



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**EFEITO DO EXTRATO DE *Morus Nigra* L. NO
TRATAMENTO DE SINTOMAS VASOMOTORES EM
MULHERES COM SÍNDROME CLIMATÉRICA – UM
ESTUDO RANDOMIZADO, PLACEBO - CONTROLADO**

JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA

**São Luís
2018**

JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Morus Nigra* L. NO
TRATAMENTO DE SINTOMAS VASOMOTORES EM
MULHERES COM SÍNDROME CLIMATÉRICA – UM
ESTUDO RANDOMIZADO, PLACEBO - CONTROLADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de concentração: Estudo de Doenças do Adulto: Investigação de Aspectos Clínicos e Epidemiológicos, Patogêneses e Resposta Terapêutica das Doenças Crônicas.

Orientadora:

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito.

Coorientadora:

Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito.

Coordenadora:

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís

2018

Costa, Joyce Pinheiro Leal.

EFEITO DO EXTRATO DE *Morus Nigra* L. NO TRATAMENTO DE SINTOMAS VASOMOTORES EM MULHERES COM SÍNDROME CLIMATÉRICA UM ESTUDO RANDOMIZADO, PLACEBO - CONTROLADO / Joyce Pinheiro Leal Costa. - 2018.

157 p.

Coorientador(a): Haissa Oliveira Brito.

Orientador(a): Luciane Maria Oliveira Brito.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2018.

1. Climatério. 2. Ensaio Clínico. 3. *Morus*. I. Brito, Haissa Oliveira. II. Brito, Luciane Maria Oliveira. III. Título.

JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Morus Nigra* L. NO
TRATAMENTO DE SINTOMAS VASOMOTORES EM
MULHERES COM SÍNDROME CLIMATÉRICA – UM
ESTUDO RANDOMIZADO, PLACEBO - CONTROLADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado
apresentada em sessão pública, considerou a candidata aprovada em:

____/____/____.

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito
(Orientadora) Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Luiz Francisco Cintra Baccaro
(Examinador) Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges
(Examinadora) Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Patricia de Maria Silva Figueiredo
(Examinadora) Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
(Suplente) Universidade Federal do Maranhão

A Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por Seu amor imensurável e Seu cuidado perfeito. Ele tem sido meu refúgio e sustento, o financiador dos meus sonhos, sem Ele não teria finalizado este trabalho. A Ele seja dada minha eterna gratidão!

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito, por ter me influenciado a prosseguir na carreira acadêmica e a despertar o fascínio pela pesquisa científica, pelas cobranças que me impulsionaram a fazer o melhor, pela empatia e paciência quando passei por momentos difíceis no final desta jornada.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito, pelas experiências acadêmicas e ensinamentos compartilhados, pelo incentivo frequente e por ser um exemplo de pesquisadora competente.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Oliveira Brito, por ser o idealizador desta pesquisa, por conceder a mim o privilégio de participar da mesma, pelo apoio e ensinamentos prestados.

À Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, pela cobrança e incentivo aos mestrandos do PPGSAD.

À Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein, pelas palavras de incentivo que sempre me impulsionam a prosseguir e por ser um referencial de médica para mim.

Aos funcionários do PPGSAD, CEPEC, BTMA e Clínica MÉDICA IMAGEM, em especial à Dra. Mara Silvia Pinheiro Cutrim, pelo trabalho competente e pela solicitude em nos ajudar.

Às minhas colegas de turma, em especial Bruna, Gerusinete, Flávia, Fernanda Lima e Fernanda Santos, pelo suporte e conselhos que renovaram as minhas forças e me ajudaram a prosseguir, pelos momentos de trocas de experiências e descontração que tivemos. A amizade de vocês é um presente de Deus pra mim.

À FAPEMA e CAPES, pelo apoio financeiro e científico.

Ao meu esposo, João Evangelista, por não ter medido esforços para me ajudar, por me incentivar a continuar todos os dias e a sempre buscar o crescimento profissional, pela cumplicidade ao longo desses 9 anos e pelo amor incondicional. Meu amor e respeito por você só aumenta.

Ao meu amado filho, Josué. A sua existência renova as minhas forças todos os dias, filho. Não há palavras para agradecer a Deus pelo sonho realizado de ser sua mãe. O amor que tenho por você me fez entender melhor o próprio amor de Deus. Não há como mensurar, limitar ou descrever.

Aos meus pais, João e Célia, por serem os melhores pais do mundo! Se hoje eu cheguei até aqui, foi porque o Senhor me concedeu a graça de tê-los como pais, por terem cuidado de mim com tanto amor e dedicação até hoje, por serem meu suporte sempre presente. Sinto-me mais segura por tê-los ao meu lado. Amo vocês muitão!

Ao meu querido irmão, Jonno, meu orgulho, meu exemplo. Não sou tão inteligente e nem possuo o dom da oratória como você, por isso quero ser você quando crescer. Você sabe o quanto o admiro e como te amo. Deus lhe presenteou com uma esposa maravilhosa, Paloma, e com um filho lindo e tão inteligente como você, Benjamin. Amo vocês!

À minha querida cunhada, Patrícia, por sempre estar disposta a me ajudar, pelo amor dedicado ao meu filho, pelas palavras de incentivo. Jamais esquecerei como você foi imprescindível em um dos momentos mais árduos da minha vida. Amar você é uma consequência de te conhecer.

Às minhas amigas, Eliene, Maria, Ozânia e Raíssa, pela amizade sincera, pelas orações, pelas risadas e lágrimas compartilhadas. Cada uma de vocês também representa o cuidado de Deus para comigo. Amo vocês!

A todas as mulheres que participaram desta pesquisa, que confiaram no profissionalismo de nossa equipe e permaneceram até o final da intervenção. Sem o compromisso delas, não teríamos alcançado nossos objetivos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Os justos florescerão como a palmeira, crescerão como o cedro no Líbano. Estão plantados na casa do Senhor, florescerão nos átrios do nosso Deus. Na velhice ainda darão frutos, serão viçosos e florescentes”.

(Salmos 92:12-14)

“Quando o SENHOR trouxe do cativeiro os que voltaram a Sião, éramos como os que sonham. Então a nossa boca se encheu de riso e a nossa língua de cânticos. Então se dizia entre as nações: Grandes coisas fez o Senhor a estes. Sim, grandes coisas fez o Senhor por nós e por isso estamos alegres... Os que semeiam em lágrimas, com cânticos de júbilo segarão. Aquele que leva a preciosa semente para semear, andando e chorando, voltará com alegria, trazendo consigo os seus molhos”.

(Salmos 126:1-6)

RESUMO

Introdução: A terapia de reposição hormonal (TRH) é o tratamento padrão para sintomas climatéricos; porém, existem contraindicações ao seu uso. Nesse contexto, o uso de fitoestrógenos tem sido uma prática comum, uma vez que diminuem a incidência desses sintomas. Não existem dados clínicos a respeito do uso da *Morus nigra* L. para o tratamento dos sintomas climatéricos. **Objetivo:** Comparar a eficácia do extrato de folhas de *Morus nigra* L. no tratamento de sintomas climatéricos com a TRH (grupo comparativo padrão) e um grupo placebo (controle simples). **Métodos:** Um ensaio clínico randomizado (sequência gerada por computador), duplo-cego (paciente), foi realizado com 62 mulheres climatéricas, divididas em três grupos: Grupo Amora - cápsula com pó de *Morus nigra* L. 250 mg (n = 20), TRH - estradiol 1 mg ou estradiol 1 mg + acetato de noretisterona 0,5 mg (n = 20) e Placebo (n = 22), durante 60 dias. A variável resposta foi o escore médio do Índice de Blatt-Kuppermann (IBK). Avaliou-se também a qualidade de vida (QV) por meio do questionário SF-36, a colpocitologia oncótica, colposcopia e dosagens bioquímicas e hormonais (glicemia de jejum, HDL, LDL, triglicerídeos, colesterol total, AST, ALT, ureia, creatinina, ácido úrico, fosfatase alcalina, PCR ultrasensível, estradiol, FSH, TSH e T4 livre). O nível de significância foi estipulado em 5% e a análise realizada ocorreu por intenção por tratar (ITT). Os dados foram analisados usando o software SPSS 25.0 **Resultados:** Os grupos apresentaram um perfil sociodemográfico homogêneo, com idade próxima aos 50 anos, cor parda, ensino médio completo, auxiliar de serviços gerais, sem etilismo, ou tabagismo e não possuíam prática regular de atividade física. Houve uma redução média nos escores de IBK no grupo Amora (18,0 para 10,0; $p < 0,001$) e TRH (14,0 para 5,0; $p = 0,001$), exceto para o grupo Placebo (10,5 para 9,0; $p = 0,083$). Quando analisado se houve melhora individual dos sintomas, o grupo Amora apresentou um aumento de 46% da probabilidade de melhora dos sintomas climatéricos, comparado ao grupo Placebo ($p = 0,043$). Sobre a QV, o grupo Amora apresentou melhora nos domínios de capacidade funcional ($p = 0,006$), vitalidade ($p = 0,030$), saúde mental ($p = 0,017$) e aspecto social ($p = 0,003$); o grupo TRH apresentou melhora no domínio de limitação emocional ($p = 0,040$) e o grupo Placebo nos domínios capacidade funcional ($p = 0,007$), limitação física ($p = 0,031$) e saúde mental ($p = 0,028$). Em relação aos efeitos adversos que surgiram durante os tratamentos, a mastalgia e *spotting* manifestaram-se apenas no grupo TRH ($p < 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os três grupos quanto aos resultados da colpocitologia oncótica e da colposcopia. A análise dos exames bioquímicos revelou que a glicemia de jejum aumentou nos três grupos (Amora: $p = 0,030$; TRH: $p = 0,0001$ e Placebo: $p = 0,003$). No grupo Amora houve elevação dos hormônios T4 livre e estradiol ($p = 0,011$ e $p = 0,031$, respectivamente), sem alteração na função hepática e renal. **Conclusões:** Houve melhora dos sintomas climatéricos com o uso do extrato de *Morus nigra* L. 250 mg por 60 dias. O uso de *Morus nigra* L. não provocou efeitos adversos e tóxicos durante o período de tratamento.

Descritores: Ensaio Clínico; Climatério; Morus.

ABSTRACT

Introduction: Hormone replacement therapy (HRT) is the standard treatment for climacteric symptoms; however, there are contraindications to its use. In this context, the use of phytoestrogens has been a common practice, since they decrease the incidence of these symptoms. There are no clinical data about the use of *Morus nigra* L. for the treatment of climacteric symptoms. **Objective:** To compare the efficacy of leaf extract of *Morus nigra* L. for the treatment of climacteric symptoms with HRT (standard comparative group) and a placebo group (simple control). **Methods:** A randomized (computer generated), double-blind clinical trial was performed with 62 climacteric women, divided into three groups: *Morus nigra* (MN) Group - capsule with *Morus nigra* L. powder 250 mg (n = 20), HRT-estradiol 1 mg or estradiol 1 mg + norethisterone acetate 0.5 mg (n = 20) and Placebo (n = 22) for 60 days. The response variable was the mean score of the Blatt-Kuppermann Index (BKI). Quality of life (QoL) through the SF-36 questionnaire, oncotic colpocitology, colposcopy and biochemical and hormonal dosages were also evaluated (fasting glycemia, HDL, LDL, triglycerides, total cholesterol, AST, ALT, urea, creatinine, uric acid, alkaline phosphatase, ultra-sensitive RCP, estradiol, FSH, TSH and free T4). The level of significance was set at 5% and analysis performed by intention to treat (ITT). Data were analyzed using SPSS 25.0 software. **Results:** The groups presented a homogenous sociodemographic profile, close to 50 years of age, brown, full high school, general services auxiliary, without alcoholism, or smoking, and did not have regular practice of physical activity. There was a mean reduction in BKI scores in the MN group (18.0 for 10.0, $p < 0.001$) and HRT (14.0 for 5.0, $p = 0.001$), except to the Placebo group (10.5 for 9, $P = 0.083$). When analyzing whether there was an individual improvement in symptoms, the MN group presented a 46% increase in the probability of improvement of the climacteric symptoms, compared to the Placebo group ($p = 0.043$). About the QoL, the MN group showed improvement in the functional capacity ($p = 0.006$), vitality ($p = 0.030$), mental health ($p = 0.017$) and social aspect ($p = 0.003$); the HRT group presented improvement in the emotional limitation domain ($p = 0.040$) and the Placebo group in the functional capacity ($p = 0.007$), physical limitation ($p = 0.031$) and mental health domains ($p = 0.028$). Regarding the adverse effects that arose during the treatments, the breast tenderness and spotting manifested only in the HRT group ($p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). There was no significant difference among the three groups regarding the results of oncotic colpocitology and colposcopy. Analysis of the biochemical tests revealed that fasting glycemia increased in the three groups (MN: $p = 0.030$, HRT: $p = 0.0001$ and Placebo: $p = 0.003$). In the MN group there was elevation of the free T4 and estradiol hormones ($p = 0.011$ and $p = 0.031$, respectively), without changes in hepatic and renal function. **Conclusions:** There was improvement of the climacteric symptoms with the use of the extract of *Morus nigra* L. 250 mg for 60 days. The use of *Morus nigra* L. did not cause adverse and toxic effects during the treatment period.

Keywords: Clinical Trial; Climacteric; Morus.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação do ciclo fértil da mulher, segundo a Organização Mundial de Saúde. Extraído de WHO (1996)..... | 18 |
| Figura 2. Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo feminino. Extraído de VISSER <i>et al.</i> (2012)..... | 19 |
| Figura 3. Sistema de estadiamento do envelhecimento reprodutivo feminino (STRAW – Stages of Reproductive Aging Workshop). Extraído de BUTLER e SANTORO (2011)..... | 20 |
| Figura 4. Prevalência das taxas dos sintomas climatéricos segundo a fase do envelhecimento reprodutivo feminino. Extraído de NELSON (2008)..... | 22 |
| Figura 5. Análise comparativa das distâncias entre a hidroxila dos grupos fenólicos nas moléculas dos principais fitoestrógenos e a distância entre hidroxila do grupo fenólico na posição 3 e a hidroxila do álcool na posição 17 na molécula do 17 β -estradiol. Extraído de POLUZZI <i>et al.</i> (2014)..... | 30 |
| Figura 6. Folhas e frutos da espécie <i>Morus nigra</i> L. Extraído de MRKVICKA (2010)..... | 35 |
| Figura 7. Fluxograma do progresso das fases do ensaio clínico. São Luís, 2018..... | 43 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Ação dos principais fitoestrógenos em células de câncer de mama. Extraído de HSIEH <i>et al.</i> (2018)..... | 31 |
| Quadro 2. Sistemática botânica de <i>Morus nigra</i> L. Extraído de: Naturalis Biodiversity Center (2017)..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Resultados dos exames de imagem basais das mulheres climatéricas. São Luís, 2018..... | 45 |
| Tabela 2. Características sociodemográficas e clínicas das mulheres climatéricas segundo o grupo de tratamento. São Luís, 2018..... | 48 |
| Tabela 3. Comparação das medianas do IBK e domínios do SF-36 entre os grupos Amora, TRH e Placebo em dois momentos diferentes: na avaliação basal e após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018..... | 50 |
| Tabela 4. Comparação das medianas do IBK e domínios do SF-36 na avaliação basal e após 2 meses de tratamento, para cada grupo individualmente. São Luís, 2018..... | 51 |
| Tabela 5. Análise da melhora dos sintomas climatéricos avaliados pelo IBK após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018..... | 51 |
| Tabela 6. Associação entre a ocorrência de mastalgia, <i>spotting</i> e o tipo de tratamento. São Luís, 2018..... | 52 |
| Tabela 7. Comparação dos parâmetros da colpocitologia oncótica e colposcopia dos grupos Amora, TRH e Placebo em dois momentos diferentes: na avaliação basal e após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018..... | 53 |
| Tabela 8. Comparação dos exames bioquímicos e hormonais dos grupos Amora, TRH e Placebo em dois momentos diferentes: na avaliação basal e após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018..... | 54 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| Akt | Protein Kinase B |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| FE | Fitoestrógenos |
| FSH | Hormônio foliculoestimulante |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofina |
| HDL | High density lipoprotein |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta performance |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina Tipo 1 |
| IGF-1R | Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina Tipo 1 |
| IL – 10 | Interleucina 10 |
| IL – 6 | Interleucina 6 |
| IMS | International Menopause Society |
| IU | Incontinência urinária |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LH | Hormônio luteinizante |
| MAO-A | Monoaminoxidase A |
| MAO-B | Monoaminoxidase B |
| MC-7 | Linhagem de células de câncer de mama |
| MDA–MB – 231 | Linhagem de adenocarcinoma mamário |
| MS | Ministério da Saúde |
| Mtb | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NAMS | North American Menopause Society |
| NF-kB | Factor nuclear kappa B |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey |
| NO | Óxido Nítrico |
| OH | Hidroxila |
| PCR | Proteína C Reativa |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |
| PtpB - | Proteína tirosina fosfatase B |
| Radical ABTS | 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) |
| RE | Receptores estrogênicos |
| RENISUS | Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS |
| RE- α | Receptor estrogênico alfa |
| RE- β | Receptor estrogênico beta |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensageiro |
| SF – 36 | Short-Form Health Survey 36 |
| STRAW | Stages of Reproductive Agind Workshop |
| TF | Flavonoides totais |
| TRH | Terapia de reposição hormonal |
| TSH | Hormônio treestimulante |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |
| WHI | Women's Health Initiative |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 17 |
| 2.1 Climatério | 17 |
| 2.1.1 Fisiologia do Climatério..... | 17 |
| 2.1.2 Sintomas do Climatério..... | 21 |
| 2.2 Terapia de Reposição Hormonal | 24 |
| 2.3 Terapia Alternativa: Fitoestrógenos | 28 |
| 2.4 <i>Morus nigra</i> Linnaeus | 33 |
| 2.4.1 Principais efeitos dos frutos da <i>Morus nigra</i> | 35 |
| 2.4.2 Principais efeitos das folhas da <i>Morus nigra</i> | 37 |
| 2.4.3 Outros efeitos da <i>Morus nigra</i> | 38 |
| 3 OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 Geral | 41 |
| 3.2 Específicos | 41 |
| 4 METODOLOGIA | 42 |
| 4.1 Tipo de estudo | 42 |
| 4.2 Período e Local do estudo | 42 |
| 4.3 Amostra | 42 |
| 4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão..... | 43 |
| 4.4 Cálculo do tamanho amostral | 43 |
| 4.5 Instrumentos de coleta e avaliação de dados | 44 |
| 4.6 Processamento e tratamento estatístico | 46 |
| 4.6.1 Implementação e cegamento..... | 46 |
| 4.6.2 Tratamento dos grupos..... | 46 |
| 4.6.3 Análise dos dados..... | 47 |
| 4.7 Aspectos éticos | 47 |
| 5 RESULTADOS | 48 |
| 6 DISCUSSÃO | 55 |
| 7 CONCLUSÕES | 64 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 65 |
| 9 REFERÊNCIAS | 66 |
| 10 ANEXOS | 84 |
| 11 APÊNDICES | 96 |
| 12 PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO | 99 |
| 12.1 Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS..... | 99 |
| 12.2 Normas Editoriais/Normas para os autores..... | 99 |
| 12.3 Artigo..... | 109 |
| 13 SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO | 131 |
| 13.1 Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS..... | 131 |
| 13.2 Normas Editoriais/Normas para os autores..... | 131 |
| 13.3 Artigo..... | 142 |

1 INTRODUÇÃO

O climatério consiste na transição da fase reprodutiva da mulher para a não reprodutiva, com o declínio gradual da função ovariana e a instalação da menopausa (NELSON, 2008). O diagnóstico da menopausa é determinado pelo último fluxo menstrual seguido de doze meses de amenorreia, constituindo um evento que ocorre durante o climatério (CHEDRAUI *et al.*, 2010).

As mulheres transcorrem um terço de suas vidas no climatério, que pode estender-se dos 35 aos 65 anos de idade (MOREIRA *et al.*, 2014). Com o aumento da expectativa de vida, atualmente as pessoas vivem até os 75-80 anos, principalmente nos países desenvolvidos. Com a expansão da idade média, o número de mulheres que vivenciam o climatério também se elevou, bem como a busca por novas terapêuticas (REMPORT e BLAZOVICS, 2017).

As alterações hormonais vivenciadas durante o climatério, tais como a diminuição do 17- β -Estradiol e o aumento do hormônio folículo-estimulante, provocam várias modificações no corpo, elevando o risco para o desenvolvimento de várias enfermidades (MOREIRA *et al.*, 2014). Os sintomas mais comumente apresentados incluem fogachos, sudorese noturna, palpitações e cefaleias. Somam-se mudanças no metabolismo ósseo, cardiovascular e manifestações psicológicas como a depressão, irritabilidade, fadiga e perda da libido (BLUMEL *et al.*, 2000; DEMETRIO *et al.*, 2001; MALHEIROS *et al.*, 2014).

A sintomatologia da síndrome climatérica interfere de forma negativa no cotidiano das mulheres e tem sido alvo de uma preocupação crescente por parte da saúde pública. Segundo o último censo demográfico, do ano 2010, cerca de 24,3 milhões de mulheres brasileiras tinham mais de 40 anos de idade. O município de São Luís, especificamente, possuía 538.138 mulheres, sendo que destas, 169.565 encontravam-se na faixa etária entre 35 e 64 anos de idade (IBGE, 2010).

A terapia de reposição hormonal (TRH), seja pelo uso de estrogênio ou combinação de estrogênio com progesterona, está disponível desde 1940 e tem sido utilizada até os dias atuais para amenizar os sintomas do climatério (KOPERA e VAN KEEP, 1991). Foi considerada como padrão terapêutico após alguns estudos comprovarem que as mulheres que utilizaram a TRH apresentaram um risco menor de fratura vertebral e de quadril, diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, redução dos sintomas vasomotores e um atraso no aparecimento da doença de Alzheimer (BARRETT-CONNOR, 1998; LISABETH e BUSHNELL, 2012).

Contudo, devido a alguns efeitos adversos observados posteriormente e à falta de acompanhamento terapêutico regular, a TRH é indicada com cautela atualmente. Segundo o estudo WHI (Women's Health Initiative), a TRH resultou em um aumento da incidência de acidente vascular cerebral e tromboembolismo. Este estudo também evidenciou que a TRH à base de estrogênio tem efeitos negativos sobre as mulheres na pós-menopausa, incluindo um aumento significativo na incidência de câncer da mama, doenças cardíacas, embolia pulmonar e demência vascular (ROSSOUW *et al.*, 2002).

Após a divulgação desses dados, a utilização da TRH caiu drasticamente em todo o mundo e muitas pacientes abandonaram a terapia hormonal. Ademais, existem pacientes que apresentam contraindicação ao seu uso (a exemplo de câncer hormônio-dependente) e outras opções alternativas estão disponíveis, como as plantas medicinais. No contexto da síndrome climatérica, o uso de plantas medicinais com efeito estrogênico (fitoestrógenos) tem sido uma prática comum (SCHULZ e TYLER, 2002).

Os fitoestrógenos são polifenóis naturais, utilizados como alternativa à terapia com estrogênio/progesterona (MAHMUD, 2010). Eles são semelhantes em estrutura química ao estrogênio de mamífero e, de forma semelhante a este, precisam ligar-se ao receptor de estrógeno para iniciarem a transcrição (NIKOV *et al.*, 2000; YEARLEY *et al.*, 2007).

