.; PONTES, A.; DALBEN, I. Efeitos da Isoflavona Sobre os Sintomas Climatéricos e o Perfil Lipídico na Mulher em Menopausa. **Revista Brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 25, n. 5, 2003.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3309 - 3312, 2003.

NORTH AMERICAM MENOPAUSE SOCIETY (NAMS). Treatment of Menopause associated vasomotor symptoms: position statement of the North Americam Menopause Society. **Menopause**, v. 11, n. 1, p. 11 - 33, 2004.

NASSAR, A. H.; ESSAMAD, H. M. A.; AWWAD, J. T.; KHOURY, N. G.; USTA, I. M. Gynecologists'attitudes towards hormone therapy in the post "Women's Health Initiative" study. **Maturitas**, v. 52, p. 18 - 25, 2005.

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

NEWTON, K. M.; BUIST, D.S.; YU, O.; HARTSFIELD, C. L.; ANDRADE, S. E.; WEI, F.; CONNELLY, M. T.; CHAN, K. A.; Hormone therapy initiation after the Women's Health Initiative. **Menopause**, v. 15, n. 3, p. 487 - 93, 2008.

NOMURA, T.; Y. HANO. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. **Natural Product Reports**, v. 11, n. 2, p. 205 - 18, 1994.

NORTH AMERICAM MENOPAUSE SOCIETY (NAMS). Treatment of Menopause associated vasomotor symptoms: position statement of the North Americam Menopause Society. **Menopause**, New York, v. 11, n. 1, p. 11 - 33, 2004.

OLOFSSON, A. S.; COLLINS, A. Psychosocial factors, attitude to menopause and symptoms in Swedish perimenopausal women. **Climacteric**, v. 3, n. 1, p. 33 - 42, 2000.

ORYAN, S.; EIDI, M. et al. Hypoglycaemic effect of alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves in normal and diabetic rats. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, p. 27 - 32, 2003.

QUER, P. F. Plantas medicinales El Dioscórides renovado, 1995.

RIMOLDI, G.; CHRISTOFFEL, J.; SEIDLOVA-WUTTKE, D.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Effects of chronic genisteína treatment in mammary gland, uterus, and vagina. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, 2007.

ROLNICK, S. J.; JACKSON, J.; KOPHER, R.; DEFOR, T. A. Provider management of menopause after the findings of the Women's Health Initiative. **Menopause**, v. 14, n. 3, p. 441- 449, 2007.

RUSSELL, L.; HICKS, G.S.; LOW, A.K.; SHEPHERD, J.M.; BROWN, C.A. Phytoestrogens: a viable option? **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 324, n. 4, p.185-188, 2002.

SANTELL, R. C.; CHANG, Y. C.; NAIR M. G; HELFERICH, W. G. Dietary genistein eseerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary aesis in rats. **Journal of Nutrition**. v. 127, p. 263 - 269, 1997.

SCHNEIDER, H. P. The International Menopause Society Report on the 10th World Congress on the Menopause 10–14 June 2002, Berlin, Germany. **Climacteric**, v. 5, p. 219-228, 2002.

SHIMOMURA, K.; SHIMIZU, H.; TSUCHIYA, T.; ABE, Y.; UEHARA, Y.; MORI, M. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? **Endocrine Journal**, v. 49, n. 4, p. 417 - 23, 2002.

SIRTORI, C. R.; ARNOLDI, A.; JOHNSON, S. K. Phytoestrogens: End of a tale? **Annals of Medicine** , v. 37, p. 423 - 438, 2005.

SONG, T.T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 50, n. 8, p. 2470, 2002.

SZABO, J.; IBRAHIM, W. H.; SUNVOLD, G. D.; KELLEHER, J. K.; BRUCKNER, G. G. Effect of dietary protein quality and essential fatty acids on fatty acid composition in the liver and adipose tissue after rapid weight loss in overweight cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 3, p. 310 - 315, 2007.

ACCONCIA, F.; VIRGILI, F.; CASSIDY, A.; WEINBERG, P. D.; RIMBACH, G.; MARINO, M. Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2687 - 2693, 2005.

TREMOLLIERS, F.; RIBOT, C. Raloxifene in postmenopausal women. **Gynecology Obstetricyr Fertil**, v. 34, n. 2, p. 147 – 153, 2006.

URBANETZ, A.A.; RIBEIRO, M.C. Fitoestrogênios: verdade ou mito? **Reprod Clim**, v. 16, p. 92 - 7, 2001.

VAN DER MOOREN, M. J.; KENEMANS P. Postmenopausal Hormone Therapy Impact on Menopause-Related Symptoms, Chronic Disease and Quality of Life. **Drugs**, v. 64, n. 8, p. 821 – 836, 2004.

VASCONCELLOS, L. S.; SABINO, K. R.; PETROIANU, A. Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 3, 2005.

VIEIRA, C. S.; NAVARRO, P. A. A. Como diagnosticar e tratar: síndrome climatérica. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 64, p. 99 - 109, 2007.

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

WOMEN'S HEALTH INICIATIVE - WHI. Risks and Benefits of Estrogen Plus progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the WHI Randomized Controlled Trial. **JAMA**, v. 3, p. 321 - 333, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research on the menopause in the 1990s. Geneva: **World Health Organization**; 1996.

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, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A – PARTES AÉREAS DE *Morus nigra* L.: FOLHAS

A



FONTE: arquivo pessoal

ANEXO A - Instruções para autores do Periódico *Maturitas* on ScienceDirect.

GUIDE FOR AUTHORS

An international journal of midlife health and beyond.

The Official Journal of the European Menopause and Andropause Society (EMAS) .

INTRODUCTION

Maturitas is an international multidisciplinary peer reviewed scientific journal of midlife health and beyond publishing original research, reviews, consensus statements and guidelines. The scope encompasses all aspects of postreproductive health in both genders ranging from basic science to health and social care.