A preferência crescente pelos fitoestrógenos é justificada pelos benefícios evidenciados por estudos que sugerem, não apenas a diminuição da incidência dos sintomas climatéricos, mas uma redução do risco de câncer de mama. Os fitoestrógenos não apenas inibem as células de câncer de mama positivas para receptor estrógeno, mas também as negativas (COXAM, 2008; MESSINA, 2008; HSIEH *et al.*, 2018).

A *Morus nigra* L., conhecida como amoreira preta, é uma espécie pertencente ao gênero *Morus*, família Moraceae. Esta planta pode ser encontrada em todo o Brasil e é bem conhecida pela população pelas suas propriedades medicinais. Os frutos, folhas, cascas e as raízes são usados como laxante, sedativo, expectorante, emoliente, calmante, diurético, agente hipoglicemiante, antisséptico, anti-inflamatória e antioxidante (ERCISLI e ORHAN, 2007; PADILHA *et al.*, 2010).

Este gênero contém uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonas, isoflavonas, isoprenilados, estilbenos, cumarinas, cromonas e xantonas (NOMURA, 1988; NOMURA e HANO, 1994). Esses compostos exibem propriedades biológicas interessantes tais como efeito anti-inflamatório, diurético, hipotensor e atuam como fitoestrógenos (SYAH *et al.*, 2000).

No Brasil, o chá de folhas de amora é largamente empregado na medicina popular como repositor hormonal durante o climatério, objetivando o alívio dos sintomas, principalmente dos fogachos. Os resultados obtidos por uma pesquisa etnofarmacológica confirmaram que a utilização de *Morus nigra* L. foi eficaz para o tratamento de sintomas do climatério (MIRANDA *et al.*, 2010).

A análise das três principais espécies de amoras, *M. alba*, *M. rubra* e *M. nigra*, demonstrou que a amoreira preta apresenta maior conteúdo fenólico e flavonoídico que as demais. Quanto aos estudos experimentais, alguns têm relatado o possível potencial estrogênico de *M. nigra* em ratas Wistar ooforectomizadas (SILVA *et al.*, 2003; ERCISLI e ORHAN, 2008). Outros autores observaram prevenção da atrofia vaginal e uterina, além da melhora do perfil lipídico em ratas submetidas ao tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. (CASTRO *et al.*, 2010).

A avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas desta planta em ratas Wistar demonstrou que a administração subcrônica não produziu mortes, nem sinais de toxicidade nos animais. Somado a isto, não houve alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados, o que permite ter uma noção de parâmetros de segurança, possibilitando o avanço para a realização de estudos clínicos que comprovem os benefícios terapêuticos da planta (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Embora alguns fitoestrógenos possam amenizar os sintomas climatéricos e contribuir positivamente para a qualidade de vida, não há evidência científica que permita a substituição da terapia de reposição hormonal e ainda são escassos estudos que investiguem o efeito estrogênico da *Morus nigra* L. (VIEIRA *et al.*, 2007). Nesse contexto, este estudo objetiva comparar a eficácia do extrato de folhas de *Morus nigra* L. no tratamento de sintomas climatéricos, com a TRH e um grupo controle (placebo).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Climatério

O Climatério e a menopausa são dois termos utilizados para nomear eventos clínicos relacionados ao declínio da função ovariana. Na literatura e em contextos clínicos é comum a expressão "sintomas da menopausa" ou "sintomas climatéricos", sendo que o termo menopausa é muito mais utilizado. É importante esclarecer que a menopausa refere-se a um evento específico, à cessação da menstruação; enquanto o climatério refere-se a mudanças graduais da função ovariana, que iniciam antes da menopausa e continuam por um determinado período (BLUMEL *et al.*, 2014).

A expressão Menopausa foi criada pelo médico francês Charles de Gardanne no século XIX, usando as palavras gregas: *mens* (mensalmente) e *pausus* (cessação), referindo-se à cessação do sangramento vaginal mensal consequente da descamação fisiológica do endométrio. A Sociedade Internacional da Menopausa (International Menopause Society) define a menopausa como a cessação permanente da menstruação resultante da perda da atividade folicular ovariana, seguida por 12 meses consecutivos de amenorreia, para a qual não há outra causa patológica (IMS, 2018).

O termo climatério vem do grego *klimater* e significa período de mudanças. Era utilizado no século XIX para descrever certas fases da vida do homem e da mulher, nas quais, acreditava-se passar por mudanças radicais (STOLBERG, 2007). A Sociedade Internacional da Menopausa define como uma fase do envelhecimento da mulher que marca a transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva (IMS, 2018).

2.1.1 Fisiologia do Climatério

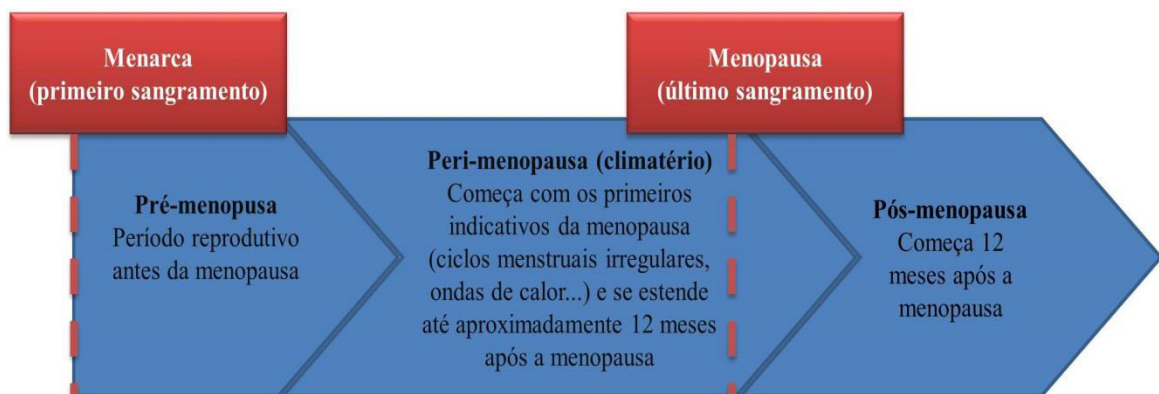
Na fisiologia normal da mulher, o eixo reprodutivo feminino é o único que atinge um estado senescente, enquanto outros órgãos do corpo são geralmente saudáveis. O Climatério consiste em um período fisiológico amplo, caracterizado pelo declínio da atividade ovariana e consequente declínio da fertilidade. Há uma heterogeneidade quanto à sua duração, o que causa certa confusão quanto às terminologias usadas para este período (SILVA, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO), o ciclo fértil da mulher pode ser dividido nas seguintes etapas: pré-menopausa, peri-menopausa

e pós-menopausa (WHO, 1996) (Figura 1). A pré-menopausa é iniciada com a menarca, ou seja, com a primeira menstruação da mulher. Na adolescência, a mulher possui uma reserva de aproximadamente 400.000 folículos ovarianos. Esse número reduz gradualmente a uma taxa de 1000 folículos.mês⁻¹ durante o seu ciclo fértil até a extinção completa (PERHEENTUPA e HUHTANIEMI, 2009).

Próximo aos 35 anos há uma redução na qualidade dos folículos, acarretando em uma menor maturação e queda da fertilidade. Geralmente, a partir dos 40 anos começam a aparecer os indícios do fim da pré-menopausa e início do climatério, também chamado de peri-menopausa. Nesta fase o ciclo menstrual torna-se irregular e os folículos encontram-se com a qualidade muito comprometida e com uma taxa muito baixa de maturação dos ovócitos, extinguindo-se completamente à época da menopausa. O último sangramento pode ocorrer entre 40 e 60 anos, sendo mais comum após os 50 anos. Em seguida, dá-se início à pós-menopausa, doze meses após a menopausa (TRELOAR, 1981; PRIOR, 1998) (Figura 1).

Figura 1. Representação do ciclo fértil da mulher, segundo a Organização Mundial de Saúde. Extraído de WHO (1996).



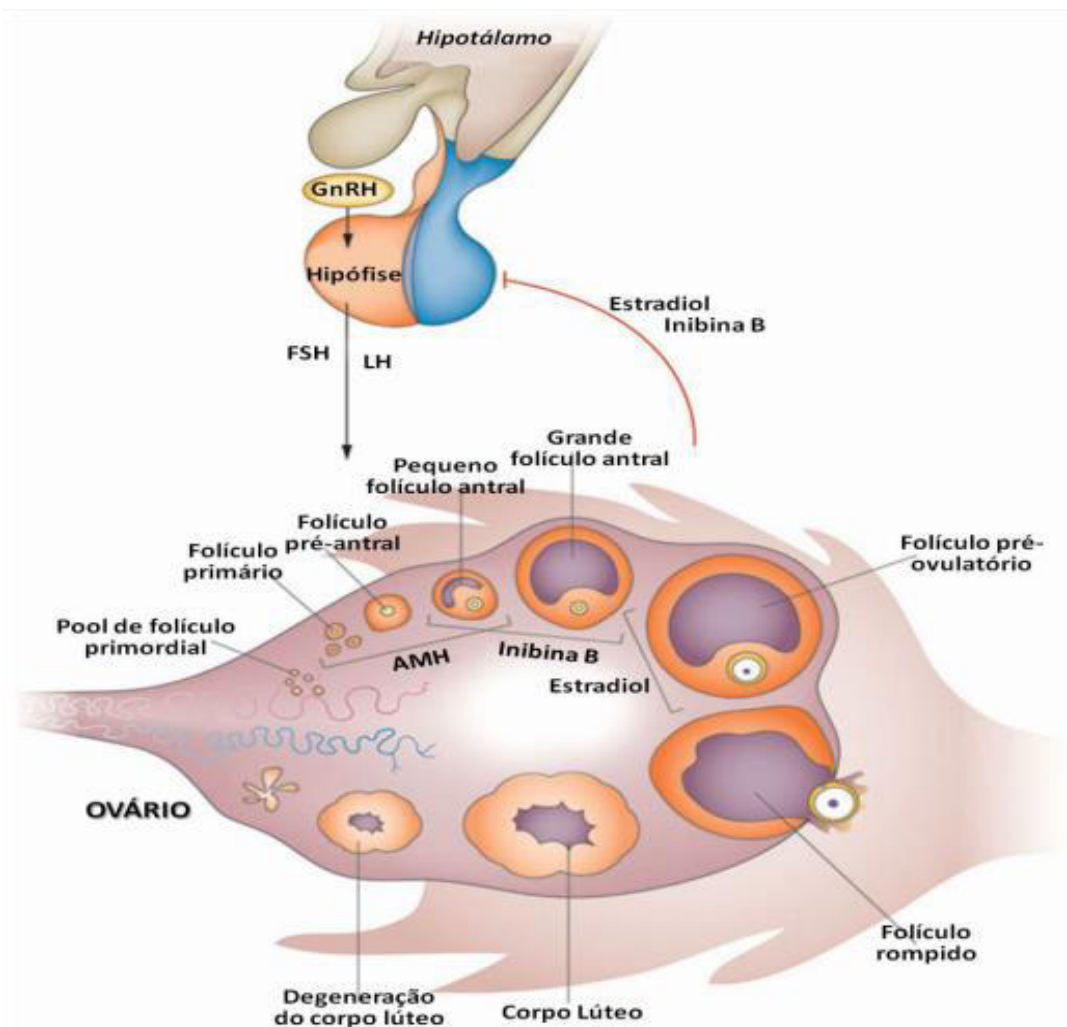
As alterações hormonais do ciclo reprodutivo feminino são controladas pelo eixo hipotálamo - hipófise - ovário. Na pré-menopausa, o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é produzido pelos neurônios do hipotálamo e secretado na hipófise. Uma vez interagindo com os receptores desta glândula, o GnRH promove a liberação das gonadotrofinas: o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Estes, por sua vez, são transportados para os ovários, onde exercem funções importantes no ciclo reprodutivo (BRUCE e RYMER, 2009).

Dois tipos principais de células ovarianas interagem com as gonadotrofinas: tecal e granulosa. O LH liga-se aos receptores das células tecais e ativam a síntese da

androstenediona. Em paralelo, o FSH interage com os receptores das células da granulosa e promovem a ativação do metabolismo do androgênio, por meio da aromatização do anel A, sendo convertido em 17- β -estradiol (E2). Além disso, o FSH regula o desenvolvimento dos folículos ovarianos (BRUCE e RYMER, 2009).

Após o processo de maturação, os folículos rompem-se, liberando o ovócito e transformando-se no corpo lúteo, uma glândula endócrina que libera a progesterona e as inibinas A e B. A liberação de todos esses hormônios promovem o *feedback* negativo ao hipotálamo e à hipófise, reduzindo a liberação de FSH e LH (HALL, 2004) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo feminino. Extraído de VISSER *et al.* (2012).



Todavia, na transição para o climatério, a redução do desenvolvimento dos folículos acarreta na diminuição da atividade ovariana e da quantidade liberada de progesterona,

estradiol, inibinas A e B. Em consequência, o *feedback* negativo do FSH e LH na hipófise fica comprometido e a concentração desses hormônios no sangue aumenta (HALL, 2004).

O nível de FSH começa a aumentar gradualmente 7 anos antes da menopausa e o estradiol diminui marcadamente 2 anos. Ambos os hormônios continuam suas tendências, para cima e para baixo, respectivamente, por mais 2 anos após a menopausa (AHMED EBBIARY *et al.*, 1994). Durante a pós-menopausa, ocorre uma maior estimulação da hipófise, levando a um aumento na produção do GnRH, que acaba por bloquear os receptores na hipófise, inibindo gradualmente a produção de LH e FSH (HALL, 2004).

Em 2001, foi criado um sistema de estadiamento clínico com o objetivo de tornar possível uma melhor identificação do estágio em que a mulher se encontra no seu processo de envelhecimento reprodutivo, baseado em seus padrões de sangramento. O Sistema STRAW (Stages of Reproductive Agind Workshop) aborda 7 estágios, usando o último período menstrual como ponto de referência, caracterizando as mudanças nos padrões do ciclo menstrual e as variações do FSH (SOULES *et al.*, 2001) (Figura 3).

Figura 3. Sistema de estadiamento do envelhecimento reprodutivo feminino (STRAW – Stages of Reproductive Aging Workshop). Extraído de BUTLER e SANTORO (2011).

**Última menstruação
(UM)**

0

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

Os estágios variam entre -5 e 2. No estágio inicial da fase reprodutiva (-5), o ciclo menstrual é variável a regular e o FSH está numa concentração normal. Na fase de pico reprodutivo (-4), o ciclo é regular e o FSH permanece normal, enquanto na fase -3, final do período reprodutivo, observa-se uma elevação do FSH, indicando bioquimicamente o declínio da reserva ovariana (SOULES *et al.*, 2001).

A transição da menopausa inicia quando a mulher apresenta uma mudança no seu intervalo interciclo maior que 7 dias. Na transição precoce (-2), a amenorria é intermitente e relativamente pouco frequente. A fase tardia (-1) caracteriza-se por ausência de pelo menos dois ciclos e, pelo menos, 60 dias de amenorria (SOULES *et al.*, 2001).

A pós-menopausa também se divide em fase precoce (1) e tardia (2). A fase inicial compreende o primeiro ano de amenorria (a) e os próximos quatro anos (b), sendo marcada pelo declínio significativo dos hormônios ovarianos, com flutuações intermitentes. A fase 2 inicia-se após esses cinco anos de amenorria e continua até o fim da vida da mulher. O FSH permanece elevado durante a pós-menopausa, mas eventualmente pode diminuir após um longo período de tempo (SOULES *et al.*, 2001).

2.1.2 Sintomas do Climatério

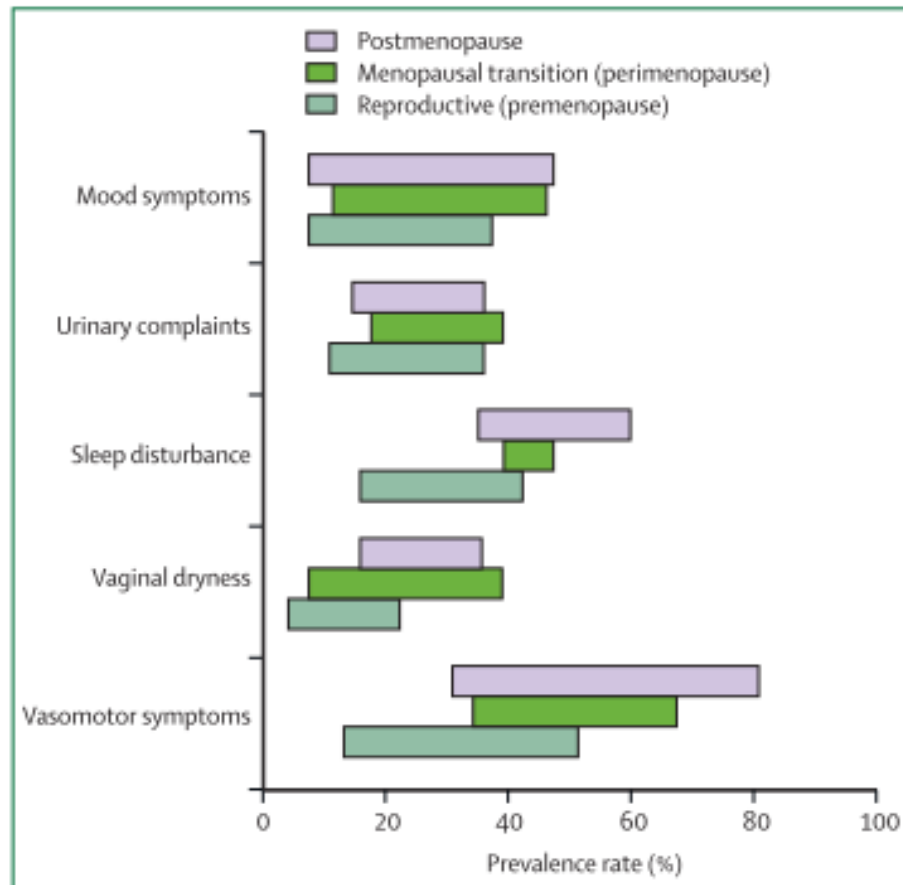
A flutuação dos níveis de estrogênio leva ao surgimento de alguns sintomas característicos do climatério. Uma estimativa de 75 a 85% de mulheres experimentam alguns ou todos os sintomas desse período (APPLING *et al.*, 2007). Um inquérito domiciliar realizado em São Luís revelou que 77,8% das mulheres climatéricas apresentavam sintomas, principalmente as ondas de calor (fogachos) e sudorese intensa (MALHEIROS *et al.*, 2014). Os sintomas característicos do climatério podem ser classificados da seguinte forma:

- Físicos: alterações urogenitais, osteoporose e alterações vasomotoras (ondas de calor, sudorese profusa e calafrios) (MELBY, 2007; HUNTER e CHILCOT, 2013; BULCHANDANI e TOOZS-HOBSON, 2014; CRANDALL *et al.*, 2015);
- Somáticos: enxaquecas, tonturas, fadigas e insônia (PARK e VIIRRE, 2010; LUCCHESI *et al.*, 2013);
- Psicológicos: irritabilidade, queda da libido, tendência à depressão e alterações de humor (WOODS *et al.*, 2010; WEBER *et al.*, 2014).

A presença desses sintomas variados deve-se às grandes concentrações de receptores estrógenos distribuídos principalmente pelo hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo e medula, regiões diretamente relacionadas com o controle cognitivo, de humor e

termorregulatório (MORRISON *et al.*, 2006). A prevalência desses sintomas modifica-se segundo a fase do envelhecimento reprodutivo feminino (NELSON, 2008) (Figura 4).

Figura 4. Prevalência das taxas dos sintomas climatéricos segundo a fase do envelhecimento reprodutivo feminino. Extraído de NELSON (2008).



Os sintomas vasomotores afetam cerca de 80% das mulheres (ARCHER *et al.*, 2011). As ondas de calor ou fogachos consistem em sensações intensas e rápidas de calor, acompanhadas de enrubescimento e aumento do fluxo sanguíneo na pele. Duram entre 1 e 5 minutos, podendo se estender até 60 minutos e geralmente são seguidos de calafrios (DEECHER, 2005).

As mulheres que experimentam ondas de calor apresentam maiores riscos de depressão, estresse, disfunção sexual e ansiedade (BLUMEL *et al.*, 2004). O mecanismo que explica os sintomas vasomotores ainda é mal compreendido, mas supõe-se que reflete distúrbios do sistema termorregulador hipotalâmico (ROBERTS e HICKEY, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o estradiol é um neuromodulador dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico. Acredita-se que os neurotransmissores serotonina

e norepinefrina participem da regulação da temperatura corpórea, além da manutenção do humor (SHANAFELT *et al.*, 2002). Quando a concentração de estradiol que chega ao hipotálamo está abaixo do normal, a quantidade liberada de norepinefrina aumenta e a de serotonina diminui, havendo um desequilíbrio entre a ativação dos seus receptores e a recaptura pelo neurônio pré-sináptico. Com isso, há o aumento da temperatura corporal, seguida de uma posterior vasodilatação para dissipar o calor, acarretando em sudorese excessiva (TEMEL *et al.*, 2002; FREEDMAN, 2005).

Ao contrário das ondas de calor que se resolvem espontaneamente com o tempo, os sintomas relacionados à atrofia vaginal e ao trato urinário inferior são frequentemente progressivos e, por isso, requerem tratamento. A secura vaginal causa ardor, coceira e dispareunia, comprometendo muitas vezes a atividade sexual (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2005).

Um número significativo de estudos transversais e prospectivos tem investigado a associação entre os estágios da menopausa e os riscos para sintomas depressivos ou transtorno depressivo maior. Os dados dos estudos seccionais indicaram que os sintomas depressivos podem ser intensificados em até 70% nas mulheres durante a perimenopausa, em comparação com aproximadamente 30% durante a pré-menopausa (BROMBERGER e KRAVITZ, 2011).

Estudos longitudinais também sugeriram um risco aumentado (1,5 vezes até 3,0 vezes) para sintomas depressivos durante a transição da menopausa e esse risco foi identificado até mesmo entre as mulheres sem episódios anteriores. Por fim, estudos de coorte documentaram um risco aumentado de depressão clínica (2 vezes ou 4 vezes maior) durante a transição da menopausa e os primeiros anos pós-menopausa (FREEMAN *et al.*, 2006; BROMBERGER *et al.*, 2015).

Ansiedade e problemas no sono são frequentemente identificados como fatores contribuintes para o aumento da morbidade psiquiátrica em mulheres de meia idade. Alguns pesquisadores questionam se os problemas no sono nesta faixa etária consistem em uma condição primária ou uma expressão de um problema subjacente, a exemplo dos sintomas vasomotores ou até mesmo da depressão (SOARES, 2017).

KRAVITZ *et al.* (2008) investigaram a possível interação entre as mudanças na menopausa e o sono. Neste estudo identificaram uma associação entre as alterações nos padrões de sangramento durante a transição da menopausa e a emergência de distúrbios do sono. Outros pesquisadores indicaram que as mulheres que vivenciam a depressão e sintomas vasomotores são propensas a ter uma qualidade de sono deficiente (JOFFE *et al.*, 2009; JOFFE *et al.*, 2010).

Em relação às mudanças no estado de humor, a distribuição ampla dos receptores de estrogênio no cérebro e a atividade estrogênica já conhecida no córtex pré-frontal e hipocampo enfatizam a ação deste hormônio sobre o humor (MCEWEN e ALVES, 1999; DEECHER *et al.*, 2008). A administração de estrogênio limita a atividade das monoaminoxidases (MAO-A e MAO-B), que são enzimas envolvidas na degradação da serotonina, resultando no aumento de sua síntese e disponibilidade (GUNDLAH *et al.*, 2002).

Além disso, os estrogênios aumentam a densidade do receptor de serotonina nas regiões cerebrais contendo receptores de estrogênio (BIEGON *et al.*, 1983; CYR *et al.*, 1998; MOSES-KOLKO *et al.*, 2008; NELSON, 2008). De forma geral, os efeitos deste hormônio sobre a serotonina e noradrenalina podem ser caracterizados como benéficos para o humor, o que enfatiza as alterações de humor durante a menopausa decorrentes da diminuição na produção do estrogênio (RUBINOW *et al.*, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (2016), existem algumas alterações não transitórias relacionadas ao climatério. O metabolismo lipídico é alterado neste período, sendo comum haver aumento das frações de LDL, triglicerídeos e redução do HDL. Há mudanças no metabolismo ósseo, com alterações na massa e arquitetura ósseas mais evidentes nas regiões da coluna e do colo do fêmur, porém estas mudanças são influenciadas por fatores genéticos, composição corporal, estilo de vida, hábitos (como tabagismo e sedentarismo) e comorbidades. Ocorre, ainda, uma modificação no padrão de distribuição de gordura corporal, com tendência ao acúmulo de gordura na região abdominal (padrão androide) (BRASIL, 2016).

2.2 Terapia de Reposição Hormonal

A TRH foi estabelecida como padrão-ouro para o tratamento dos sintomas climatéricos e permanece como o tratamento mais eficaz para os sintomas vasomotores e geniturinários (NAMS, 2017). Em 1970, a prevalência estimada de uso da TRH nos Estados Unidos correspondia a 0,2%. Esta prevalência começou a elevar-se no início de 1980 e depois triplicou no final dos anos 90. Porém, o uso da TRH diminuiu significativamente após a publicação de alguns ensaios clínicos, que demonstraram efeitos maléficos dessa terapia (SPRAGUE *et al.*, 2012).

Dados mais recentes do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) relatam uma prevalência aproximada do uso de TRH, entre mulheres com idade

igual ou superior a 40 anos, de 22,4% em 2000 (SPRAGUE *et al.*, 2012). No Brasil, a prevalência de uso da TRH entre 749 mulheres climatéricas correspondeu a 19,5%. Neste estudo, o período da menopausa, a menopausa cirúrgica, a interrupção do trabalho devido a ondas de calor e o conhecimento sobre a menopausa foram associados ao uso da TRH (PACELLO *et al.*, 2018).

A TRH consiste em três tipos: baseada em estrogênio isolado, combinação de estrogênio com progesterona e baseada em androgênio. A terapia com estrogênio (estradiol) foi inicialmente utilizada para o manejo dos sintomas climatéricos, apresentando como principais vantagens a amenização dos fogachos e da atrofia vulvovaginal (JUDD *et al.*, 1981). Posteriormente, surgiu a terapia baseada em hormônios bioidênticos, a exemplo do estriol, que demonstrou um risco cardiovascular inferior mesmo em uma concentração 10 vezes maior que o estradiol (CURCIO *et al.*, 2006).

Em 1975, evidenciou-se que o uso do estradiol isolado acarretava em proliferação endometrial, que poderia levar ao câncer uterino. Observou-se que o uso contínuo desse hormônio, mesmo em baixas dosagens, pode levar ao desenvolvimento de tromboembolia e potencializar o crescimento de outros tumores hormônio-dependentes, como o câncer de mama e de ovário (RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

Já em 1980, observou-se que o risco de câncer uterino poderia ser reduzido se um progestágeno fosse associado à terapia (WHITEHEAD e FRASER; WENTZ, 1974). Sendo assim, o uso de estrogênio isolado atualmente é recomendado para pacientes histerectomizadas e o uso associado a progestágeno para aquelas com útero, a fim de prevenir hiperplasia endometrial e câncer (PINES, 2010; NAMS, 2012).

Os progestágenos são compostos com atividade progestativa, incluem não apenas o progestágeno natural (progesterona), mas toda a variedade de progestágenos sintéticos (NAMS, 2003). Eles têm a capacidade de mudar a mucosa uterina da fase proliferativa para a fase secretória. Seus efeitos dependem da dosagem e da fase do ciclo menstrual em que são administrados (WILLIAMS *et al.*, 2007).

Os progestágenos têm diferentes ações no tecido mamário (LAMBRINOUDAKI, 2014). O levonorgestrel e a noretisterona estimulam os genes associados à carcinogênese e angiogênese mamária, além de aumentar a síntese intramamária de estradiol pela ação da sulfatase. Alguns progestágenos geram um aumento, também intramamário, do fator de crescimento semelhante à insulina Tipo 1 (IGF-1), que é um mitógeno potente (NEVES *et al.*, 2015).

O uso de androgênios, principalmente testosterona, é empregado geralmente para o aumento da libido. Porém o uso contínuo e prolongado de androgênios por mulheres é desaconselhado, pela possibilidade de levar a um quadro de hirsutismo (BRAUNSTEIN, 2007a; b).

Uma vez que houve redução do câncer de endométrio com a introdução dos progestágenos, mas sua combinação com o estradiol potencializou o risco para câncer de mama, a WHI começou a investigar sobre o uso da TRH na incidência deste câncer e o risco de desenvolver outras comorbidades (ROSSOUW *et al.*, 2002; LAMBRINOUDAKI, 2014).

Em 1993, a WHI iniciou dois ensaios clínicos com mulheres pós-menopausadas, com idade entre 50 e 79 anos. Um dos estudos foi composto por 16.608 mulheres que utilizaram TRH baseada na combinação de estrogênio e progestina durante 5 a 6 anos, o outro estudo avaliou 10.739 mulheres, que haviam sido hysterectomizadas (exérese do útero) e, portanto, utilizaram apenas estrogênio por 7 anos. No primeiro grupo, a combinação dos hormônios estimulou o crescimento dos tumores de mama, e, mais seriamente, mascarou o diagnóstico precoce dos mesmos, levando à detecção somente quando já se encontravam em metástase. No segundo grupo, o uso do hormônio isolado praticamente não estimulou o crescimento de tumores, porém aumentou o risco para acidente vascular cerebral (ROSSOUW *et al.*, 2004).

Após a divulgação desses resultados, as agências regulatórias passaram a recomendar o uso por um tempo reduzido de doses ultrabaixas da combinação de hormônios ou mesmo do estradiol isolado. Essas baixíssimas dosagens têm-se mostrado eficientes em relação ao alívio das ondas de calor, sem potencializar o risco de câncer, tanto de endométrio, quanto de mama (SIMON e MAAMARI, 2013; STUTE *et al.*, 2015).

A principal indicação para o tratamento dos sintomas climatéricos, principalmente vasomotores, é quando estes se apresentam de forma moderada a intensa, causando distúrbios no sono, dificuldade de concentração e subsequente redução da qualidade de vida (NAMS, 2012). A TRH sistêmica é uma opção aceitável para mulheres relativamente jovens e saudáveis, com idade inferior a 60 anos, com até 10 anos de menopausa e que estão incomodadas com os sintomas de forma moderada a grave (NAMS, 2017). O tratamento clínico é influenciado pela intensidade do incômodo, portanto, pela forma como cada mulher lida com os sintomas, já que os fatores psicológicos e sociais variam substancialmente entre as mulheres (AYERS *et al.*, 2010).

Em relação à síndrome geniturinária da menopausa, que inclui ressecamento, queimação, irritação genital, urgência urinária, disúria e infecções urinárias de repetição, a terapia estrogênica é o tratamento mais eficaz. As preparações vaginais de estrogênio em

baixas doses são eficazes e seguras, incluem cremes, comprimidos e anéis contendo estradiol ou estrogênio equino conjugado, disponível em doses que resultam em absorção sistêmica mínima (NAPPI e DAVIS, 2012; RAHN *et al.*, 2014; LETHABY *et al.*, 2016).

A dosagem da TRH deve começar com uma quantidade mínima, visando reduzir os possíveis efeitos colaterais. A exposição mínima ao estrogênio reduz o risco de tromboembolismo, mastalgia e sangramento inesperado. Considera-se que o uso da TRH por curto prazo, inferior a 5 anos, representa a melhor relação risco benefício para a maioria das mulheres. O término da TRH pode ser individualizado, sempre considerando que só deve ser continuado enquanto a mulher sentir que os benefícios superam os riscos, além de observar as contraindicações (NEVES *et al.*, 2015).

O Ministério da Saúde (MS) divulgou suas recomendações para o tratamento da menopausa em protocolos para a atenção básica. Neste guia, a abordagem farmacológica não hormonal é indicada para mulheres com sintomas vasomotores proeminentes, sem melhora com terapias não farmacológicas. As opções terapêuticas seriam: antidepressivos (paroxetina ou fluoxetina ou imipramina), clonidina, metildopa, propranolol, cinarizina ou gabapentina (BRASIL, 2016).

O MS também recomenda que a TRH só deve ser indicada em situações particulares, com decisão compartilhada com a mulher, quando os sintomas transitórios do climatério não alcançarem controle adequado com terapias não medicamentosas ou não hormonais e houver prejuízo importante da qualidade de vida dela devido a tais sintomas. As opções de prescrição são descritas da seguinte forma (BRASIL, 2016):

- Estrogênio conjugado 0,3-0,625 mg;
- Estradiol oral 1-2 mg;
- Estradiol transdérmico 25-50 mcg;
- Estradiol percutâneo 0,5-1,5 mg.

Em mulheres com útero, é mandatória a associação com progestágeno:

- Medroxiprogesterona 2,5 mg;
- Noretindrona 0,1 mg;
- Noretisterona 0,1 mg;
- Drospirenona 0,25 mg;
- Progesterona micronizada 100-200 mg.

O tratamento pode ser realizado de forma cíclica (12 a 14 dias por ciclo, esquema em que a mulher tem sangramentos vaginais) ou contínua por via oral (esquema em que há ausência de sangramentos vaginais). Para o tratamento tópico, tem-se o estrogênio conjugado

tópico vaginal (0,625 mg/g) e o estriol tópico vaginal (1 mg/g). A tibolona (1,25-2,5 mg/dia) também pode ser indicada, por ser um esteroide sintético que se comporta em nível uterino como uma terapia hormonal combinada contínua, porém sem efeito estimulante no tecido mamário (BRASIL, 2016).

As contraindicações para o uso da TRH consistem em sangramento vaginal inexplicado, doença hepática ativa, câncer de mama anterior, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, história pessoal de doença tromboembólica ou risco hereditário alto conhecido. Há um consenso de que a TRH não deve ser iniciada em mulheres com idade superior a 60 anos e não deve ser utilizada para a prevenção de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e diabetes (LETHABY *et al.*, 2008; NAMS, 2017).

Nos últimos anos, o uso da TRH tem caído drasticamente, os profissionais diminuíram a prescrição desta terapia e muitas mulheres têm buscado por terapias alternativas (AUSTIN *et al.*, 2003; LAWTON *et al.*, 2003; HASKELL, 2004). Um estudo brasileiro sobre a conduta de ginecologistas em relação à TRH, após 3 anos da divulgação da WHI, relatou que 23,1% dos ginecologistas pararam de prescrever estrogênios, 25,2% pararam de prescrever acetato de medroxiprogesterona, 63,7% diminuíram a dose de TRH, e 46,3% começaram a prescrever isoflavonas e outros medicamentos naturais (LAZAR *et al.*, 2007).

2.3 Terapia Alternativa: Fitoestrógenos

Desde as antigas civilizações, os seres humanos usam plantas como ferramentas terapêuticas. No século XVIII, surgiu a Farmacognosia (pharmakon = fármaco e gnose = conhecimento), ciência que estuda a composição originária das plantas, sua identificação e extração, com a finalidade de analisar suas características físico-químicas, e propriedades fármaco-toxicológicas (BRUNETON, 1993). Em 1873, foi encontrado o papiro de Ebers, que corresponde ao tratado mais antigo da medicina egípcia, datado de 1600 aC, cujo conteúdo comprova o uso de plantas para propósitos terapêuticos (HALLMANN-MIKOLAJCZAK, 2004).

No Brasil, houve alguns marcos decisivos para a introdução do uso de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde, citam-se a Portaria 971/2006 e o Decreto 5.813/2006, que regulamentaram a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRUNING *et al.*, 2012). A inserção da fitoterapia nos serviços de atenção primária da saúde brasileira estimulou a interação entre

usuários e profissionais de saúde e contribuiu para socialização da pesquisa científica e desenvolvimento da visão crítica sobre o uso adequado de plantas medicinais e fitoterápicos (ANTONIO *et al.*, 2014).

Entre os diversos fitoterápicos, existem os fitoestrógenos (FE), que são considerados uma alternativa popular à terapia com estrogênio/progesterona (MAHMUD, 2010). A atividade estrogênica das plantas foi descrita no século XIX, na década de 20. Nos anos 40, a diminuição da fertilidade induzida em ovelhas pela ingestão de trevos de pastagens, na Austrália, despertou a atenção para a importância biológica e econômica dos FE (MURKIES *et al.*, 1998).

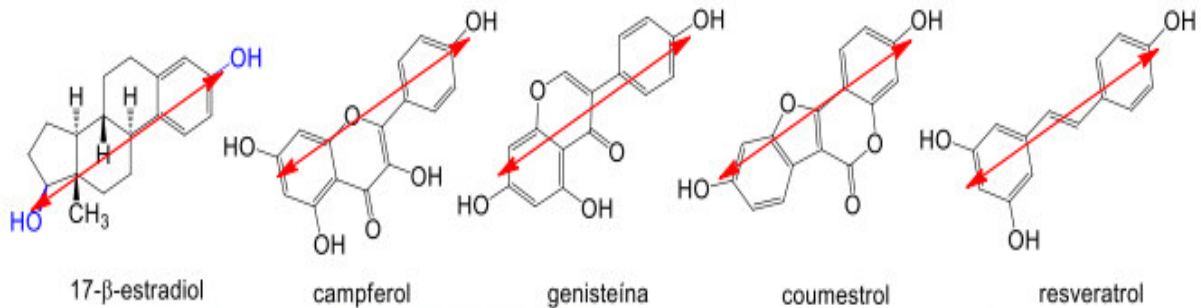
Os FE são polifenóis naturais, elencados em classes distintas: flavonóis (quercetina, campferol), flavonas (apigenina), flavanonas (naringenina), cumarinas, chalconas, estilbenos (resveratrol), isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina, biochanina A), coumestanos (coumestrol) e lignanas (enterodiol e enterolactona) (LIGGINS *et al.*, 2000; DIXON, 2004).

As isoflavonas são os FEs mais comuns, presentes em produtos como soja, ervilha verde, lentilha, feijão e amoras. Os lignanos estão presentes em diversas plantas, como constituintes da parede celular. São encontrados em oleaginosas, nos grãos integrais, legumes, vegetais e sementes, principalmente no linho (THOMPSON *et al.*, 1991). Tanto as isoflavonas quanto os lignanos são armazenados em plantas predominantemente como glicosídeos em vacúolos (ADLERCREUTZ, 2007).

Os coumestanos e estilbenos são menos abundantes na dieta (DIXON, 2004). O coumestrol é um coumestano encontrado em trevos e brotos de alfafa e, em concentrações menores, no feijão e sementes de girassol, entre outras fontes. O resveratrol é o estilbeno mais estudado, estando presente em uvas, amendoim e amoras (FRANKE *et al.*, 1995; JACOB *et al.*, 2001; WALLE, 2011).

Os FE apresentam conformação espacial e polaridade semelhante ao estradiol. Para ser considerado um FE, a molécula precisa ter as hidroxilas do grupo fenólico com uma distância o mais próximo possível daquela entre a hidroxila do grupo fenólico na posição 3 e a hidroxila do álcool na posição 17, do esqueleto esteroide da molécula do 17 β -estradiol. Caso não haja uma hidroxila em alguma dessas posições, mas a densidade eletrônica da molécula nessas regiões for semelhante à do estradiol, também se pode considerar um FE (POLUZZI *et al.*, 2014) (FIGURA 5).

Figura 5. Análise comparativa das distâncias entre a hidroxila dos grupos fenólicos nas moléculas dos principais fitoestrógenos e a distância entre hidroxila do grupo fenólico na posição 3 e a hidroxila do álcool na posição 17 na molécula do 17 β -estradiol.
Extraído de POLUZZI *et al.* (2014).



Em relação aos receptores estrogênicos (RE), existem dois tipos: α e β . Os RE- α são os principais receptores encontrados na mama e no útero, e os RE- β encontram-se no sistema cardiovascular e nos ossos (NAMS, 2000). A propriedade estrogênica ou antiestrogênica dos FE depende do órgão alvo específico envolvido na interação com os RE, além da concentração dos mesmos e dos próprios esteroides endógenos. Alguns FE induzem uma transcrição gênica RE-mediada pela interação com ambos os receptores em níveis superiores ao estradiol (HARRIS *et al.*, 2005; VAN DER WOUDE *et al.*, 2005). Apesar da baixa afinidade dos FE pelo RE- α comparada ao estradiol, muitos apresentam uma afinidade ao RE- β substancialmente superior (YOUNES e HONMA, 2011; RIETJENS *et al.*, 2013; PATERNI *et al.*, 2014).

Os FE destacam-se cada vez mais como tratamento para a Síndrome Climatérica apesar de não serem tão potentes como o estradiol, porque estudos demonstraram que, além de diminuir a intensidade e a frequência dos fogachos, de melhorar a atrofia vaginal e a qualidade do sono, estes fitoterápicos não provocaram hiperplasia do endométrio, não aumentaram o risco para câncer de mama, minimizaram a incidência de doenças cardiovasculares e de tromboembolia (ZHANG *et al.*, 2007; GENCEL *et al.*, 2012; BEDELL *et al.*, 2014).

A afinidade superior dos FE ao RE- β está relacionada a esse efeito protetor para câncer de mama. O RE- β parece estar associado a um efeito antiproliferativo e anticarcinogênico, enquanto o RE- α está relacionado à promoção da carcinogênese (PATERNI *et al.*, 2014; RIETJENS *et al.*, 2017). Alguns autores afirmam que o RE- β funciona como um possível supressor tumoral, uma vez que poderia controlar a proliferação

induzida pelo RE- α , efeito que pode estar ausente em muitos cânceres de mama (CHEN *et al.*, 2011; CHU *et al.*, 2011; CIOTTA *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm investigado sobre os efeitos não RE-mediados dos FE em linhagens celulares de câncer de mama, a exemplo da MC-7 e MDA – MB – 231. Esses efeitos incluem a apoptose, indução da parada do ciclo celular e autofagia das células de câncer de mama (HSIEH *et al.*, 2018) (Quadro 1).

Quadro 1. Ação dos principais fitoestrógenos em células de câncer de mama. Extraído de HSIEH *et al.* (2018).

| Fitoestrógeno | Classificação | Linhagem celular /RE | | Parada do ciclo celular | Apoptose | Autofagia |
|---------------|---------------|----------------------|-----|-------------------------|----------|-----------|
| Daidzeína | Isoflavona | MCF-7 | ER+ | | ✓ | |
| | | MCF-7/MDA-MB-231 | ER+ | G1 & G2/M | | |
| Genisteína | Isoflavona | MCF-7 | ER+ | | ✓ | ✓ |
| | | MCF-7 | ER+ | | ✓ | |
| | | MDA-MB-231 | ER- | G2/M | ✓ | |
| Equol | Isoflavona | MCF-7 | ER+ | | ✓ | |
| | | MDA-MB-231 | ER- | | ✓ | |
| | | MDA-MB-453 | ER- | G1/S ,G2/M | ✓ | |
| Formononetina | Isoflavona | MCF-7 | ER+ | G0/G1 | ✓ | |
| Calicosina | Isoflavona | MCF-7 | ER+ | | ✓ | |
| Arctigenina | Lignano | MDA-MB-231 | ER- | | ✓ | |
| Wedelolactona | Coumestano | MDA-MB-231 | ER- | S& G2/M | | |
| Resveratrol | Estilbeno | MCF-7 | ER+ | | ✓ | |
| | | MDA-MB-231 | ER- | | ✓ | |

Em relação ao tecido endometrial, alguns autores demonstraram que o coumestrol, genisteína e daidzeína aumentaram a produção do complemento C3 em células de adenocarcinoma endometrial no rato. Outro estudo evidenciou um aumento da atividade da fosfatase alcalina em cultura de células semelhantes. Tanto a produção de C3 como a atividade da fosfatase alcalina são efeitos conhecidos de estimulação estrogênica (MARKIEWICZ *et al.*, 1993; HALE *et al.*, 2002).

Os FE também atuam sobre o sistema cardiovascular. A soja, rica em isoflavonas, apresenta um efeito protetor para doença cardiovascular, ao diminuir o colesterol total e LDL. O mecanismo pelo qual a soja produz este efeito vai além da ação no receptor estrogênico. Existe a hipótese do aumento da degradação e depuração de colesterol através do aumento de secreção biliar, inibição da síntese de colesterol endógeno, up-regulation do receptor de colesterol, com aumento da expressão do RNAm para o receptor de LDL em células

mononucleares e aumento da função tireoidiana (POTTER *et al.*, 1998; GLAZIER e BOWMAN, 2001).

Além disso, a soja diminui a pressão arterial em mulheres na pós-menopausa e atua retardando o processo de aterosclerose, prevenindo o desenvolvimento de doenças cardíacas. A genisteína, por sua vez, demonstra uma cardioproteção farmacológica após uma condição pós-isquêmica, ao ativar o RE PI3K/Akt e preservar a função mitocondrial (SONG *et al.*, 2007; TISSIER *et al.*, 2007; CARLSON *et al.*, 2008).

O efeito dos FE na atenuação dos fogachos não foi totalmente elucidado. Todavia, alguns estudos sugerem que as isoflavonas podem amenizar os sintomas vasomotores, após identificarem que os episódios de fogachos e suores noturnos foram menos frequentes e mais fracos entre as mulheres que consumiam esse composto (BOLANOS-DIAZ *et al.*, 2011; JENKS *et al.*, 2012; TAKU *et al.*, 2012).

A presença de receptores de estrogênio localizados na bexiga, vagina e no assoalho pélvico, bem como a influência do estrogênio no metabolismo e biossíntese do tecido conjuntivo, tem estimulado a realização de estudos sobre o uso de moduladores seletivos do receptor de estrogênio como possível tratamento para a incontinência urinária (IU) por estresse. Um estudo *in vitro* realizado na Polônia demonstrou que tanto o estradiol quanto a daidzeína aumentaram a proliferação de fibroblastos da fáscia pubocervical em mulheres na perimenopausa com IU por estresse. Os autores concluíram que estes resultados apoiam o uso local de estrogênio ou FE como uma tentativa de fortalecer o tecido conjuntivo periuretral no tratamento da IU por estresse feminina (TOMASZEWSKI *et al.*, 2003).