Maturitas will publish in the following areas:

- predictors, effects and management of chronic diseases
- sex steroid deficiency in both genders
- epidemiology, health and social care
- therapeutic advances
- complementary and alternative medicines

We offer *Fast Track* publication for clinical trials and research articles which present groundbreaking results that justify rapid dissemination. Articles accepted through this route can expect less than 8 weeks editorial time from submission to publication online. Articles submitted for this route will be checked by the Editor-in-Chief to determine if the criterion for fast publication has been met; if not, articles will be redirected to the normal route of category article.

New Investigators may also apply for the New Investigator Prize Paper Award.

TYPES OF PAPERS

Original articles: a full-length report of original basic or clinical investigation (2000-3000 words, up to 30 references). A structured abstract of no more than 250 words with the following sections (objectives, study design, main outcome measures, results, conclusions) is required. The rest of the paper should be structured as follows: Introduction, Methods, Results, Discussion, References. *Maturitas* gives priority to reports of original research that are likely to change clinical practice or thinking about a disease. We offer fast-track peer

review and publication of randomized controlled trials that we judge of importance to practice or research (see Fast-track publication). We invite submission of all clinical trials, whether Phase I, II, or III.

Submission of randomized controlled trials requires inclusion of a checklist and flowchart in accordance with the CONSORT guidelines and the registration number of the trial and the name of the trial registry. Studies of diagnostic accuracy must be reported according to STARD guidelines. Observational studies (cohort, case-control, or cross-sectional designs) must be reported according to the STROBE statement.

Short communications: must not exceed 1,000 words with no more than one table or illustration and five references. An unstructured abstract of no more than 100 words is required. The text should be structured in four parts: Introduction, Methods, Results and Discussion.

Review articles: a comprehensive review of prior publications relating to an important clinical subject (2000-3000 words and 30-50 references). An unstructured abstract of no more than 250 words is required. The Introduction should indicate why the topic is important and should state the specific objective(s) of the review. The Conclusion should include the clinical implications and observations regarding the need for additional research. Systematic reviews should follow the QUOROM guidelines. Meta-analysis of observational studies should follow the MOOSE guidelines.

Guest editorials must not exceed 1,000 words and five references.

Letters to the Editor: a question or challenge to an article published recently in Maturitas. Letters must be received within 6 weeks of publication of the article to which they refer and should be no longer than 250 words.

CONTACT DETAILS FOR SUBMISSION

Submission of manuscripts proceeds entirely online at <http://ees.elsevier.com/maturitas>. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Maturitas Editorial Office at mat@elsevier.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/authorethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans*, <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments*, <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals*, <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>

This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Plagiarism

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Submission of multi-authored manuscripts to this journal requires the consent of each author and all have to sign the covering letter. All authors of, and all contributors (including medical writers and editors) must specify their individual contributions at the end of the text. The following format is suggested: 'I declare that I participated in the (here list contributions made to the study) and that I have seen and approved the final version. I have the following conflicts of interest' (list here all relevant conflicts and source of funding). This should be listed in the 'Comments' field in EES.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this

agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>

Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

Patient Details

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), personal details of patient included in any part of the article and in any supplementary

materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see <http://www.elsevier.com/patientphotographs>

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/maturitas>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Referees

To expedite the review process Authors are required to provide the editorial office with the names and email addresses of 4 potential referees that are able to competently review the article submitted for possible publication. The referees are not to be associated with or involved with the article in any way or be from the same institution as the author(s) involved with the article.

PREPARATION

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing

with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic Artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor. If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsart', or alternatively the standard document class 'article'.

The Elsevier LaTeX package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the files: elsart.cls, guidelines for users of elsart, a template file for quick start, and the instruction booklet 'Preparing articles with LaTeX'.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

The Introduction should describe the question addressed by the report and must state the objective of the research. The literature review should be relevant but not detailed.

Materials and Methods

The Methods section should describe the research methodology in sufficient detail that others could reasonably be expected to be able to duplicate the work. However, if the methodology has been previously published, the appropriate reference should be cited, and a full description is not required. Methods of statistical analysis should be identified and, when appropriate, the basis for their selection stated. Statistical software programs used should be cited in the text. *P* values should be expressed to no more than three decimal places. Reports in which statistical difference is lacking must provide some indication of the study's power to detect such differences, and this information must be included in the abstract.

Results

The Results section should present the findings in appropriate detail. Tables and figures may be used, but duplication between text and tables or figures is to be avoided.

Discussion

The Discussion section should be used to critically appraise the implications of the findings and to compare them with those of other studies. Repetition of the results section should be avoided.

Conclusion

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusion section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential Title Page Information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling

and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proofreading the article, etc.). Persons who have contributed intellectually to the paper but whose contributions do not justify authorship may be named and their function or contribution described, e.g. 'scientific adviser', 'data collections', or 'participation in clinical trial'. Such persons must have given their permission to be named. Authors are responsible for obtaining written permission from the persons acknowledged by name, because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

GenBank

DNA sequences and GenBank Accession numbers:

Many Elsevier journals cite 'gene accession numbers' in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes: indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic Artwork

General points:

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats. Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats. (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Figure Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Authors are responsible for the accuracy of references. The 'Vancouver' style is used. References appearing for the first time in a table or figure should be cited in the text where the table or figure is mentioned. References cited must have been published in peer-reviewed

publications.

Citations in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication' Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web References

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-934) (see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)

Journal Abbreviations

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/en/node/344>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Supplementary Materials

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission Checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations:

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print.
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier (DOI)

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):
doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader© version 7 (or higher) available free from

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of

your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Author Inquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

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](#)