GRATZKE *et al.* (2008) realizaram um estudo com macacas cynomolgus ovariectomizadas e comprovaram que o tratamento crônico com fitoestrógeno (32 meses) hipertrofiou o músculo detrusor da bexiga e aumentou a resposta contrátil da uretra proximal ao carbacol e a estimulação do campo elétrico. A dieta rica em fitoestrógeno resultou em uma área mucosa mais espessa de todos os três segmentos da uretra em comparação com o grupo controle. Outros autores utilizaram os dados do NHANES e relataram que as concentrações crescentes de lignanas urinárias foram associadas a uma menor probabilidade de incontinência urinária de urgência em mulheres na pós-menopausa (KREYDIN *et al.*, 2015).

Um estudo específico sobre a associação do uso de FE e prolapso de órgão pélvico foi realizado com mulheres na pós-menopausa, que possuíam estágio II a IV de prolapso, divididas em dois grupos, que foram tratados com FE ou com placebo por 30 dias. No final do tratamento, as mulheres que receberam o FE tiveram uma melhora significativa dos sintomas relacionados ao prolapso. Após a cirurgia para correção, realizou-se análise

imunohistoquímica, que evidenciou aumento significativo da elastina e colágeno I/III no grupo tratado com FE (JIANG *et al.*, 2017).

As alterações da pele frequentes no climatério também podem ser amenizadas com o uso desses fitoterápicos. Durante essa fase, a pele torna-se mais ressecada, mais fina e sem elasticidade, devido ao hipoestrogenismo, como pela exposição ao sol. As ações das isoflavonas parecem ser benéficas através de sua ação antioxidante, reduzindo os radicais livres e inibindo os danos provocados pelos raios ultravioletas (CAI e WEI, 1996; WEI, 1998).

Alguns autores afirmam que a acentuada perda de massa óssea que ocorre nesse período pode ser reduzida pelo consumo de FE. Segundo esses autores, as mulheres japonesas têm menor risco de sofrerem fraturas de quadril que mulheres brancas, esse fato deve-se não apenas a fatores como estatura, exercícios físicos, mas também ao tipo de dieta rica em FE e cálcio (BOULET *et al.*, 1994). Outras evidências indiretas dos potenciais efeitos benéficos dos FE em relação ao metabolismo ósseo derivam de alguns estudos com a ipriflavona (7-isopropoxi-isoflavona), um derivado sintético não hormonal produzido comercialmente da daidzeína, que demonstrou eficácia em reduzir a perda da massa óssea (MELIS *et al.*, 1992).

De forma geral, diversas plantas já são frequentemente utilizadas por mulheres para o alívio dos sintomas do climatério. Os principais FE utilizados com essa finalidade são Soja (*Glycine max* L.), Cohosh preto (*Cimicifuga racemosa*), Lúpulo (*Humulus lupulus* L.), Inhame (*Dioscorea villosa* L.), Ginseng (*Panax ginseng*), Dong quai (*Angelica sinensis*), Erva de São João (*Hypericum perforatum* L.), Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e Valeriana (*Valeriana officinalis*) (GELLER e STUDEE, 2005; BORRELLI e ERNST, 2010) .

O MS recomenda o uso da Soja, Trevo vermelho (*Trifolium pratense*), Cimicífuga, Erva de São, Valeriana e Melissa (*Melissa officinalis*) (BRASIL, 2016). Porém, observa-se na prática clínica que a *Morus nigra* L. está sendo cada vez mais utilizada e difundida entre as mulheres climatéricas.

2.4 *Morus nigra* Linnaeus

Após a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto Nº 5.813/2006), o MS divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), constituída por setenta e uma plantas medicinais indicadas para o uso terapêutico da população (BRASIL, 2012). A *Morus* sp faz parte da RENISUS por apresentar potencial

em derivar medicamentos e estes, por sua vez, serem distribuídos à população pelo SUS (ROSA *et al.*, 2016).

A *Morus nigra* L. pertence ao gênero *Morus*, da família Moraceae, ordem Rosales, foi classificada morfológicamente pela primeira vez por Lineu em 1753 (LINNAEI, 1753; NATURALIS BIODIVERSITY CENTER (2017) (QUADRO 2) .

Quadro 2. Sistemática botânica de *Morus nigra* L. Extraído de: Naturalis Biodiversity Center, 2017.

| | |
|------------|--|
| Reino | Plantae |
| Filo | Tracheophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordem | Rosales |
| Família | Moraceae |
| Gênero | <i>Morus</i> |
| Espécie | <i>Morus nigra</i> L. |
| Nome comum | Amora, amora preta, black mullberry (inglês) |

Existem 24 espécies de *Morus* e uma subespécie, com pelo menos 100 variedades conhecidas (PADILHA *et al.*, 2010). Em geral, são cultivados três tipos principais de amoreira para a produção de frutos, incluindo a amoreira branca (*Morus alba*), vermelha (*Morus rubra*) e preta (*Morus nigra*) (KAMILOGLU *et al.*, 2013). Estas espécies podem ser encontradas entre regiões de clima temperado e subtropical no hemisfério norte até os trópicos do hemisfério sul e crescem em variadas condições climáticas e topográficas (ARAUJO *et al.*, 2015).

A amoreira preta é a espécie de amora com o maior número de cromossomos (HE *et al.*, 2013). É originária do Iran, sendo uma das espécies mais importantes cultivadas nos países mediterrânicos (ERCISLI e ORHAN, 2007; KAMILOGLU *et al.*, 2013). Foi trazida para o Brasil por imigrantes japoneses, adaptando-se bem às condições de clima e solo (SOUZA *et al.*, 2015).

É uma árvore caducifólia, geralmente dioica, de 3-5 m de altura, com tronco revestido por casca fina, de cor acinzentada. Seus ramos são relativamente horizontais, com as extremidades pendentes, formando uma copa achatada. Folhas simples, glabras em ambas as faces, de 6-12 cm de comprimento, com as margens variavelmente lobadas em exemplares jovens e apenas serreadas em plantas adultas, com nervação saliente e face superior luzidia. Suas inflorescências são formadas entre julho e agosto, são pequenas, esverdeadas, sésseis ou curtopediceladas. Seus frutos são múltiplos, cilíndricos, de superfície tuberculada,

inicialmente vermelhos e pretos quando maduros, de polpa carnosa e sabor agridoce (LORENZI, 2003; MRKVICKA, 2010; PADILHA *et al.*, 2010) (Figura 6).

Figura 6. Folhas e frutos da espécie *Morus nigra* L. Extraído de MRKVICKA (2010).



A amoreira preta contém uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, estilbenos, cumarinas, estilbenos, cromonas, antocianinas e xantonas (NOMURA, 1988; NOMURA e HANO, 1994). Seus frutos, folhas, cascas e as raízes são usados como laxante, sedativo, expectorante, emoliente, calmante, diurético, agente hipoglicemiante, antisséptico, anti-inflamatória e antioxidante (ERCISLI e ORHAN, 2007; PADILHA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2017).

2.4.1 Principais efeitos dos frutos da *Morus nigra* L.

A análise dos flavonoides totais (FT) nos frutos dos três tipos principais de amoreiras evidenciou que o FT na *Morus nigra* L. é maior do que na *Morus alba* e *Morus rubra* (ERCISLI e ORHAN, 2007). CHEN *et al.* (2017) também observaram que os frutos da *Morus*

nigra L. são ricos em flavonoides, enquanto os frutos das demais amoreiras tem quantidades inferiores. Em relação à pesquisa dos tipos de flavonoides, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) dos frutos da *Morus nigra* L. identificou a presença de rutina, murina e quercetina (AKHLAQ *et al.*, 2016).

CHEN *et al.* (2017) investigaram, ainda, o efeito dos flavonóis da *Morus nigra* L. sob as duas fases do mecanismo de dor: a fase de dor neurogênica e a fase de dor inflamatória. A segunda fase foi significativamente mais curta no grupo da *Morus nigra* L. do que no grupo controle. Os autores também estudaram os mecanismo de efeitos antinociceptivos dos flavonóis de algumas plantas da espécie *Morus* sp e mediram os níveis de uma citocina inflamatória (IL-6) e uma citocina anti-inflamatória (IL-10). O nível de IL-6 no soro foi significativamente reduzido pelos flavonoides de todas as plantas e apenas os flavonoides da *Morus nigra* L. aumentaram significativamente o nível sérico de IL-10 em comparação com o grupo controle. Em relação à expressão de proteínas relacionadas à inflamação, a expressão dos produtos fosforilados diminuiu significativamente nos grupos tratados com flavonoides, especialmente no grupo da *Morus nigra* L. (CHEN *et al.*, 2017).

Semelhante a este estudo, pesquisas anteriores mostraram que os flavonoides da *Morus nigra* L. regularam o processo inflamatório, principalmente afetando as vias do NO e NF- κ B, que regula a expressão de IL-6 (MATSUI *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2015). Outro estudo também confirmou que o FT da amora preta possui uma atividade antioxidante, além da anti-inflamatória (CHEN *et al.*, 2016). Estes flavonoides tiveram uma potência de redução e eliminação maior do OH- e radical ABTS que a vitamina C, sugerindo que seus flavonoides têm boa atividade antioxidante e podem ter efeitos potenciais na saúde humana (CHEN *et al.*, 2016).

NADERI *et al.* (2004) demonstraram que diferentes extratos dos frutos da amoreira preta, como o suco, extratos hidroalcolico e polifenólico apresentam ação protetora contra danos oxidativos, por meio da inibição da glicosilação da hemoglobina, da hemólise de eritrócitos induzida por peróxidos de hidrogênio, do dano à membrana do hepatócito e da oxidação do LDL *in vitro*.

O estudo da citotoxicidade do FT nos frutos da amoreira preta revelou que não foi citotóxico em concentrações relevantes. Esses achados sugerem que seus frutos são uma fonte valiosa de flavonoides e um antioxidante natural sem efeitos colaterais tóxicos. Assim, os frutos podem ser um tratamento alternativo para doenças inflamatórias e nociceptivas (CHEN *et al.*, 2016).

2.4.2 Principais efeitos das folhas da *Morus nigra* L.

Os efeitos benéficos para a saúde da *Morus nigra* L. não são limitados apenas aos seus frutos, suas folhas também apresentam amplas propriedades biológicas. Os valores de FT nas folhas de *Morus nigra* L. também são superiores aos da *Morus alba* (SÁNCHEZ-SALCEDO et al., 2015). Como nos frutos, os flavonoides identificados nos extratos de folhas hidrolisadas foram quercetina, rutina e campferol (TALLINI et al., 2015; ZENI et al., 2017).

Além desses compostos, os ácidos fenólicos, gálico e clorogênico foram encontrados no extrato de suas folhas. Acredita-se que a quercetina, ácido gálico e clorogênico estão envolvidos na maior capacidade antioxidante encontrada na infusão e extratos hidrometanólicos das folhas da planta. As quantidades de ácido clorogênico e quercetina nas folhas de *Morus nigra* L. podem contribuir para o efeito hipolipidêmico encontrado em seus resultados (ZENI et al., 2017).

VOLPATO et al. (2005) observaram o efeito antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* L. em ratos diabéticos, por meio da redução do malonaldeído, produto final da peroxidação lipídica; além de identificarem a diminuição das concentrações dos triglicerídeos, colesterol e da fração VLDL.

Outro estudo também verificou a atividade antinociceptiva do extrato de etanol das folhas de *Morus nigra* L., com efeito central e periférico, semelhante ao efeito de seus frutos. O extrato das folhas produziu uma inibição significativa de ambas as fases do teste de formalina e o efeito foi mais significativo na segunda fase (dor inflamatória) (SOUZA et al., 2015). A folha da amora preta demonstrou efeitos anti-inflamatórios pela redução do edema de pata induzido por carragenina em um estudo experimental e inibiu significativamente a formação de tecido granulomatoso nos ratos (PADILHA et al., 2010).

Considerando a toxicidade aguda do extrato etanólico bruto, observou-se que o extrato das folhas pode ser considerado de baixa toxicidade, porque não causou a morte ou alteração dos testes de parâmetros bioquímicos e hematológicos em animais, após a administração das doses (ALMEIDA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

DALMAGRO et al. (2017) demonstraram que o extrato da amora preta ou o ácido siríngico, o principal composto fenólico identificado nas folhas, são capazes de modular o stress oxidativo no hipocampo e córtex cerebral de camundongos, proporcionando um efeito antidepressivo.

Outros resultados mostraram que as folhas de *Morus nigra* L. têm potencial para melhorar os déficits cognitivos em camundongos e que podem ser útil para suprimir o

envelhecimento, devido à sua atividade eliminatória de radicais livres e alta capacidade antioxidante. O extrato das folhas de *Morus nigra* L. melhorou significativamente os déficits de aprendizado e aumentou a retenção de memória (TURGUT *et al.*, 2016).

O uso específico de *Morus nigra* L., seja dos frutos ou folhas, nos sintomas da menopausa é escasso na literatura. Observa-se que há diversos estudos nos quais são identificados metabólitos secundários nas espécies do gênero *Morus*, porém poucos são direcionados para a identificação de FE (BERGO e FORIM, 2015).

Um estudo experimental sobre o extrato hidroalcoólico de folhas de *Morus nigra* L. revelou efeitos importantes em ratas ovariectomizadas. Este extrato hidroalcoólico induziu uma modificação significativa das amostras cervicais das ratas ovariectomizadas, indicando um prolongamento das fases proestro e estro, apesar do baixo nível de estradiol (SILVA, 2012). Outras plantas que contêm isoflavonas também induziram uma fase estro prolongada do epitélio vaginal em ratas ovariectomizadas (CIRCOSTA *et al.*, 2006; OCCHIUTO *et al.*, 2007).

Além disso, a administração de *Morus nigra* L. impediu significativamente a atrofia do epitélio vaginal e causou uma vacuolação da célula, o que implicou em um aumento do conteúdo de mucopolissacarídeos (SILVA, 2012). Em relação à toxicidade, a dose utilizada neste estudo não alterou os parâmetros bioquímicos do fígado e do rim. Um procedimento de teste de toxicidade aguda mostrou que a dose de 2g/kg de peso corporal foi considerada como o teste limite (AKBULUT e OZCAN, 2009).

DE QUEIROZ *et al.* (2012), por sua vez, analisaram o efeito estrogênico da amoreira preta sobre o sistema reprodutivo e o desenvolvimento embrionário de ratas Wistar. Segundo esses autores, os dados obtidos indicaram que a planta não exibiu nenhuma atividade estrogênica, porém não exerceu efeito tóxico sobre o sistema reprodutor feminino e sobre o desenvolvimento embrionário dos ratos.

Em relação ao uso em seres humanos, os resultados obtidos por uma pesquisa etnofarmacológica confirmaram que o uso de *Morus nigra* L. foi efetivo para o tratamento de sintomas climatéricos, com um consenso considerável de uso popular (maior que 50%) e poderia constituir um potencial medicamento natural para estudos químicos e farmacológicos, especialmente como fonte de substâncias com atividade estrogênica (MIRANDA. *et al.*, 2010).

2.4.3 Outros efeitos da *Morus nigra* L.

Estudos fitoquímicos sobre a *Morus nigra* L. demonstraram a presença de outros minerais, vitaminas (β -carotenos, tiamina, riboflavina, niacina, biotina e ácido ascórbico), polissacarídeos (1-desoxinojiramicina, ramnose e ácido galacturônico), esteróis (β -sitosterol, terpenoides e sesquiterpenos), ácido linoleico e alcaloides (morroles e mulbaines) (ERCISLI e ORHAN, 2007; AKBULUT e OZCAN, 2009; SONG *et al.*, 2009; IQBAL *et al.*, 2012; CALIN-SANCHEZ *et al.*, 2013).

Demonstrou-se que vários fitoquímicos isolados da *Morus nigra* L. possuem atividades antibacterianas, antitrombóticas, antivirais, antifúngicas, anti-hiperuricêmicas, antiaterogênicas, antidiabéticas e anticancerígenas (FUKAI *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; HE e LU, 2013). Vários estudos também mostraram que a amoreira preta possui propriedades cardioprotetora, hepatoprotetora, neuroprotetora, vasomoduladora, imunomoduladora e nefroprotetora (KWON *et al.*, 2005; NS *et al.*, 2012; FARZAEI *et al.*, 2013; QADIR *et al.*, 2014; PAINULY *et al.*, 2015).

O tratamento com o extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. reduziu a hiperglicemia, melhorou a tolerância oral à glicose e minimizou a dislipidemia e o estresse oxidativo, levando a uma redução no índice aterogênico em ratos diabéticos induzidos por aloxana (JUNIOR *et al.*, 2017). As folhas das amoreiras são consumidas na Coréia e no Japão como alimentos anti-hiperglicêmicos para pacientes com diabetes mellitus, uma vez que as folhas são ricas em componentes alcalóides, incluindo 1-desoxinojiramicina, que é conhecida por ser uma das inibidoras mais potentes da α -glicosidas, diminuindo os níveis de açúcar no sangue (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Um estudo clínico randomizado demonstrou que o consumo diário de suco de amoreira preta apresenta potencial para melhorar os níveis de HDL colesterol, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína B e PCR ultrasensível em pacientes com dislipidemia, melhorando o risco cardiovascular desses indivíduos (AGHABABAEI *et al.*, 2015).

Outro estudo experimental teve como objetivo avaliar alterações bioquímicas e histopatológicas em rins de ratos diabéticos após tratamento com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L.. O dano glomerular foi menor no grupo tratado com o extrato da amoreira preta quando comparado ao grupo controle, afirmando que seu uso pode auxiliar na prevenção do dano do tecido renal em pacientes diabéticos (RAHIMI-MADISEH *et al.*, 2017).

O extrato bruto dos frutos de *Morus nigra* L. possui atividades procinéticas e laxantes, possivelmente mediadas através da estimulação de receptores muscarínicos e tem uma atividade antidiarreica, possivelmente através de uma combinação de bloqueio do canal Ca^{2+} e efeitos anticolinérgicos (AKHLAQ *et al.*, 2016).

QADIR *et al.* (2014) investigaram o efeito citotóxico de *Morus nigra* L. em células de câncer e concluíram que suas folhas possuem atividade anticancerígena contra a linhagem de câncer cervical (HeLa).

Foi demonstrado que o extrato de folha de *Morus nigra* L. tem potencial como um agente natural de branqueamento contra a hiperpigmentação da pele, por inibição da tirosinase. O efeito citotóxico não foi observado em melanomas murinos, queratinócitos humanos e fibroblastos de ratos (DE FREITAS *et al.*, 2016).

MASCARELLO *et al.* (2018) descreveram adutos adicionais do tipo Diels-Alder isolados da casca de *Morus nigra* L., que inibiram a proteína tirosina fosfatase B (PtpB) do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em concentrações submicromolares. No teste de sobrevivência do Mtb dentro dos macrófagos, um dos adutos mostrou inibição do crescimento em 61,3%. Esses resultados apontaram para a relevância da *Morus nigra* L. como inibidora da PtpB e como candidata terapêutica para a tuberculose.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar a eficácia do extrato de folhas de *Morus nigra* L. no tratamento de sintomas climatéricos, com a TRH e um grupo controle (placebo).

3.2 Específicos

- Avaliar o perfil sócio-demográfico e clínico das mulheres climatéricas tratadas com o extrato de folhas de *Morus nigra* L., TRH e placebo;
- Comparar os Índices de Blatt-Kuppermam e Domínios do questionário Short-Form Health Survey - 36 após o tratamento de mulheres climatéricas tratadas com extrato de folhas de *Morus nigra* L., TRH e placebo;
- Identificar a presença de efeitos adversos com o tratamento de extrato de folhas de *Morus nigra* L., TRH e placebo;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato de folhas de *Morus nigra* L., TRH e placebo nos parâmetros da colpocitologia oncótica (padrão celular e microbiologia) e colposcopia;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato de folhas de *Morus nigra* L., TRH e placebo em parâmetros bioquímicos e hormonais.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Estudo Clínico, randomizado, paralelo, duplo-cego, de não inferioridade, destinado a estabelecer que um novo tratamento não é menos eficaz que um tratamento padrão.

4.2 Período e Local do estudo

A pesquisa foi executada no período de novembro de 2016 a março de 2018. A coleta dos dados referente aos questionários de qualidade de vida e sintomas climatéricos, bem como a coleta da colpocitologia oncótica foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Clínica do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). A coleta dos exames bioquímicos foi realizada no Centro de Pesquisa Clínica da UFMA e analisados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra. Os exames de imagem foram realizados na clínica Médica Imagem, por uma mesma profissional.

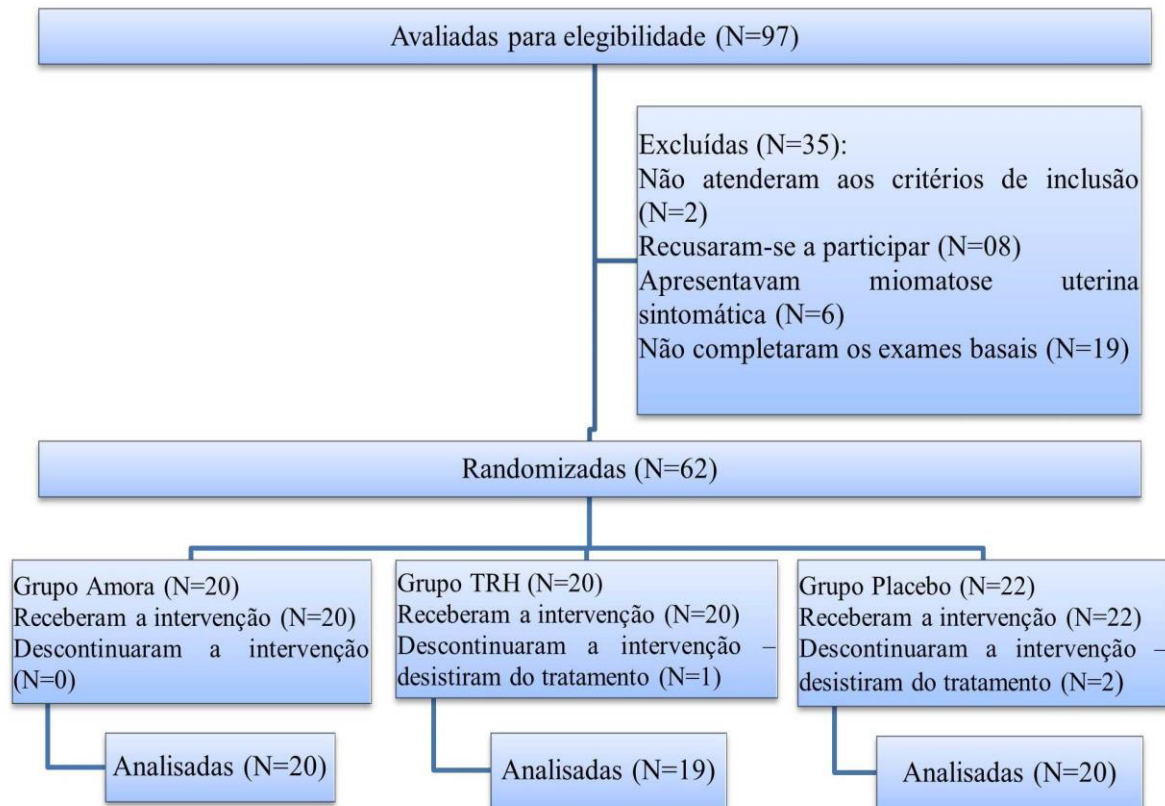
4.3 Amostra

Inicialmente, foram avaliadas 97 mulheres do ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário Unidade Materno-Infantil e do Laboratório de Pesquisa Clínica do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, ambos da Universidade Federal do Maranhão. Destas mulheres, foram excluídas 35: 02 mulheres não atenderam aos critérios de inclusão, 08 recusaram-se em participar da pesquisa, 06 apresentavam miomatose uterina sintomática e 19 não completaram os exames basais. Foram randomizadas 62 mulheres e alocadas em três grupos: grupo Amora (N=20), grupo controle positivo – TRH (N=20) e grupo controle negativo – Placebo (N=22)

Todas as participantes receberam a intervenção específica e foram acompanhadas por um período de 2 meses. No grupo amora, todas finalizaram o tratamento e completaram o *follow-up*. No grupo TRH, houve 01 desistência do tratamento, por queixa de *spotting* (sangramento vaginal) permanecendo 19 que completaram o *follow-up*. No grupo placebo, 02

mulheres desistiram do tratamento, sem queixa específica, totalizando 20 para o *follow-up* (Figura 7).

Figura 7. Fluxograma do progresso das fases do ensaio clínico. São Luís, 2018.



4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas na pesquisa mulheres com idade entre 35 e 65 anos, que apresentavam algum sintoma climatérico avaliado pelo Índice de Blatt-Kupperman - IBK (ondas de calor, parestesia, insônia, nervosismo, depressão, fadiga, artralgia/mialgia, cefaleia, palpitação, zumbido no ouvido). Foram excluídas mulheres com insuficiência hepática, história pregressa ou familiar de câncer de mama, ovário e endométrio, portadoras de porfiria, sangramento endometrial anormal, trombose venosa profunda e doença arterial coronariana.

4.4 Cálculo do tamanho amostral

Por tratar-se de um estudo em que ainda não se conhece a tolerabilidade à droga, não foi realizado cálculo amostral. Optou-se por uma amostra pequena, inicialmente estimada em 90 mulheres.

4.5 Instrumentos de coleta e avaliação de dados

As mulheres que atenderam aos critérios de inclusão e que concordaram em participar da pesquisa foram submetidas a uma entrevista estruturada, para obtenção de informações sociodemográficas e comportamentais. Em seguida, foram submetidas à avaliação dos sintomas climatéricos, qualidade de vida e avaliação clínica.

A intensidade dos sintomas relacionados ao Climatério foi calculada pelo IBK (ANEXO A). A cada um dos sintomas (ondas de calor, parestesia, insônia, nervosismo, depressão, fadiga, artralgia/mialgia, cefaleia, palpitação, zumbido no ouvido) foram atribuídas diferentes pontuações segundo a sua intensidade. Os escores totais foram classificados em leves (valores até 19), moderados (entre 20 e 35) ou intensos (maior que 35). Assim, quanto maior a pontuação obtida, mais intensa é a sintomatologia climatérica (KUPPERMAN *et al.*, 1953).

A qualidade de vida foi avaliada pelo Questionário de Qualidade de Vida SF – 36 (Short-Form Health Survey) (ANEXO B). Este instrumento de qualidade de vida multidimensional foi desenvolvido em 1992 por Ware e Sherbourne e validado no Brasil por Ciconelli *et al.* (1999). A avaliação dos resultados foi feita mediante a atribuição de escores para cada questão, que compuseram oito domínios (capacidade funcional, aspectos físicos, dor, estado geral de saúde, vitalidade, aspectos sociais, aspectos emocionais e saúde mental), os quais foram transformados numa escala de zero a 100, onde zero correspondeu a uma pior qualidade de vida e 100 a uma melhor qualidade de vida (CICONELLI *et al.*, 1999).

A colpocitologia foi executada por meio da inserção do espécuro (estéril e descartável) no canal vaginal para a coleta do material cervical. Para o esfregaço da ectocérvice, foi utilizada a espátula de Ayre e da endocérvice, a escovinha. A execução dos esfregaços deu-se com movimentos uniformes, contínuos e retilíneos, na mesma lâmina, no sentido vertical e horizontal, respectivamente. Em seguida, o material foi fixado imediatamente com citospray.

Os exames de imagem consistiram em exame ultrassonográfico transvaginal, na intenção de avaliar alterações na espessura da camada endometrial; exame ultrassonográfico das mamas e mamografia, para avaliar possíveis alterações no tecido mamário. Nenhuma participante apresentou alteração mamária ou pélvica que contraindicasse os tratamentos. Na

avaliação da ultrassonografia mamária e mamografia, a maioria dos achados foi normal, com classificação BI-RADS I, que requer seguimento anual (44,1%, 59,3%, respectivamente) (MD SAÚDE, 2017). Em relação à avaliação ultrassonográfica transvaginal, a maioria não apresentou anormalidades (49,1%). A alteração patológica mais frequente foi a miomatose uterina (22%), porém assintomática (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos exames de imagem basais das mulheres climatéricas. São Luís, 2018.

| EXAMES DE IMAGEM | n | % |
|--------------------------------------|----------|----------|
| Ultrassonografia das mamas | | |
| Bi-rads I | 26 | 44,1 |
| Bi-rads II | 21 | 35,6 |
| Bi-rads III | 12 | 20,3 |
| Mamografia | | |
| Bi-rads I | 35 | 59,3 |
| Bi-rads II | 19 | 32,2 |
| Bi-rads III | 5 | 8,5 |
| Ultrassonografia transvaginal | | |
| Sem anormalidades | 29 | 49,1 |
| Status pós-histerectomia | 3 | 5,1 |
| Miomatose uterina | 13 | 22,0 |
| Pólipo endometrial | 3 | 5,1 |
| Nódulo endometrial | 1 | 1,7 |
| Cisto ovariano homogêneo | 5 | 8,5 |
| Cisto ovariano heterogêneo | 4 | 6,8 |
| Aumento ovariano inespecífico | 1 | 1,7 |

Foram realizadas coletas de amostras de sangue para os seguintes exames bioquímicos (valor de referência): glicemia de jejum (60 a 99 mg/dL), HDL-colesterol (maior que 60 mg/dL), LDL-colesterol (menor que 100 mg/dL), triglicerídeos (menor que 150 mg/dL), colesterol total (menor que 200 mg/dL), AST (6 a 46 U/L), ALT (6 a 49 U/L), ureia (15 a 50 mg/dL), creatinina (0,4 a 1,4 mg/dL), ácido úrico (1,5 a 6,0 mg/dL), fosfatase alcalina (35 a 130 U/L), proteína C Reativa (PCR) ultrasensível (menor que 0,5 mg/dL), estradiol (menopausa: menor que 5 a 54,7), FSH (menopausa: 25,8 a 134,8), TSH (0,27 a 4,2 μ UI/mL) e T4 livre (12 a 22 pmol/L).

Os questionários IBK e SF 36 foram aplicados antes e após o tratamento. Todos os exames foram realizados nesses dois momentos, exceto os exames de imagem, que foram realizados apenas na avaliação basal.

4.6 Processamento e tratamento estatístico

4.6.1 Implementação e cegamento

Realizou-se uma alocação randomizada simples para as 62 participantes, por meio de uma lista de números randômicos criados pelo programa Excel 2007. As participantes foram enumeradas de 1 a 62, para cada uma foi gerado um valor aleatório entre 0 e 1, a partir da função “ALEATÓRIO” e, em seguida, foram reorganizadas segundo a ordem crescente dos valores. A alocação para cada grupo foi determinada por meio da identificação como grupo A, B e C, sequencialmente. O grupo A correspondeu ao grupo tratado com Amora, o grupo B foi tratado com a TRH e o grupo C recebeu o tratamento Placebo.

O estudo foi duplo-cego (pacientes e pesquisadores). As pílulas da TRH e as cápsulas da amora e placebo foram armazenadas em frascos semelhantes, com uma identificação reconhecida apenas pelo responsável pela distribuição. A reavaliação das pacientes foi realizada sem o conhecimento do tipo de tratamento recebido. A análise estatística também ocorreu de forma cega.

4.6.2 Tratamento dos grupos

Para o grupo Amora, foi desenvolvida uma cápsula contendo o pó das folhas obtidas da *Morus nigra* L., aprovada segundo certificado de análise (ANEXO C), na concentração de 250 mg, em uma Farmácia de Manipulação da Cidade de São Luis-MA. Segundo a recomendação farmacêutica da empresa, a dose comercializada corresponde a 750mg/dia, porém optou-se por utilizar nesta pesquisa apenas 250 mg/dia, por 60 dias.

Para o grupo controle positivo, foi utilizada a pílula de estradiol 1mg para as mulheres histerectomizadas, na dose de 01 pílula/dia. Já para as não histerectomizadas, foi utilizada a pílula combinada de estradiol 1mg e acetato de noretisterona 0,5mg. A dose utilizada de ambas foi 01 pílula/dia, por 56 dias. Estas pílulas foram doadas pela empresa LIBBS, sua produção é aprovada pela Anvisa.

Para o grupo controle negativo foi utilizada uma cápsula de placebo à base de talco farmacêutico, na concentração de 250mg, confeccionada pela mesma farmácia de manipulação. A dose utilizada foi de 250mg/dia, por 60 dias.

Durante a reavaliação das participantes após o término do tratamento, foram recebidos os frascos para contagem das pílulas e cápsulas, a fim de averiguar a adesão.

4.6.3 Análise dos dados

Os dados foram analisados usando o software SPSS 25.0 (Chicago, USA, SPSS Inc.). A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparar a diferença entre as medianas das variáveis em cada time-point (T0: basal e T1: após 2 meses de tratamento) entre os 3 grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Na comparação das medianas das variáveis numéricas de cada grupo de tratamento entre T0 e T1, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Para verificar a associação do desfecho (melhora do sintoma) com outras variáveis analisadas, foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson e calculado o risco relativo (RR) não ajustado com seus respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%. Para comparar as frequências das variáveis referentes à colposcopia e colpocitologia entre T0 e T1, em cada grupo experimental, foi utilizado o teste de McNemar ou McNemar-Bowker. Na análise dos exames bioquímicos entre T0 e T1, foi utilizado o Teste T Pareado. Foi adotado um nível de significância de 5% para todas as análises. Foi adotada análise por intenção por tratar (ITT).

4.7 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, segundo o Parecer 1.804.512 (ANEXO D) e publicado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC), sob o número de registro RBR-9t4xxk.

A coleta de dados foi iniciada somente após anuência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), conforme a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 466/2012 e suas complementares. As mulheres que preencherem os critérios para seleção da amostra receberam informações sobre a finalidade do estudo, benefícios, bem como sobre os possíveis riscos.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), segundo Termo de outorga (ANEXO E), por meio do edital 40/2014, Processo UNIVERSAL - 00832/15.

5 RESULTADOS

Para caracterizarmos nossa amostra, na Tabela 2 descrevemos as características sociodemográficas e clínicas das mulheres climatéricas. Os grupos foram semelhantes quanto à maioria dessas variáveis. As médias de idade do grupo Amora, TRH e Placebo corresponderam a $50,1 \pm 7,7$; $49,7 \pm 4,8$ e $46,9 \pm 5,4$, respectivamente. As mulheres caracterizaram-se como pardas (55%, 73,7%, 65%, respectivamente), com ensino médio completo (60%, 31,6%, 35%, respectivamente), auxiliar de serviços gerais (15%, 26,3%, 30%, respectivamente), renda familiar mensal de 1 salário mínimo (45%, 47,4%, 60%, respectivamente), negaram etilismo (40%, 47,3%, 55%, respectivamente), negaram tabagismo (65%, 84,2%, 80%, respectivamente), negaram a prática de atividade física regular (50%, 57,9%, 75%, respectivamente), não eram histerectomizadas (75%, 89,5%, 80%, respectivamente).

Os grupos diferiram apenas quanto ao estado civil, comorbidades e ocorrência da menopausa. No grupo Amora, metade era casada e a outra metade solteira, a maioria era hipertensa (45%) e menopausada (55%). No grupo TRH, por sua vez, a maioria era casada (47,3%), sem comorbidades (52,6%) e menopausada (57,9%). Por último, no grupo Placebo, a maior parte era solteira (40%), sem comorbidades (60%) e não era menopausada (60%) (Tabela 2).

Tabela 2. Características sociodemográficas e clínicas das mulheres climatéricas segundo o grupo de tratamento. São Luís, 2018.

| Variável | Grupo | | | | | |
|---------------------------|-----------------|------|----------------|------|-------------------|------|
| | Amora (N=20) | | TRH (N=19) | | Placebo (N=20) | |
| Idade (Média ± DP) | $50,1 \pm 7,7$ | | $49,7 \pm 4,8$ | | $46,9 \pm 5,4$ | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Cor | | | | | | |
| Branca | 5 | 25,0 | 3 | 15,8 | 5 | 25,0 |
| Parda | 11 | 55,0 | 14 | 73,7 | 13 | 65,0 |
| Negra | 4 | 20,0 | 2 | 10,5 | 2 | 10,0 |
| Estado Civil | | | | | | |
| Casada | 10 | 50,0 | 9 | 47,3 | 7 | 35,0 |
| Solteira | 10 | 50,0 | 3 | 15,8 | 8 | 40,0 |
| Divorciada | - | - | 6 | 31,6 | 1 | 5,0 |
| Viúva | - | - | 1 | 5,3 | 3 | 15,0 |
| União consensual | - | - | - | - | 1 | 5,0 |

continua

Tabela 2. Características sociodemográficas e clínicas das mulheres climatéricas segundo o grupo de tratamento. São Luís, 2018.

continuação

| Variável | Grupo | | | | | |
|--|-----------------|------|---------------|------|-------------------|------|
| | Amora (N=20) | | TRH (N=19) | | Placebo (N=20) | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Escolaridade | | | | | | |
| Analfabeta | - | - | - | - | - | - |
| Ens. Fund. Incompleto | 2 | 10,0 | 5 | 26,3 | 2 | 10,0 |
| Ens. Fund. Completo | - | - | 4 | 21,0 | 3 | 15,0 |
| Ens. Med. Incompleto | 3 | 15,0 | 1 | 5,3 | 5 | 25,0 |
| Ens. Med. Completo | 12 | 60,0 | 6 | 31,6 | 7 | 35,0 |
| Ens. Sup. Incompleto | - | - | - | - | - | - |
| Ens. Sup. Completo | 3 | 15,0 | 3 | 15,8 | 3 | 15,0 |
| Profissão/ocupação (mais prevalentes) | | | | | | |
| Auxiliar de serviços gerais | 3 | 15,0 | 5 | 26,3 | 6 | 30,0 |
| Do lar | 2 | 10,0 | 5 | 26,3 | 1 | 5,0 |
| Doméstica | 2 | 10,0 | 1 | 5,3 | - | - |
| Lavradora | - | - | 2 | 10,5 | - | - |
| Renda Média Familiar (salário mínimo) | | | | | | |
| 1 | 9 | 45,0 | 9 | 47,4 | 12 | 60,0 |
| 2 a 3 | 7 | 35,0 | 6 | 31,6 | 6 | 30,0 |
| Mais de 3 | 4 | 20,0 | 4 | 21,0 | 2 | 10,0 |
| Etilismo | | | | | | |
| Sim | 6 | 30,0 | 4 | 21,0 | 4 | 20,0 |
| Não | 8 | 40,0 | 9 | 47,3 | 11 | 55,0 |
| Ex-etilista | 6 | 30,0 | 6 | 31,6 | 5 | 25,0 |
| Tabagismo | | | | | | |
| Sim | - | - | 1 | 5,3 | - | - |
| Não | 13 | 65,0 | 16 | 84,2 | 16 | 80,0 |
| Ex-tabagista | 7 | 35,0 | 2 | 10,5 | 4 | 20,0 |
| Atividade Física | | | | | | |
| Sim | 10 | 50,0 | 8 | 42,1 | 7 | 35,0 |
| Não | 10 | 50,0 | 11 | 57,9 | 13 | 75,0 |
| Comorbidade | | | | | | |
| Nenhuma | 8 | 40,0 | 10 | 52,6 | 12 | 60,0 |
| Hipertensão | 9 | 45,0 | 2 | 10,5 | 1 | 5,0 |
| Diabetes | 1 | 5,0 | - | - | 1 | 5,0 |
| Depressão | 1 | 5,0 | 1 | 5,3 | 1 | 5,0 |
| Hipertireoidismo | - | - | 1 | 5,3 | 1 | 5,0 |
| Hipotireoidismo | 1 | 5,0 | 1 | 5,3 | 1 | 5,0 |
| Histerectomia | | | | | | |
| Sim | 5 | 25,0 | 2 | 10,5 | 4 | 20,0 |
| Não | 15 | 75,0 | 17 | 89,5 | 16 | 80,0 |
| Menopausa | | | | | | |
| Sim | 11 | 55,0 | 11 | 57,9 | 8 | 40,0 |
| Não | 9 | 45,0 | 8 | 42,1 | 12 | 60,0 |

A análise do escore do IBK e dos domínios do SF-36 revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos antes e após o tratamento ($p > 0,05$). Após o tratamento, houve redução do escore do IBK e aumento ou manutenção dos valores referentes à maioria dos domínios sobre a qualidade de vida em todos os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação das medianas do IBK e domínios do SF-36 entre os grupos Amora, TRH e Placebo em dois momentos diferentes: na avaliação basal e após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018.

| Variável | Basal | | | | Após 2 meses | | | |
|----------------------|-------|-------|---------|-------------|--------------|-------|---------|-------------|
| | Grupo | | | Valor de p* | Grupo | | | Valor de p* |
| | Amora | TRH | Placebo | | Amora | TRH | Placebo | |
| IBK | 18,0 | 14,0 | 10,5 | 0,488 | 10,0 | 5,0 | 9,0 | 0,311 |
| Capacidade funcional | 85,0 | 75,0 | 80,0 | 0,445 | 92,5 | 95,0 | 90,0 | 0,723 |
| Limitação física | 100,0 | 100,0 | 62,5 | 0,303 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,901 |
| Limitação emocional | 100,0 | 100,0 | 66,6 | 0,348 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,715 |
| Dor | 72,0 | 72,0 | 56,5 | 0,514 | 100,0 | 72,0 | 72,0 | 0,462 |
| Vitalidade | 60,0 | 60,0 | 62,5 | 0,847 | 75,0 | 65,0 | 70,0 | 0,438 |
| Saúde mental | 76,0 | 80,0 | 68,0 | 0,483 | 84,0 | 80,0 | 78,0 | 0,508 |
| Aspecto social | 88,0 | 87,5 | 88,0 | 0,392 | 100,0 | 100,0 | 87,5 | 0,170 |
| Estado geral | 77,0 | 67,0 | 74,5 | 0,716 | 81,0 | 77,0 | 74,5 | 0,616 |

*Teste de Kruskal-Wallis

Na comparação individual de cada grupo nos dois momentos (basal e após tratamento), observou-se uma redução significativa nos escores de IBK no grupo Amora (18,0 para 10,0; $p < 0,001$) e TRH (14,0 para 5,0; $p < 0,001$), exceto no grupo Placebo (10,5 para 9,0; $p = 0,083$). Sobre a qualidade de vida, o grupo Amora apresentou melhora nos domínios de capacidade funcional ($p = 0,006$), vitalidade ($p = 0,030$), saúde mental ($p = 0,017$) e aspecto social ($p = 0,003$); o grupo TRH apresentou melhora no domínio limitação emocional ($p = 0,040$) e o grupo Placebo nos domínios capacidade funcional ($p = 0,007$), limitação física ($p = 0,031$) e saúde mental ($p = 0,028$) (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das medianas do IBK e domínios do SF-36 na avaliação basal e após 2 meses de tratamento, para cada grupo individualmente. São Luís, 2018.

| Variável | Grupo | | | | | | | | |
|----------------------|-------|--------------|------------------|-------|--------------|--------------|---------|--------------|--------------|
| | Amora | | | TRH | | | Placebo | | |
| | Basal | Após 2 meses | Valor de p* | Basal | Após 2 meses | Valor de p* | Basal | Após 2 meses | Valor de p* |
| IBK | 18,0 | 10,0 | <0,001 | 14,0 | 5,0 | 0,001 | 10,5 | 9,0 | 0,083 |
| Capacidade funcional | 85,0 | 92,5 | 0,006 | 75,0 | 95,0 | 0,179 | 80,0 | 90,0 | 0,007 |
| Limitação física | 100,0 | 100,0 | 0,236 | 100,0 | 100,0 | 0,111 | 62,5 | 100,0 | 0,031 |
| Limitação emocional | 100,0 | 100,0 | 0,317 | 100,0 | 100,0 | 0,040 | 66,6 | 100,0 | 0,114 |
| Dor | 72,0 | 100,0 | 0,153 | 72,0 | 72,0 | 0,283 | 56,5 | 72,0 | 0,109 |
| Vitalidade | 60,0 | 75,0 | 0,030 | 60,0 | 65,0 | 0,304 | 62,5 | 70,0 | 0,060 |
| Saúde mental | 76,0 | 84,0 | 0,017 | 80,0 | 80,0 | 0,077 | 68,0 | 78,0 | 0,028 |
| Aspecto social | 88,0 | 100,0 | 0,003 | 87,5 | 100,0 | 0,230 | 88,0 | 87,5 | 0,665 |
| Estado geral | 77,0 | 81,0 | 0,057 | 67,0 | 77,0 | 0,113 | 74,5 | 74,5 | 0,125 |

* Teste de Wilcoxon

A tabela 5 representa a análise por pares da melhora do escore do IBK de cada participante, após a intervenção. Considerou-se que houve melhora dos sintomas quando o escore total diminuiu, já em caso negativo houve aumento do escore ou a manutenção do seu valor. Observou-se que houve diferença significativa apenas entre os grupos Amora e Placebo ($p = 0,043$), com aumento de 46% da probabilidade de melhora dos sintomas climatéricos com o uso da *Morus nigra* L. (RR = 1,46; IC 95% = 1,04 - 2,05).

Tabela 5. Análise da melhora dos sintomas climatéricos avaliados pelo IBK após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018.

| Grupo | Melhora dos Sintomas após Tratamento | | RR (IC 95%) | Valor de p* |
|---------|--------------------------------------|----------|-------------|--------------|
| | SIM | NÃO | | |
| | n (%) | n (%) | | |
| Amora | 19 (95,0) | 1 (5,0) | 1,46 | 0,043 |
| Placebo | 13 (65,0) | 7 (35,0) | (1,04-2,05) | |

continua

Tabela 5. Análise da melhora dos sintomas climatéricos avaliados pelo IBK após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018.

continuação

| Grupo | Melhora dos Sintomas após Tratamento | | RR (IC 95%) | Valor de p* |
|---------|--------------------------------------|----------|-------------|-------------|
| | SIM | NÃO | | |
| | n (%) | n (%) | | |
| Amora | 19 (95,0) | 1 (5,0) | 1,13 | 0,342 |
| TRH | 16 (84,2) | 3 (15,8) | (0,91-1,40) | |
| TRH | 16 (84,2) | 3 (15,8) | 1,29 | 0,273 |
| Placebo | 13 (65,0) | 7 (35,0) | (0,89-1,88) | |

* Teste do Qui-quadrado de Pearson

Em relação aos efeitos colaterais que surgiram nos grupos durante o tratamento, identificou-se a mastalgia como mais frequente e presente apenas no grupo TRH (36,8%), com diferença muito significativa ($p < 0,001$). O *spotting* ocorreu em 26,3% das mulheres expostas somente à TRH ($p = 0,003$) (Tabela 6).

Tabela 6. Associação entre a ocorrência de mastalgia, *spotting* e o tipo de tratamento. São Luís, 2018.

| Variável | Grupo | | | Valor de p* |
|-----------|------------|-----------|--------------|-------------|
| | Amora | TRH | Placebo | |
| | n (%) | n (%) | n (%) | |
| Mastalgia | | | | |
| Sim | - | 7 (36,8) | - | <0,001 |
| Não | 20 (100,0) | 12 (63,2) | 20,0 (100,0) | |
| Spotting | | | | |
| Sim | - | 5 (26,3) | - | 0,003 |
| Não | 20 (100,0) | 14 (73,7) | 20,0 (100,0) | |

* Teste do Qui-quadrado de Pearson

Não houve diferença significativa entre os três grupos quanto aos resultados da colpocitologia oncótica e da colposcopia antes e após o tratamento. As características analisadas da colpocitologia consistiram no padrão celular e na microbiologia. Nos três grupos, o padrão celular trófico prevaleceu (Amora: 65%, TRH: 68,5% e Placebo: 75%) e a microbiota foi composta por bactérias fisiológicas, a exemplo dos lactobacilos e cocos (Amora: 55%, TRH: 73,7% e Placebo: 90%). Na colposcopia, identificou-se um pequeno

percentual de alterações caracterizadas como pontilhado fino ou mosaico fino (Amora: 20%, TRH: 15,8% e Placebo: 10%) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação dos parâmetros da colpocitologia oncótica e colposcopia dos grupos Amora, TRH e Placebo em dois momentos diferentes: na avaliação basal e após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018.

| Variável | Amora | | | TRH | | | Placebo | | |
|------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | Basal | Após 2 meses | Valor de p* | Basal | Após 2 meses | Valor de p* | Basal | Após 2 meses | Valor de p* |
| | n (%) | n (%) | | n (%) | n (%) | | n (%) | n (%) | |
| Padrão Celular | | | | | | | | | |
| Trófico | 15 (75,0) | 13 (65,0) | | 12 (63,2) | 13 (68,5) | | 17 (85,0) | 15 (75,0) | |
| Hipotrófico | 3 (15,0) | 5 (25,0) | 0,157 | 3 (15,8) | 4 (21,0) | 0,506 | 2 (10,0) | 2 (10,0) | 0,392 |
| Atrófico | 2 (10,0) | 2 (10,0) | | 4 (21,0) | 2 (10,5) | | 1 (5,0) | 3 (15,0) | |
| Microbiologia | | | | | | | | | |
| Fisiológica | 14 (70,0) | 11 (55,0) | 0,549 | 11 (57,8) | 14 (73,7) | 0,250 | 11 (55,0) | 18 (90,0) | 0,390 |
| Gardnerella ou Candida | 6 (30,0) | 9 (45,0) | | 8 (42,2) | 5 (26,3) | | 9 (45,0) | 2 (10,0) | |
| Colposcopia | | | | | | | | | |
| Normal | 16 (80,0) | 16 (80,0) | | 15 (79,0) | 16 (84,2) | | 16 (80,0) | 18 (90,0) | |
| Pontilhado fino/Mosaico fino | 4 (20,0) | 4 (20,0) | 1,00 | 4 (21,0) | 3 (15,8) | 1,00 | 4 (20,0) | 2 (10,0) | 0,500 |

* Teste de McNemar ou McNemar-Bowker

A análise dos exames bioquímicos revelou que a glicemia de jejum aumentou nos três grupos, gerando uma diferença significativa entre a avaliação basal e o valor após a intervenção (Amora: $p = 0,030$; TRH: $p = 0,0001$ e Placebo: $p = 0,003$).

No grupo Amora, os hormônios T4 livre e estradiol também se elevaram ($p = 0,011$ e $p = 0,031$, respectivamente). No grupo TRH houve redução do HDL ($p = 0,042$). Por último,

no grupo Placebo houve redução do colesterol total ($p = 0,036$) e do FSH ($p = 0,034$) (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação dos exames bioquímicos e hormonais dos grupos Amora, TRH e Placebo em dois momentos diferentes: na avaliação basal e após 2 meses de tratamento. São Luís, 2018.

| Variável | Amora | | | TRH | | | Placebo | | |
|--------------------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|---------------|---------|--------------|--------------|
| | Basal | Após 2 meses | Valor de p* | Basal | Após 2 meses | Valor de p* | Basal | Após 2 meses | Valor de p* |
| Glicemia de jejum | 97,3 | 102,9 | 0,030 | 88,3 | 94,4 | 0,0001 | 98,8 | 104,9 | 0,003 |
| Colesterol total | 190,0 | 197,5 | 0,263 | 216,7 | 217,6 | 0,863 | 218,9 | 203,1 | 0,036 |
| HDL | 58,3 | 56,3 | 0,150 | 60,0 | 55,3 | 0,042 | 53,9 | 51,5 | 0,367 |
| LDL | 120,3 | 100,4 | 0,352 | 132,2 | 134,1 | 0,712 | 135,6 | 126,7 | 0,082 |
| Triglicerídeo | 160,8 | 186,3 | 0,249 | 122,4 | 140,1 | 0,057 | 146,6 | 135,9 | 0,387 |
| Ureia | 27,6 | 26,3 | 0,281 | 29,0 | 27,3 | 0,206 | 25,2 | 24,1 | 0,415 |
| Creatinina | 0,7 | 0,7 | 0,226 | 0,7 | 0,7 | 0,800 | 0,7 | 0,6 | 0,309 |
| Ácido úrico | 4,8 | 4,9 | 0,675 | 4,0 | 4,2 | 0,071 | 3,9 | 3,8 | 0,624 |
| Fosfatase alcalina | 76,3 | 74,8 | 0,536 | 73,4 | 72,6 | 0,711 | 71,0 | 73,6 | 0,339 |
| AST | 32,0 | 20,0 | 0,366 | 19,3 | 20,0 | 0,411 | 18,6 | 19,2 | 0,423 |
| ALT | 30,4 | 17,7 | 0,296 | 18,4 | 17,6 | 0,509 | 17,7 | 16,7 | 0,549 |
| TSH | 1,9 | 2,1 | 0,315 | 1,9 | 1,8 | 0,435 | 2,3 | 2,4 | 0,926 |
| T4 Livre | 14,9 | 15,6 | 0,011 | 14,7 | 15,2 | 0,071 | 13,8 | 14,9 | 0,244 |
| Estradiol | 30,1 | 87,2 | 0,031 | 80,6 | 55,4 | 0,431 | 115,8 | 130,1 | 0,375 |
| FSH | 43,8 | 46,3 | 0,677 | 64,6 | 63,4 | 0,768 | 28,3 | 25,3 | 0,034 |
| PCR Ultrassensível | 0,5 | 0,3 | 0,503 | 0,4 | 0,4 | 0,791 | 0,2 | 0,2 | 0,918 |

* Teste T pareado

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, os grupos apresentaram características sociodemográficas e comportamentais semelhantes às encontradas por CRUZ *et al.* (2017). Esses autores também avaliaram mulheres da mesma região, que possuíam média de idade de 51,4 anos, eram pardas, com ensino secundário completo, não eram tabagistas ou etilistas. MELO *et al.* (2016) avaliaram 80 mulheres climatéricas brasileiras e também observaram uma média de idade superior a 50 anos, cor parda, com dez anos ou mais de estudo, renda familiar entre um e dois salários e companheiro fixo.

A semelhança observada entre os grupos na avaliação basal referente ao IBK e domínios do SF-36 demonstra uma homogeneidade das participantes quanto a essas características. Quando analisadas as alterações antes e após o tratamento para cada grupo, observou-se que houve melhora dos sintomas climatéricos no grupo Amora e TRH, com consequente diminuição do escore IBK, exceto no grupo Placebo. A análise da melhora dos sintomas por meio da diminuição do escore individual do IBK, e não apenas do somatório total do escore em cada grupo, revelou que houve diferença apenas entre o grupo Placebo e o grupo Amora, apresentando uma probabilidade de quase 50% de melhoria dos sintomas climatéricos entre as mulheres que receberam a *Morus nigra* L.

Em seu estudo sobre o composto 8-prenilnaringenina presente no lúpulo, STULIKOVA *et al.* (2018) concluíram que esse flavonoide prenilado, uma classe de FE que também pode ser encontrada na espécie *Moraceae*, tem a capacidade de aliviar os sintomas da menopausa. VILLA *et al.* (2017), por sua vez, avaliaram o impacto de uma suplementação nutricional composta por FE e algumas vitaminas por meio de um estudo piloto com 90 mulheres na perimenopausa. O escore global do IBK modificado diminuiu significativamente em comparação ao grupo controle após 3 e 6 meses de tratamento.

Esses autores comprovaram que a suplementação nutricional à base de FE reduziu significativamente os sintomas vasomotores e também amenizou sintomas neurológicos e psicológicos, como insônia, fadiga e irritabilidade (VILLA *et al.*, 2017). Outra preparação natural rica em FE foi analisada por KIRICHENKO *et al.* (2017), comparada ao placebo. A análise detalhada do IBK no grupo que recebeu as cápsulas de FE demonstrou redução significativa do nervosismo, astenia e parestesia.

PANAHI *et al.* (2011) realizaram um ensaio clínico randomizado com 66 mulheres climatéricas sintomáticas e avaliaram os efeitos de um fitoterápico à base de abacate e óleo de

soja comparados à TRH. Neste estudo, o IBK reduziu nos dois grupos de forma semelhante (redução de $8,50 \pm 4,83$ no grupo do FE e $8,33 \pm 4,89$ no grupo TRH). A severidade e a duração das ondas de calor também apresentaram a mesma diminuição. Outro estudo comparou os efeitos da isoflavona com a TRH e concluiu que o efeito das isoflavonas nos sintomas climatéricos foi semelhante ao do estrogênio (KAARI *et al.*, 2006).

Já o ensaio clínico realizado por COSTA *et al.* (2017) identificou que 10 semanas de treinamento físico foi eficaz para melhorar os sintomas climatéricos em mulheres pós-menopausadas e que a suplementação com isoflavonas não promoveu efeitos adicionais na melhora desses sintomas.

Até a presente data, não foi encontrado algum ensaio clínico que avaliasse o efeito da *Morus nigra* L. sob os sintomas climatéricos. Todavia, comprovou-se que a amoreira preta é rica em flavonoides e estes, por sua vez, podem amenizar alguns desses sintomas. A quantidade de flavonoides presentes na *Morus nigra* L. é superior à encontrada na *Morus alba* e *Morus rubra* (ERCISLI e ORHAN, 2007). Esses flavonoides são capazes de amenizar a dor, diminuindo principalmente a duração da fase inflamatória. Além disso, comprovou-se que os flavonoides da amora preta são capazes de diminuir a produção de IL-6 (citocina inflamatória) e aumentar significativamente a IL-10 (citocina anti-inflamatória) (CHEN *et al.*, 2017). Desta forma, esse efeito anti-inflamatório pode influenciar nos sintomas relacionados à dor, como artralgia/mialgia e cefaleia.

O sintoma depressão, avaliado pelo IBK, também pode ser amenizado pela *Morus nigra* L. DALMAGRO *et al.* (2017) demonstraram que a administração aguda e subcrônica de *Morus nigra* L. ou de ácido siríngico, principal componente fenólico identificado nas folhas, exerceu propriedades antidepressivas nos testes comportamentais dos camundongos. O efeito observado envolveu a modulação do stress oxidativo, tanto no soro como no cérebro dos camundongos. O extrato da *Morus nigra* L. ou o ácido siríngico foram capazes de conter a morte celular induzida pelo glutamato nas amostras de células do hipocampo e córtex, implicando uma atividade de neuroproteção no efeito antidepressivo.

Em relação à qualidade de vida das participantes, sabe-se que a diminuição dos níveis de estrogênio propicia os sintomas climatéricos clássicos, mas também interfere no funcionamento físico e cognitivo, implicando na qualidade de vida. O SF-36 tem sido uma das medidas genéricas mais utilizadas de qualidade de vida relacionada à saúde e demonstra sensibilidade a efeitos significativos do tratamento em uma variedade de populações de pacientes (ATTERITANO *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, as mulheres tratadas com *Morus nigra* L. apresentaram melhoria na qualidade de vida referente aos seguintes domínios do SF – 36: capacidade funcional, vitalidade, saúde mental e aspecto social. Aquelas tratadas com TRH apresentaram aumento do escore apenas relacionado à limitação emocional. Enquanto as submetidas à terapia com placebo melhoraram a capacidade funcional, a limitação física e a saúde mental.

CETISLI *et al.* (2015) também realizaram um estudo experimental com 140 mulheres alocadas em quatro grupos. O primeiro grupo recebeu 5g de linhaça diariamente, o segundo grupo recebeu a mesma dosagem de linhaça e foi submetido a um treinamento sobre o climatério, seus sintomas e tratamentos. O terceiro grupo recebeu TRH (2 mg de estradiol e 1 mg de acetato de noretisterona) e o quarto grupo correspondeu ao grupo controle, composto por mulheres que não receberam qualquer tratamento medicamentoso ou complementar.

A intensidade dos sintomas climatéricos diminuiu entre a primeira e a última visita em todos os grupos, exceto no grupo controle, resultado semelhante ao nosso. No grupo do FE, houve redução de 8,7%; no grupo em que foram ofertadas informações sobre o climatério, além do FE, houve redução de 9,8% e no grupo TRH houve redução de 10%. Já no grupo controle ocorreu uma elevação de 6,9% da intensidade desses sintomas (CETISLI *et al.*, 2015).

ATTERITANO *et al.* (2014) realizou um estudo randomizado, placebo controlado, com 389 mulheres na pós menopausa, para investigar os efeitos da genisteína sob a qualidade de vida e sintomas depressivos por 2 anos. No grupo tratado com genisteína, todos os domínios melhoraram significativamente comparados ao basal. A capacidade funcional, limitação física, dor e vitalidade aumentaram seus escores. Enquanto no grupo placebo, três destes domínios pioraram, apenas o escore da dor manteve-se comparado ao basal. Em relação aos demais domínios, a saúde mental e aspecto social melhoraram com 12 meses de tratamento com genisteína; a limitação emocional e saúde geral aumentaram significativamente no final do tratamento. No grupo placebo, esses últimos quatro domínios sofreram redução aos 12 e 24 meses.

Outros autores buscaram determinar os efeitos de uma dieta rica em FE sobre as queixas das mulheres climatéricas. Após 3 meses de tratamento, identificaram que as mulheres que ingeriram a dieta com FE apresentaram uma diminuição significativa das ondas de calor e secura vaginal, em comparação aos seus escores pré-tratamento. No grupo placebo, porém, não houve diferença (BRZEZINSKI *et al.*, 1997).

De forma geral, observa-se nestes estudos que o FE (seja o alimento, extrato ou composto isolado) ameniza os sintomas climatéricos e melhora a qualidade de vida. Uma das

hipóteses para justificar essa melhora significativa seria sua atuação junto ao mais frequente sintoma climatérico, as ondas de calor. Observou-se, na prática clínica, que as mulheres que utilizaram a amora referiam um alívio importante dos fogachos em cerca de 1 a 2 semanas de uso regular. PINKERTON *et al.* (2016) comprovou que a frequência e gravidade das ondas de calor mostraram relações aproximadamente lineares com os parâmetros da qualidade de vida e sono. Desta forma, identificou-se que ao amenizar as ondas de calor, as mulheres climatéricas referiam uma melhor qualidade de vida.

Os centros termorregulatórios no hipotálamo, principalmente o núcleo pré-óptico medial, parecem ser o local mais provável de disfunção termorregulatória (CASPER e YEN, 1985). Entre os neurotransmissores envolvidos neste processo, considera-se que a norepinefrina é o principal neurotransmissor responsável pela redução do valor de referência termorregulatório e por desencadear os mecanismos de perda de calor (CASPER e YEN, 1985; ROSENBERG e HOLST LARSEN, 1991; FREEDMAN e KRELL, 1999). Constatou-se que os níveis plasmáticos dos metabólitos da noradrenalina estão aumentados antes e durante as ondas de calor e a injeção intra-hipotalâmica de norepinefrina pode aumentar a temperatura corporal (FREEDMAN *et al.*, 1995).

A serotonina constitui-se em outro neurotransmissor chave no mecanismo das ondas de calor. A liberação de serotonina desencadeada por estímulos internos ou externos pode ativar os receptores 2a de serotonina no hipotálamo e desencadear os fogachos (BERENDSEN, 2000).

A produção de noradrenalina e sua liberação no núcleo termorregulador pode ser inibida por endorfinas e por subprodutos do metabolismo do estrogênio (CASPER e YEN, 1985; KRONENBERG e DOWNEY, 1987; ROSENBERG e LARSEN, 1991). A diminuição do estrogênio pode, ainda, reduzir os níveis plasmáticos de serotonina (GONZALES e CARRILLO, 1993; BLUM *et al.*, 1996). Considerando que o estradiol modula o sistema serotoninérgico e noradrenérgico, os FE também podem modular esses sistemas. Segundo SHANAFELT *et al.* (2002), esta modulação não interfere apenas na regulação da temperatura corpórea, mas na manutenção do humor.

Estudos que investiguem os efeitos específicos do uso de FE sobre o tecido nervoso e sua influência na qualidade de vida ainda são escassos. TOYOHIRA *et al.* (2010) examinaram os efeitos da genisteína na atividade do transportador de noradrenalina e do transportador de serotonina em uma linhagem celular de neuroblastoma humano. Esses transportadores de monoamina controlam a transferência neuronal e depuração sináptica da noradrenalina e serotonina, mediando a recaptção desses neurotransmissores liberados para o meio

extracelular. Este estudo comprovou que a genisteína regulou positivamente a atividade dos transportadores de monoamina, provavelmente através de processos envolvendo a fosforilação da tirosina. Em outro estudo, foi evidenciado que a genisteína aumentou a transmissão serotoninérgica na amígdala, por meio da via de sinalização CaMKII/CREB (WU *et al.*, 2017).

RODRIGUEZ-LANDA *et al.* (2017) avaliaram os efeitos ansiolíticos de doses idênticas de genisteína e 17β -estradiol em ratas ovariectomizadas e a participação do RE- β nesse efeito, por meio do uso do antagonista tamoxifeno. Eles concluíram que o FE genisteína exerceu efeito ansiolítico semelhante ao 17β -estradiol, agindo sobre o RE- β , uma vez que o tamoxifeno bloqueou este efeito.

BU e LEPHART (2005) também estudaram os efeitos das isoflavonas da soja sobre o tecido cerebral. Os autores identificaram o potencial neuroprotetor dessas isoflavonas na amígdala, no córtex frontal, no hipocampo e no córtex do hipotálamo médio basal. Isso implica que o consumo de isoflavonas de soja pode ser benéfico não apenas para o aprendizado, memória e recuperação de traumas, mas também para comportamentos relacionados à ansiedade (BU e LEPHART, 2005).

Os efeitos da TRH sobre a qualidade de vida em mulheres na pós-menopausa já foram avaliados. A maioria dos estudos mostra um efeito positivo da suplementação de estrogênio em vários parâmetros de qualidade de vida, mas as controvérsias em torno da TRH convencional relacionadas ao risco de câncer de mama e doença cardiovascular desencorajam as mulheres a realizarem este tratamento (HOFFMANN *et al.*, 2005; GENAZZANI *et al.*, 2006).

Muitas mulheres preferem tratamentos complementares à TRH, pois consideram os tratamentos complementares mais confiáveis. KANG *et al.* (2002) descobriram que os sintomas da menopausa podem ser tratados com métodos de tratamento complementares e que 80% das mulheres com idade entre 45 e 60 anos usaram tratamentos complementares sem qualquer outra prescrição médica para aliviar os sintomas climatéricos.

Em relação ao efeito do placebo, alguns estudos sugerem que 1 em cada 5 mulheres terão uma redução de 50% ou mais nas ondas de calor com o placebo e que uma em cada 10 mulheres experimentará uma redução de pelo menos 75% com placebo (BARTON *et al.*, 1998; LOPRINZI *et al.*, 2000; QUELLA *et al.*, 2000). Uma revisão sistemática realizada por LETHABY *et al.* (2013) concluiu que o placebo exerceu um forte efeito na maioria dos ensaios clínicos, com uma redução na frequência dos fogachos, variando de 1% a 59%.

A disposição psicológica, fatores contextuais e biológicos afetam dramaticamente a suscetibilidade de uma pessoa ao efeito placebo. A liberação de opioides endógenos medeia muitas formas de analgesia com placebo e as vias dopaminérgicas já foram implicadas na resposta placebo na dor e depressão (MURRAY e STOESSL, 2013).

Além disso, o efeito placebo em nosso estudo pode ter sido influenciado pelo conhecimento das mulheres sobre os sintomas climatéricos. Muitas desconheciam que vários sintomas podem estar relacionados à falência ovariana, uma vez conscientes do período da menopausa, de suas alterações e queixas associadas, essas mulheres podem acolher a menopausa com mais facilidade e desenvolver técnicas para lidar com isso (CETISLI *et al.*, 2015).

Ao investigar sobre os efeitos adversos dos tratamentos, observamos que a mastalgia e *spotting* foram relatados apenas pelo grupo TRH e os demais grupos não referiram efeitos adversos. Sabe-se que há um risco maior de ocorrência de *spotting* entre as mulheres usuárias de TRH (ROSSOUW *et al.*, 2002) Em mulheres na pós-menopausa, o *spotting* ou sangramento vaginal não programado é comum nos primeiros 6 meses de uso contínuo de TRH combinada e não precisa necessariamente ser investigado, desde que os exames de colpocitologia estejam atualizados. As mulheres devem ser informadas sobre a alta probabilidade de *spotting* durante este período (ROBERTS e HICKEY, 2016).

Evidências sugerem que a exposição à TRH combinada induz mudanças na densidade, distribuição e estrutura dos vasos endometriais, bem como alterações no estroma, que podem aumentar a produção local de mediadores vasoativos e promover a ruptura dos vasos (HICKEY *et al.*, 2003).

Um recente ensaio clínico randomizado avaliou a prevalência de mastalgia em uma população tratada com TRH e extrato de *Cimicifuga foetida* (GAO *et al.*, 2018). As mulheres foram alocadas em três grupos. O grupo A recebeu 1mg de valerato de estradiol associado a 4 mg de acetato de medroxiprogesterona, o grupo B recebeu 1 mg de valerato de estradiol associado a 100 mg de progesterona micronizada e o grupo C foi tratado com 100 mg do extrato de *C. foetida*. As prevalências de mastalgia nos grupos A e B foram superiores (80,8% e 72,0%, respectivamente) e não houve diferença significativa entre eles. Enquanto no grupo C a prevalência correspondeu a 27,3% (GAO *et al.*, 2018). Em uma metanálise, a incidência de mastalgia foi significativamente menor entre as mulheres tratadas com FE comparadas às tratadas com TRH (XU *et al.*, 2009).

O câncer de mama permanece como a principal causa de mortalidade por câncer em mulheres em todo o mundo (AKRAM *et al.*, 2017). A mastalgia é um efeito adverso comum

da TRH e constitui-se em um fator chave na adesão a longo prazo à essa terapia (BARNABEI *et al.*, 2005). Já está comprovado que o aumento da densidade mamográfica está associado ao aumento do risco de câncer de mama, no entanto, não está bem definido se a sensibilidade mamária é realmente um risco para este tipo de câncer (GAMBACCIANI *et al.*, 2018).

No entanto, segundo o estudo da WHI, a presença de mastalgia entre as mulheres tratadas com estrogênio equino conjugado e acetato de medroxiprogesterona foi associada a um aumento do risco para câncer de mama. Esta associação foi especialmente pronunciada entre as mulheres que apresentavam sensibilidade mamária prévia (CRANDALL *et al.*, 2012).

A maior parte da literatura atual é a favor da segurança dos FE em sobreviventes de câncer de mama, devido o efeito protetor evidenciado pela diminuição da recorrência deste câncer e da mortalidade (ALIPOUR *et al.*, 2015). Um estudo sobre a suplementação dietética com FE observou que a genisteína e daidzeína total encontrada no tecido mamário adiposo e glandular foi 20 a 40 vezes maior que o estradiol (BOLCA *et al.*, 2010). Alguns autores afirmam que a propriedade de acumular-se no tecido mamário e ativar preferencialmente os RE- β estão relacionadas ao efeito quimioprolifático dos FE (BILAL *et al.*, 2014).

Este efeito quimioprolifático pode ser explicado pela ação antiproliferativa e anticarcinogênica que o RE- β parece desencadear, agindo como um supressor tumoral ao controlar a proliferação induzida pelo RE- α que, por sua vez, estaria relacionado à promoção da carcinogênese (RIETJENS *et al.*, 2013; PATERNI *et al.*, 2014).

Além dos FE inibirem células de câncer de mama RE-positivas, eles também podem inibir as RE-negativas. Muitos investigadores já demonstraram a possibilidade de reativação epigenética do ER- α em células humanas de câncer mamário RE- α negativas (YANG *et al.*, 2001; MEERAN *et al.*, 2012). Essa descoberta é bastante promissora, uma vez que o câncer de mama RE-negativo é clinicamente mais agressivo, por normalmente não responder às terapias convencionais anti-estrogênicas (MEERAN *et al.*, 2012).

Um recente estudo evidenciou que combinações do chá verde de polifenóis com sulforafano (brócolis) reativaram a expressão de ER- α em células MDA-MB-231 negativas para RE- α (MEERAN *et al.*, 2012). Os mesmos autores ainda investigaram que a reativação ER- α é induzida pela reativação epigenética de genes supressores de tumor silenciados, como p21 (CIP1/WAF1), em células humanas de câncer de mama RE- α negativas (SINHA *et al.*, 2015).

LI *et al.* (2013) mostraram que a genisteína pode restaurar epigeneticamente a expressão de RE- α , o que, por sua vez, aumentou a sensibilidade terapêutica antiestrogênica dependente de tamoxifeno *in vitro* e *in vivo*. Todavia, como os FE inibem as células de câncer

de mama RE-negativas ainda não está elucidada. A modulação epigenética pode contribuir para tal, mas novos estudos precisam ainda ser conduzidos (HSIEH *et al.*, 2018).

Os FE também apresentam efeitos não RE-mediados no tecido mamário. A genisteína pode inativar o IGF-1R e, assim, induzir a apoptose de células de câncer de mama MC-7; pode inibir a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / Akt e diminuir a expressão de ciclina B1, Bcl-2 e Bcl-xl em células de adenocarcinoma mamário MDA – MB – 231, além de induzir a parada do ciclo celular (PAN *et al.*, 2012; COTRIM *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015; HSIEH *et al.*, 2018).

Quanto à análise da colpocitologia, os lactobacilos são essenciais para manter a homeostase vaginal, já que a estrutura da microbiota vaginal em mulheres climatéricas muda com a diminuição dos níveis de estrogênio (MUHLEISEN e HERBST-KRALOVETZ, 2016). Essas bactérias prevaleceram em todos os grupos do nosso estudo, tanto no momento da avaliação basal, quanto após a intervenção. A *Gardnerella vaginalis*, bem como a *Cândida* sp foram pouco frequentes.

A vaginose bacteriana, que pode ser desencadeada pela *Gardnerella vaginalis*, é o distúrbio vaginal mais comum em mulheres na pré-menopausa, porém as mulheres pós-menopáusicas não estão isentas de adquiri-la. Há uma série de complicações ginecológicas associadas à vaginose bacteriana, incluindo aumento do risco de aquisição de infecções sexualmente transmissíveis (IST), entre elas o HIV (FARO *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 1999; DREW e SHERRARD, 2008).

Um percentual pequeno de mulheres apresentou alteração colposcópica sugestiva de infecção pelo HPV. As mudanças fisiológicas da imunossenescência, como a menor ativação de células T e produção de anticorpos, podem fazer com que o colo uterino seja mais suscetível às infecções sexualmente transmissíveis, incluindo o HPV (MINKIN, 2010). Além disso, os níveis baixos de estrogênio causam menor lubrificação e conseqüente adelgaçamento da mucosa vaginal, propiciando as microabrasões da parede durante relações sexuais e facilitando a aquisição e transmissão de IST (BACHUS, 1998; LUTHER e WILKIN, 2007).

Em relação às alterações bioquímicas, a elevação dos níveis de estradiol no grupo Amora encontrada em nosso estudo corroborou com outras análises (CASSIDY *et al.*, 1994; NAHÁS *et al.*, 2003). No estudo realizado por NAHÁS *et al.* (2003) houve aumento significativo do valor médio de estradiol no grupo que utilizou isoflavona, sem alterações no FSH e LH.

De forma inesperada, a glicemia elevou-se em todos os grupos, inclusive no grupo Amora, apesar de seu efeito hipoglicemiante ter sido identificado por JUNIOR *et al.* (2017),

que observaram que o extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. reduziu a hiperglicemia, melhorou a tolerância oral à glicose e minimizou a dislipidemia. Um recente estudo identificou na *Morus nigra* L. quatro compostos denominados nigragenons, que possuem atividade agonista em relação ao PPAR γ , um importante alvo antidiabético (XU *et al.*, 2018).

Uma metanálise que avaliou o perfil lipídico de mulheres submetidas a uma dieta rica em FE concluiu que há um efeito hipolipidêmico, com redução do LDL (ANDERSON *et al.*, 1995). Em nosso estudo, houve redução do LDL no grupo Amora, porém não significativo. Outros estudos mostraram efeitos positivos, principalmente em pacientes hipercolesterolêmicos e um efeito moderado em pacientes com perfil lipídico normal (ZERN *et al.*, 2005; CLERICI *et al.*, 2007). O estudo experimental realizado por ZENI *et al.* (2017) demonstrou que a *Morus nigra* L. diminuiu o colesterol sérico, triglicerídeos e normalizou as lipoproteínas, fornecendo evidências de que o extrato das folhas da amoreira preta pode normalizar o distúrbio hiperlipidêmico.

Observou-se, ainda, que não houve elevação das enzimas hepáticas nos grupos, sugerindo ausência de dano celular ao hepatócito e não houve alteração da função renal. A citotoxicidade dos frutos *Morus nigra* L. foi avaliada por CHEN *et al.* (2016) em camundongos. Neste estudo, não houve citotoxicidade dos flavonoides quando a concentração aumentou de 50 para 100 $\mu\text{g/mL}$. Outros autores avaliaram a toxicidade do extrato etanólico das folhas, concluindo que pode ser considerado de baixa toxicidade, uma vez que não causou a morte ou alteração dos testes de parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais (ALMEIDA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Em um estudo sobre a genisteína, a administração diária de 54 mg não provocou alterações significativas nos exames bioquímicos de rotina, na função hepática ou nos resultados da hematologia das mulheres climatéricas. A genisteína e placebo foram geralmente bem tolerados e ingeridos com alto grau de adesão (ATTERITANO *et al.*, 2014). Esse composto já foi comprovado como uma molécula com um bom perfil de segurança, seu uso por mulheres na pós-menopausa durante 3 anos mostrou uma redução no risco cardiovascular, densidade mamária e marcadores de dano citogenético (MARINI *et al.*, 2008; MARINI *et al.*, 2010).

7 CONCLUSÕES

As mulheres climatéricas que compuseram os três grupos de tratamento apresentaram homogeneidade quanto à maioria das características sociodemográficas.

O tratamento com *Morus nigra* L. e TRH por 2 meses reduziu o escore de IBK, efeito não observado no grupo placebo. A análise individual de melhora dos sintomas comprovou que apenas a *Morus nigra* L. foi capaz de diminuir a intensidade dos sintomas. A *Morus nigra* L. melhorou uma quantidade superior de domínios do SF - 36, comparada aos outros grupos.

A mastalgia e *spotting* ocorreram apenas entre as mulheres expostas à TRH. Nenhum efeito adverso foi relatado pelas mulheres expostas à *Morus nigra* L.

Não houve diferença entre os grupos relacionada à colpocitologia oncótica e colposcopia.

Em relação ao perfil bioquímico, a *Morus nigra* L. não apresentou efeito hipoglicemiante e hipolipidêmico durante 2 meses de tratamento. Não houve alteração sugestiva de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em nenhum grupo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Por ser um estudo pioneiro, optou-se por estimar uma amostra pequena e realizar uma intervenção com duração de curto prazo, além disso, não foi identificada a dose ideal do extrato das folhas de *Morus nigra* L. Estes fatos podem ter impedido mudanças graduais na intensidade dos sintomas climatéricos, na qualidade de vida das mulheres avaliadas e no perfil bioquímico.

Todavia, nosso estudo comprovou que o extrato das folhas de *Morus nigra* L. foi capaz de melhorar os sintomas climatéricos, foi bem tolerado pelas usuárias, não apresentou toxicidade e não produziu efeitos adversos, sugerindo benefícios superiores à TRH. Porém, novos ensaios clínicos sobre o uso desta planta precisam ser realizados, a fim de comprovar os efeitos estrogênicos da amoreira preta e reforçar seu uso com uma alternativa às terapias hormonais.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, H. Lignans and human health. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 44, n. 5-6, p. 483-525, Jan 2007.
- AGHABABAEI, S. K et al. Effects of blackberry (*Morus nigra* L.) consumption on serum concentration of lipoproteins, apo A-I, apo B, and high-sensitivity-C-reactive protein and blood pressure in dyslipidemic patients. **J Res Med Sci**, v. 20, n. 7, p. 684-91, Jul 2015.
- AHMED EBBIARY, N. A.; LENTON, E. A.; COOKE, I. D. Hypothalamic-pituitary ageing: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 41, n. 2, p. 199-206, Aug 1994.
- AKBULUT, M.; OZCAN, M. M. Comparison of mineral contents of mulberry (*Morus* spp.) fruits and their pekmez (boiled mulberry juice) samples. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60, n. 3, p. 231-9, May 2009.
- AKHLAQ, A et al. The Prokinetic, Laxative, and Antidiarrheal Effects of *Morus nigra*: Possible Muscarinic, Ca(2+) Channel Blocking, and Antimuscarinic Mechanisms. **Phytother Res**, v. 30, n. 8, p. 1362-76, Aug 2016.
- AKRAM, M et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biol Res**, v. 50, n. 1, p. 33, Oct 2017.
- ALIPOUR, S.; JAFARI-ADLI, S.; ESKANDARI, A. Benefits and harms of phytoestrogen consumption in breast cancer survivors. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 8, p. 3091-396, 2015.
- ALMEIDA, J.; et al. Evaluation of Hypoglycemic Potential and Pre-Clinical Toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin Amer J Phar**, v. 30, n. 1, p. 96-104, Feb 2011.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Medicinal Plants and Natural Compounds from the Genus *Morus* (Moraceae) with Hypoglycemic Activity: A Review In: CHACKREWARTHY, S. (Ed.). **Glucose Tolerance**. London: Intech Open. cap. 11, p.189-206. May 2012.
- ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **N Engl J Med**, v. 333, n. 5, p. 276-82, Aug 1995.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Rev Saude Publica**, v. 48, n. 3, p. 541-53, Jun 2014.
- APPLING, S.; PAEZ, K.; ALLEN, J. Ethnicity and vasomotor symptoms in postmenopausal women. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 16, n. 8, p. 1130-8, Oct 2007.
- ARAUJO, C. M. et al. *Morus nigra* leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food Funct**, v. 6, n. 11, p. 3490-9, Nov 2015.

ARCHER, D. F. et al. Menopausal hot flushes and night sweats: where are we now? **Climacteric**, v. 14, n. 5, p. 515-28, Oct 2011.

ATTERITANO, M. et al. Genistein effects on quality of life and depression symptoms in osteopenic postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, controlled study. **Osteoporos Int**, v. 25, n. 3, p. 1123-9, Mar 2014.

AUSTIN, P. C. et al. Prescriptions for estrogen replacement therapy in Ontario before and after publication of the Women's Health Initiative Study. **JAMA**, v. 289, n. 24, p. 3241-2, Jun 2003.

AYERS, B.; FORSHAW, M.; HUNTER, M. S. The impact of attitudes towards the menopause on women's symptom experience: a systematic review. **Maturitas**, v. 65, n. 1, p. 28-36, Jan 2010.

BACHUS, M. A. HIV and the older adult. **J Gerontol Nurs**, v. 24, n. 11, p. 41-6, Nov 1998.

BARNABEI, V. M. et al. Menopausal symptoms and treatment-related effects of estrogen and progestin in the Women's Health Initiative. **Obstet Gynecol**, v. 105, n. 5 Pt 1, p. 1063-73, May 2005.

BARRETT-CONNOR, E. Hormone replacement therapy. **BMJ**, v. 15, n. 317, p. 457-61. Aug 1998.

BARTON, D. L. et al. Prospective evaluation of vitamin E for hot flashes in breast cancer survivors. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 2, p. 495-500, Feb 1998.

BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 225-36, Jan 2014.

BERENDSEN, H. H. The role of serotonin in hot flushes. **Maturitas**, v. 36, n. 3, p. 155-64, Oct 2000.

BERGO, P. L. S.; FORIM, M. R. **Padronização de extratos de folhas de amoreira com potencial fitoestrogênico para uso no tratamento dos sintomas do climatério**. 2015. 268 f. Tese (Doutor em Ciências). Departamento de química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2015.

BIEGON, A. et al. Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain: modulation by chronic exposure to ovarian hormones. **Life Sci**, v. 32, n. 17, p. 2015-21, Apr 1983.

BILAL, I. et al. Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 4, p. 705-12, Oct 2014.

BLUM, I. et al. The effect of estrogen replacement therapy on plasma serotonin and catecholamines of postmenopausal women. **Isr J Med Sci**, v. 32, n. 12, p. 1158-62, Dec 1996.

BLUMEL, J. E. et al. Quality of life after the menopause: a population study. **Maturitas**, v. 34, n. 1, p. 17-23, Jan 2000.

BLUMEL, J. E. et al. Relationship between psychological complaints and vasomotor symptoms during climacteric. **Maturitas**, v. 49, n. 3, p. 205-10, Nov 2004.

BLUMEL, J. E. et al. Menopause or climacteric, just a semantic discussion or has it clinical implications? **Climacteric**, v. 17, n. 3, p. 235-41, Jun 2014.

BOLANOS-DIAZ, R. et al. Soy extracts versus hormone therapy for reduction of menopausal hot flushes: indirect comparison. **Menopause**, v. 18, n. 7, p. 825-9, Jul 2011.

BOLCA, S. et al. Disposition of soy isoflavones in normal human breast tissue. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 4, p. 976-84, Apr 2010.

BORRELLI, F.; ERNST, E. Alternative and complementary therapies for the menopause. **Maturitas**, v. 66, n. 4, p. 333-43, Aug 2010.

BOULET, M. J. et al. Climacteric and menopause in seven South-east Asian countries. **Maturitas**, v. 19, n. 3, p. 157-76, Oct 1994.

BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. SAÚDE, M. D. Brasília: Ministério da Saúde: 156 p. 2012.

_____. **Protocolos de Atenção Básica: saúde das mulheres**. PESQUISA., M. D. S. I. S.-L. D. E. E. Brasília: MS/CGDI: 230 p. 2016.

BRAUNSTEIN, G. D. Management of female sexual dysfunction in postmenopausal women by testosterone administration: safety issues and controversies. **J Sex Med**, v. 4, n. 4 Pt 1, p. 859-66, Jul 2007a.

_____. Safety of testosterone treatment in postmenopausal women. **Fertil Steril**, v. 88, n. 1, p. 1-17, Jul 2007b.

BROMBERGER, J. T.; KRAVITZ, H. M. Mood and menopause: findings from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) over 10 years. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 38, n. 3, p. 609-25, Sep 2011.

BROMBERGER, J. T. et al. Risk factors for major depression during midlife among a community sample of women with and without prior major depression: are they the same or different? **Psychol Med**, v. 45, n. 8, p. 1653-64, Jun 2015.

BRUCE, D.; RYMER, J. Symptoms of the menopause. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 23, n. 1, p. 25-32, Feb 2009.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales**. Paris: Lavoisier, 1993. 915

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. D. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, Feb 2012.

BRZEZINSKI, A. et al. Short-term Effects of Phytoestrogen-rich Diet on Postmenopausal Women. **Menopause**, v. 4, n. 2, p. 89-94, June 1997.

BU, L.; LEPHART, E. D. Soy isoflavones modulate the expression of BAD and neuron-specific beta III tubulin in male rat brain. **Neurosci Lett**, v. 385, n. 2, p. 153-7, Sep 2005.

BULCHANDANI, S.; TOOZS-HOBSON, P. Urogynecological effects of menopause. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 73-77, Jan 2014.

BUTLER, L.; SANTORO, N. The reproductive endocrinology of the menopausal transition. **Steroids**, v. 76, n. 7, p. 627-35, Jun 2011.

CAI, Q.; WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. **Nutr Cancer**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 1996.

CALIN-SANCHEZ, A. et al. Bioactive compounds and sensory quality of black and white mulberries grown in Spain. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 68, n. 4, p. 370-7, Dec 2013.

CARLSON, S. et al. Effects of botanical dietary supplements on cardiovascular, cognitive, and metabolic function in males and females. **Gend Med**, v. 5 Suppl A, p. S76-90, Mar 2008.

CASPER, R. F.; YEN, S. S. Neuroendocrinology of menopausal flushes: an hypothesis of flush mechanism. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 22, n. 3, p. 293-312, Mar 1985.

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K. D. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v. 60, n. 3, p. 333-40, Sep 1994.

CASTELO-BRANCO, C. et al. Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. **Maturitas**, v. 52 Suppl 1, p. S46-52, Nov 15 2005.

CASTRO, A. S. **Efeito de *Morus nigra* L. como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas**. 2010. 65f. Mestrado (Mestre em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

CETISLI, N. E.; SARUHAN, A.; KIVCAK, B. The effects of flaxseed on menopausal symptoms and quality of life. **Holist Nurs Pract**, v. 29, n. 3, p. 151-7, May-Jun 2015.

CHAN, K.-C. et al. Mulberry polyphenols induce cell cycle arrest of vascular smooth muscle cells by inducing NO production and activating AMPK and p53. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 604-613, 2015/05/01/ 2015.

CHEDRAUI, P. et al. Perceived control over menopausal hot flushes in mid-aged women. **Gynecol Endocrinol**, v. 26, n. 8, p. 607-11, Aug 2010.

CHEN, H. et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153080, Aug 2016.

CHEN, H. et al. Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries. **Molecules**, v. 23, n. 1, Dec 2017.

- CHEN, J. et al. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. **Food Funct**, v. 6, n. 3, p. 995-1000, Mar 2015.
- CHEN, J. L.-Y. et al. Natural products targeting telomere maintenance. **MedChemComm**, v. 2, n. 4, p. 229-245, Jan 2011.
- CHU, Z. H. et al. [Effects of deguelin on proliferation and apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway]. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 9, n. 5, p. 533-8, May 2011.
- CICONELLI, R. M. et al. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). **Rev. bras. reumatol**, v. 39, n. 3, p. 143-50, Jun 1999.
- CIOTTA, L. et al. [Clinical effects of treatment with phytoestrogens in postmenopausal women]. **Minerva Ginecol**, v. 64, n. 1, p. 15-22, Feb 2012.
- CIRCOSTA, C. et al. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. **Phytother Res**, v. 20, n. 8, p. 665-9, Aug 2006.
- CLERICI, C. et al. Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk. **J Nutr**, v. 137, n. 10, p. 2270-8, Oct 2007.
- COSTA, J. G. et al. Combined exercise training reduces climacteric symptoms without the additive effects of isoflavone supplementation: A clinical, controlled, randomised, double-blind study. **Nutr Health**, v. 23, n. 4, p. 271-279, Dec 2017.
- COTRIM, C. Z. et al. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. **Oncogene**, v. 32, n. 19, p. 2390-402, May 9 2013.
- COXAM, V. Phyto-oestrogens and bone health. **Proc Nutr Soc**, v. 67, n. 2, p. 184-95, May 2008.
- CRANDALL, C. J. et al. Associations of menopausal vasomotor symptoms with fracture incidence. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 2, p. 524-34, Feb 2015.
- CRANDALL, C. J. et al. Breast tenderness and breast cancer risk in the estrogen plus progestin and estrogen-alone women's health initiative clinical trials. **Breast Cancer Res Treat**, v. 132, n. 1, p. 275-85, Feb 2012.
- CRUZ, E. F.; NINA, V. J.; FIGUEREDO, E. D. Climacteric Symptoms and Sexual Dysfunction: Association between the Blatt-Kupperman Index and the Female Sexual Function Index. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 39, n. 2, p. 66-71, Feb 2017.

CURCIO, J. J. et al. Is bio-identical hormone replacement therapy safer than traditional hormone replacement therapy?: a critical appraisal of cardiovascular risks in menopausal women. **Treat Endocrinol**, v. 5, n. 6, p. 367-74, Sep 2006.

CYR, M.; BOSSE, R.; DI PAOLO, T. Gonadal hormones modulate 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors: emphasis on the rat frontal cortex. **Neuroscience**, v. 83, n. 3, p. 829-36, Apr 1998.

DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; ZENI, A. L. B. Morus nigra and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. **Metab Brain Dis**, v. 32, n. 6, p. 1963-1973, Dec 2017.

DE FREITAS, M. M. et al. Extracts of Morus nigra L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163130, Jun 2016.

DE QUEIROZ, G. T. et al. Efficacy of Morus nigra L. on reproduction in female Wistar rats. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 3-4, p. 816-22, Mar 2012.

DEECHER, D. et al. From menarche to menopause: exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 3-17, Jan 2008.

DEECHER, D. C. Physiology of thermoregulatory dysfunction and current approaches to the treatment of vasomotor symptoms. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 14, n. 4, p. 435-48, Apr 2005.

DEMETRIO, F. N.; VIREIRA FILHO, A. H.; GUERRA, A. H. Efeito da terapia de reposição estrogênica no humor em mulheres menopausadas. *Rev Psiquiatr Clin*, v. 28, n. 2, p. 72-88, 2001.

DIXON, R. A. Phytoestrogens. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 225-61, Feb 2004.

DREW, O.; SHERRARD, J. Sexually transmitted infections in the older woman. **Menopause Int**, v. 14, n. 3, p. 134-5, Sep 2008.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, Jan 2007.

_____. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 1, p. 41-46, Mar 2008.

FARO, S. et al. Vaginal flora and pelvic inflammatory disease. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 2 Pt 2, p. 470-4, Aug 1993.

FARZAEI, M. H. et al. Scientific Evaluation of Edible Fruits and Spices Used for the Treatment of Peptic Ulcer in Traditional Iranian Medicine. **ISRN Gastroenterology**, v. 2013, p. 12, Nov 2013.

FRANKE, A. A. et al. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 208, n. 1, p. 18-26, Jan 1995.

FREEDMAN, R. R. Pathophysiology and treatment of menopausal hot flashes. **Semin Reprod Med**, v. 23, n. 2, p. 117-25, May 2005.

FREEDMAN, R. R.; KRELL, W. Reduced thermoregulatory null zone in postmenopausal women with hot flashes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 1, p. 66-70, Jul 1999.

FREEDMAN, R. R. et al. Core body temperature and circadian rhythm of hot flashes in menopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 8, p. 2354-8, Aug 1995.

FREEMAN, E. W. et al. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 375-82, Apr 2006.

FUKAI, T.; KAITOU, K.; TERADA, S. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 708-11, Dec 2005.

GAMBACCIANI, M. et al. Menopause and hormone replacement therapy: the 2017 Recommendations of the Italian Menopause Society. **Minerva Ginecol**, v. 70, n. 1, p. 27-34, Feb 2018.

GAO, L. et al. Influence of hormone therapy or *C. foetida* extract on breast tenderness in postmenopausal women. **Climacteric**, v. 21, n. 3, p. 292-297, Jun 2018.

GELLER, S. E.; STUDEE, L. Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what does not. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 14, n. 7, p. 634-49, Sep 2005.

GENAZZANI, A. R. et al. The European Menopause Survey 2005: women's perceptions on the menopause and postmenopausal hormone therapy. **Gynecol Endocrinol**, v. 22, n. 7, p. 369-75, Jul 2006.

GENCEL, V. B. et al. Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. **Mini Rev Med Chem**, v. 12, n. 2, p. 149-74, Feb 2012.

GLAZIER, M. G.; BOWMAN, M. A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Arch Intern Med**, v. 161, n. 9, p. 1161-72, May 14 2001.

GONZALES, G. F.; CARRILLO, C. Blood serotonin levels in postmenopausal women: effects of age and serum oestradiol levels. **Maturitas**, v. 17, n. 1, p. 23-9, Jul 1993.

GRATZKE, C. et al. Effects of long-term dietary soy treatment on female urethral morphology and function in ovariectomized nonhuman primates. **J Urol**, v. 180, n. 5, p. 2247-53, Nov 2008.

GUNDLAH, C.; LU, N. Z.; BETHEA, C. L. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei.

Psychopharmacology (Berl), v. 160, n. 3, p. 271-82, Mar 2002.

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

HALL, J. E. Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 637-59, Dec 2004.

HALLMANN-MIKOLAJCZAK, A. [Ebers Papyrus. The book of medical knowledge of the 16th century B.C. Egyptians]. **Arch Hist Filoz Med**, v. 67, n. 1, p. 5-14, Apr 2004.

HARRIS, D. M. et al. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 230, n. 8, p. 558-68, Sep 2005.

HASKELL, S. G. After the Women's Health Initiative: Postmenopausal women's experiences with discontinuing estrogen replacement therapy. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 13, n. 4, p. 438-42, May 2004.

HE, H.; LU, Y. H. Comparison of inhibitory activities and mechanisms of five mulberry plant bioactive components against alpha-glucosidase. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 34, p. 8110-9, Aug 28 2013.

HE, N. et al. Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis*. **Nature Communications**, v. 4, p. 2445, Sep 2013.

HICKEY, M. et al. Changes in endometrial blood vessels in the endometrium of women with hormone replacement therapy-related irregular bleeding. **Hum Reprod**, v. 18, n. 5, p. 1100-6, May 2003.

HOFFMANN, M. et al. Changes in women's attitudes towards and use of hormone therapy after HERS and WHI. **Maturitas**, v. 52, n. 1, p. 11-17, Sep 2005.

HSIEH, C. J. et al. Molecular Mechanisms of Anticancer Effects of Phytoestrogens in Breast Cancer. **Curr Protein Pept Sci**, v. 19, n. 3, p. 323-332, Nov 2018.

HUNTER, M. S.; CHILCOT, J. Testing a cognitive model of menopausal hot flashes and night sweats. **J Psychosom Res**, v. 74, n. 4, p. 307-12, Apr 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico 2010** 2010.

IQBAL, S. et al. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (*Morus* sp.): a comparative study. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 6, p. 6651-64, Aug 2012.

JACOB, D. A. et al. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor alpha. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 4, p. 301-6, Apr 2001.

JENKS, B. H. et al. A pilot study on the effects of S-equol compared to soy isoflavones on menopausal hot flash frequency. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 21, n. 6, p. 674-82, Jun 2012.

JIANG G, Z. T., ZHOU Y, MA Q. Effect of puerarin on vaginal connective tissue in patients with pelvic organ prolapse. **Int J Clin Exp Med**, v. 10, n. 1, p. 732 – 738, 2017.

JOFFE, H.; MASSLER, A.; SHARKEY, K. M. Evaluation and management of sleep disturbance during the menopause transition. **Semin Reprod Med**, v. 28, n. 5, p. 404-21, Sep 2010.

JOFFE, H. et al. Depression is associated with worse objectively and subjectively measured sleep, but not more frequent awakenings, in women with vasomotor symptoms. **Menopause**, v. 16, n. 4, p. 671-9, Jul-Aug 2009.

JUDD, H. L. et al. Estrogen replacement therapy. **Obstet Gynecol**, v. 58, n. 3, p. 267-75, Sep 1981.

JUNIOR, I. et al. Brazilian Morus nigra Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **ScientificWorldJournal**, v. 2017, p. 5275813, Feb 2017.

KAARI, C. et al. Randomized clinical trial comparing conjugated equine estrogens and isoflavones in postmenopausal women: a pilot study. **Maturitas**, v. 53, n. 1, p. 49-58, Jan 2006.

KAMILOGLU, S. et al. Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (*Morus nigra* L.) products. **J Berry Research**, v. 3, n. 1, p.41-51, Feb 2013.

KANG, H. J.; ANSBACHER, R.; HAMMOUD, M. M. Use of alternative and complementary medicine in menopause. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 79, n. 3, p. 195-207, Dec 2002.

KIRICHENKO, T. V. et al. Phytoestrogen-Rich Natural Preparation for Treatment of Climacteric Syndrome and Atherosclerosis Prevention in Perimenopausal Women. **Phytother Res**, v. 31, n. 8, p. 1209-1214, Aug 2017.

KOPERA, H.; VAN KEEP, P. A. Development and present state of hormone replacement therapy. **International Journal of Clinical Pharmacology Therapy and Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 412-417, Aug 1991.

KRAVITZ, H. M. et al. Sleep disturbance during the menopausal transition in a multi-ethnic community sample of women. **Sleep**, v. 31, n. 7, p. 979-90, Jul 2008.

KREYDIN, E. I. et al. Urinary Lignans Are Associated With Decreased Incontinence in Postmenopausal Women. **Urology**, v. 86, n. 4, p. 716-20, Oct 2015.

KRONENBERG, F.; DOWNEY, J. A. Thermoregulatory physiology of menopausal hot flashes: a review. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 1312-24, Jun 1987.

KUPPERMAN, H. S. et al. Comparative clinical evaluation of estrogenic preparations by the menopausal and amenorrheal indices. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 13, n. 6, p. 688-703, Jun 1953.

KWON, H. J.; KIM, Y. Y.; CHOUNG, S. Y. Amelioration effects of traditional Chinese medicine on alcohol-induced fatty liver. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 35, p. 5512-6, Sep 2005.

LAMBRINOUDAKI, I. Progestogens in postmenopausal hormone therapy and the risk of breast cancer. **Maturitas**, v. 77, n. 4, p. 311-7, Apr 2014.

LAWTON, B. et al. Changes in use of hormone replacement therapy after the report from the Women's Health Initiative: cross sectional survey of users. **BMJ**, v. 327, n. 7419, p. 845-6, Oct 2003.

LAZAR, F., JR. et al. The attitude of gynecologists in Sao Paulo, Brazil 3 years after the Women's Health Initiative study. **Maturitas**, v. 56, n. 2, p. 129-41, Feb 2007.

LETHABY, A.; AYELEKE, R. O.; ROBERTS, H. Local oestrogen for vaginal atrophy in postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 8, p. CD001500, Aug 31 2016.

LETHABY, A. et al. Hormone replacement therapy for cognitive function in postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD003122, Jan 2008.

LETHABY, A. et al. Phytoestrogens for menopausal vasomotor symptoms. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 12, p. CD001395, Dec 10 2013.

LI, Y. et al. Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. **Mol Cancer**, v. 12, p. 9, Feb 4 2013.

LIGGINS, J. et al. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **J Nutr Biochem**, v. 11, n. 6, p. 326-31, Jun 2000.

LINNAEI, C. **Species plantarum** Stockholm: Laurentii Salvii, 1753. 1753

LISABETH, L.; BUSHNELL, C. Stroke risk in women: the role of menopause and hormone therapy. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 1, p. 82-91, Jan 2012.

LOPRINZI, C. L. et al. Venlafaxine in management of hot flashes in survivors of breast cancer: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 356, n. 9247, p. 2059-63, Dec 2000.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003. 368f

LUCCHESI, L. M. et al. Does menopause influence nocturnal awakening with headache? **Climacteric**, v. 16, n. 3, p. 362-8, Jun 2013.

- LUTHER, V. P.; WILKIN, A. M. HIV infection in older adults. **Clin Geriatr Med**, v. 23, n. 3, p. 567-83, vii, Aug 2007.
- MAHMUD, K. Natural hormone therapy for menopause. **Gynecol Endocrinol**, v. 26, n. 2, p. 81-5, Feb 2010.
- MALHEIROS, E. S. D. A. et al. Síndrome climatérica em uma cidade do Nordeste brasileiro: um inquérito domiciliar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, p. 163-169, 2014.
- MARINI, H. et al. Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: a follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 12, p. 4787-96, Dec 2008.
- MARINI, H. et al. Efficacy of genistein aglycone on some cardiovascular risk factors and homocysteine levels: A follow-up study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 20, n. 5, p. 332-40, Jun 2010.
- MARKIEWICZ, L. et al. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 45, n. 5, p. 399-405, May 1993.
- MARTIN, H. L. et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. **J Infect Dis**, v. 180, n. 6, p. 1863-8, Dec 1999.
- MASCARELLO, A. et al. Naturally occurring Diels-Alder-type adducts from *Morus nigra* as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B. **Eur J Med Chem**, v. 144, p. 277-288, Jan 20 2018.
- MATSUI, H. et al. Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes. **Cardiovasc Res**, v. 42, n. 1, p. 104-12, Apr 1999.
- MCEWEN, B. S.; ALVES, S. E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 279-307, Jun 1999.
- MEERAN, S. M. et al. Bioactive dietary supplements reactivate ER expression in ER-negative breast cancer cells by active chromatin modifications. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37748, 2012.
- MELBY, M. K. Chilliness: a vasomotor symptom in Japan. **Menopause**, v. 14, n. 4, p. 752-9, Jul-Aug 2007.
- MELIS, G. B. et al. Lack of any estrogenic effect of ipriflavone in postmenopausal women. **J Endocrinol Invest**, v. 15, n. 10, p. 755-61, Nov 1992.
- MELO, C. R. M. E. et al. Aplicação do Índice Menopausal de Kupperman: um estudo transversal com mulheres climatéricas. **Espaço para a Saúde**, v. 17, n. 2, p. 41-50, 2016.
- MESSINA, M. Investigating the optimal soy protein and isoflavone intakes for women: a perspective. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 4, n. 4, p. 337-56, Jul 2008.

MINKIN, M. J. Sexually transmitted infections and the aging female: placing risks in perspective. **Maturitas**, v. 67, n. 2, p. 114-6, Oct 2010.

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU rev**, v. 36, n. 1, Oct 2010.

MOREIRA, A. C. et al. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, n. 0, p. 61-71, Sep 2014.

MORRISON, J. H. et al. Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. **J Neurosci**, v. 26, n. 41, p. 10332-48, Oct 11 2006.

MOSES-KOLKO, E. L. et al. Serotonin 1A receptor reductions in postpartum depression: a positron emission tomography study. **Fertil Steril**, v. 89, n. 3, p. 685-92, Mar 2008.

MRKVICKA, A. Botanik im Bild. Flora von Österreich, Liechtenstein und Südtirol. 2010.

MUHLEISEN, A. L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Menopause and the vaginal microbiome. **Maturitas**, v. 91, p. 42-50, Sep 2016.

MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S. R. Clinical review 92: Phytoestrogens. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 2, p. 297-303, Feb 1998.

MURRAY, D.; STOESSL, A. J. Mechanisms and therapeutic implications of the placebo effect in neurological and psychiatric conditions. **Pharmacol Ther**, v. 140, n. 3, p. 306-18, Dec 2013.

NADERI, G. A. et al. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytother Res**, v. 18, n. 5, p. 365-9, May 2004.

NAHÁS, E. A. P. et al. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, p. 337-343, 2003.

NAMS: NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 7, n. 4, p. 215-29, Jul-Aug 2000.

_____. Role of progestogen in hormone therapy for postmenopausal women: position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 10, n. 2, p. 113-32, Mar-Apr 2003.

_____. The 2012 hormone therapy position statement of: The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 19, n. 3, p. 257-71, Mar 2012.

_____. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 24, n. 7, p. 728-753, Jul 2017.

NAPPI, R. E.; DAVIS, S. R. The use of hormone therapy for the maintenance of urogynecological and sexual health post WHI. **Climacteric**, v. 15, n. 3, p. 267-74, Jun 2012.

NATURALIS BIODIVERSITY CENTER. Interagency Taxonomic System - ITIS. Catalogue of life: 2017 annual checklist. 2017. Acesso em: 05 de fev 2018.

NELSON, H. D. Menopause. **Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760-70, Mar 2008.

NEVES, E. C. M. et al. EMAS position statement: The ten point guide to the integral management of menopausal health. **Maturitas**, v. 81, n. 1, p. 88-92, May 2015.

NIKOV, G. N. et al. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. **Environ Health Perspect**, v. 108, n. 9, p. 867-72, Sep 2000.

NOMURA, T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. **Fortschr Chem Org Naturst**, v. 53, p. 87-201, 1988.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. **Nat Prod Rep**, v. 11, n. 2, p. 205-18, Apr 1994.

OCCHIUTO, F. et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. **Phytother Res**, v. 21, n. 2, p. 130-4, Feb 2007.

OLIVEIRA, A. C. B. et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 244-249, Feb 2013.

PACELLO, P. et al. Prevalence of hormone therapy, factors associated with its use, and knowledge about menopause: a population-based household survey. **Menopause**, Jan 2018.

PADILHA, M. M. et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytother Res**, v. 24, n. 10, p. 1496-500, Oct 2010.

PAINULY, D. et al. Physical evaluation, proximate analysis and antimicrobial activity of *Morus Nigra* seeds. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 7, n. 1, p.191-197, Oct 2015.

PAN, H. et al. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-kappaB activity via the Notch-1 pathway. **Int J Mol Med**, v. 30, n. 2, p. 337-43, Aug 2012.

PANAHI, Y. et al. Comparison of piascledine (avocado and soybean oil) and hormone replacement therapy in menopausal-induced hot flashing. **Iran J Pharm Res**, v. 10, n. 4, p. 941-51, Fall 2011.

PARK, J. H.; VIIRRE, E. Vestibular migraine may be an important cause of dizziness/vertigo in perimenopausal period. **Med Hypotheses**, v. 75, n. 5, p. 409-14, Nov 2010.

- PATERNI, I. et al. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13-29, Nov 2014.
- PERHEENTUPA, A.; HUHTANIEMI, I. Aging of the human ovary and testis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 299, n. 1, p. 2-13, Feb 5 2009.
- PINES, A. Guidelines and recommendations on hormone therapy in the menopause. **J Midlife Health**, v. 1, n. 1, p. 41-2, Jan 2010.
- PINKERTON, J. V. et al. Relationship between changes in vasomotor symptoms and changes in menopause-specific quality of life and sleep parameters. **Menopause**, v. 23, n. 10, p. 1060-6, Oct 2016.
- POLUZZI, E. et al. Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. **Curr Med Chem**, v. 21, n. 4, p. 417-36, 2014.
- POTTER, S. M. et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 6 Suppl, p. 1375S-1379S, Dec 1998.
- PRIOR, J. C. Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. **Endocr Rev**, v. 19, n. 4, p. 397-428, Aug 1998.
- QADIR, M. I.; ALI, M.; IBRAHIM, Z. Anticancer activity of Morus nigra leaves extract. **2014**, v. 9, n. 4, p. 2, 2014-10-09 2014.
- QUELLA, S. K. et al. Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: A North Central Cancer Treatment Group Trial. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 5, p. 1068-74, Mar 2000.
- RAHIMI-MADISEH, M. et al. Renal biochemical and histopathological alterations of diabetic rats under treatment with hydro alcoholic Morus nigra extract. **J Renal Inj Prev**, v. 6, n. 1, p. 56-60, 2017.
- RAHN, D. D. et al. Vaginal estrogen for genitourinary syndrome of menopause: a systematic review. **Obstet Gynecol**, v. 124, n. 6, p. 1147-56, Dec 2014.
- REMPORT, J.; BLAZOVICS, A. [Phytoestrogens in the treatment of menopause]. **Orv Hetil**, v. 158, n. 32, p. 1243-1251, Aug 2017.
- RIETJENS, I.; LOUISSE, J.; BEEKMANN, K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 11, p. 1263-1280, Jun 2017.
- RIETJENS, I. M. et al. Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 1, p. 100-13, Jan 2013.
- ROBERTS, H.; HICKEY, M. Managing the menopause: An update. **Maturitas**, v. 86, p. 53-8, Apr 2016.

- RODRIGUEZ-LANDA, J. F. et al. The Phytoestrogen Genistein Produces Similar Effects as 17beta-Estradiol on Anxiety-Like Behavior in Rats at 12 Weeks after Ovariectomy. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 9073816, Jun 2017.
- RODRIGUEZ, C. et al. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. **JAMA**, v. 285, n. 11, p. 1460-5, Mar 21 2001.
- ROSA, R. C.; RIBEIRO, L. R.; SOUZA, A. M. G. Triagem fitoquímica dos extratos aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*. **Conexão Ciência**, v. 11, n. 1, p. 44-51, Jan 2016.
- ROSENBERG, J.; HOLST LARSEN, S. Hypothesis: Pathogenesis of postmenopausal hot flush. **Medical Hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 349-350, Oct 1991.
- ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 321-33, Jul 2002.
- RUBINOW, D. R. et al. Efficacy of Estradiol in Perimenopausal Depression: So Much Promise and So Few Answers. **Depress Anxiety**, v. 32, n. 8, p. 539-49, Aug 2015.
- SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M. et al. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1039-1046, Oct 2015.
- SCHULZ V, H. R., TYLER VE. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. São Paulo: Manole, 2002.
- SHANAFELT, T. D. et al. Pathophysiology and treatment of hot flashes. **Mayo Clin Proc**, v. 77, n. 11, p. 1207-18, Nov 2002.
- SILVA, I. et al. **Avaliação do potencial estrogênico de *Morus sp* em ratas Wistar**. Centro de Biologia da Reprodução. Juiz de Fora, p. 49-57. 2003
- SILVA, S. N. **Atividade Fitoestrogênica de *Morus Nigra* L, Moraceae, em ratas ovariectomizadas**. 2012. 126f Tese (Doutor em Biotecnologia). Universidade Federal do Maranhão, Sao Luiz. 2012.
- SIMON, J. A.; MAAMARI, R. V. Ultra-low-dose vaginal estrogen tablets for the treatment of postmenopausal vaginal atrophy. **Climacteric**, v. 16 Suppl 1, p. 37-43, Aug 2013.
- SINHA, S. et al. Epigenetic reactivation of p21CIP1/WAF1 and KLOTHO by a combination of bioactive dietary supplements is partially ERalpha-dependent in ERalpha-negative human breast cancer cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 406, p. 102-14, May 5 2015.
- SOARES, C. N. Depression and Menopause: Current Knowledge and Clinical Recommendations for a Critical Window. **Psychiatr Clin North Am**, v. 40, n. 2, p. 239-254, Jun 2017.

IMS: INTERNATIONAL MENOPAUSE SOCIETY Menopause Terminology. Disponível em <<http://www.imsociety.org/menopause_terminology.php>>. Acesso em Jan 2018.

SONG, W. et al. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 19, p. 9133-40, Oct 2009.

SONG, W. O. et al. Soy isoflavones as safe functional ingredients. **J Med Food**, v. 10, n. 4, p. 571-80, Dec 2007.

SOULES, M. R. et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). **Fertil Steril**, v. 76, n. 5, p. 874-8, Nov 2001.

SOUZA, G. R. et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Braz J Biol**, p. 0, Aug 2017.

SOUZA, R. G. et al. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 36, n. 1, p. 137-142, Nov 2015.

SPRAGUE, B. L.; TRENTAM-DIETZ, A.; CRONIN, K. A. A sustained decline in postmenopausal hormone use: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2010. **Obstet Gynecol**, v. 120, n. 3, p. 595-603, Sep 2012.

STOLBERG, M. From the "climacteric disease" to the "male climacteric" The historical origins of a modern concept. **Maturitas**, v. 58, n. 2, p. 111-6, Oct 20 2007.

STULIKOVA, K. et al. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. **Molecules**, v. 23, n. 3, Mar 2018.

STUTE, P. et al. Ultra-low dose - new approaches in menopausal hormone therapy. **Climacteric**, v. 18, n. 2, p. 182-6, Apr 2015.

SYAH, Y. M. et al. Andalasin A, a new stilbene dimer from *Morus macroura*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 630-5, Dec 2000.

TAKU, K. et al. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Menopause**, v. 19, n. 7, p. 776-90, Jul 2012.

TALLINI, L. R. et al. Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 219-227, Nov 2015.

TEMEL, S. et al. Expression of estrogen receptor-alpha and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3974-83, Oct 2002.

THOMPSON, L. U. et al. Mammalian lignan production from various foods. **Nutr Cancer**, v. 16, n. 1, p. 43-52, 1991.

TISSIER, R. et al. Pharmacological postconditioning with the phytoestrogen genistein. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, n. 1, p. 79-87, Jan 2007.

- TOMASZEWSKI, J. et al. [Effect of 17 beta-estradiol and phytoestrogen daidzein on the proliferation of pubocervical fascia and skin fibroblasts derived from women suffering from stress urinary incontinence]. **Ginekol Pol**, v. 74, n. 10, p. 1410-4, Oct 2003.
- TOYOHIRA, Y. et al. Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenaline transporter and serotonin transporter activity. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 4, p. 516-24, Apr 2010.
- TRELOAR, A. E. Menstrual cyclicity and the pre-menopause. **Maturitas**, v. 3, n. 3-4, p. 249-64, Dec 1981.
- TURGUT, N. H. et al. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of D-galactose-induced aging mice. **Pharm Biol**, v. 54, n. 6, p. 1052-64, 2016.
- VAN DER WOUDE, H. et al. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 8, p. 763-71, Aug 2005.
- VIEIRA, L. H. L. et al. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equínos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 248-252, 2007.
- VILLA, P. et al. The impact of combined nutraceutical supplementation on quality of life and metabolic changes during the menopausal transition: a pilot randomized trial. **Arch Gynecol Obstet**, v. 296, n. 4, p. 791-801, Oct 2017.
- VISSER, J. A. et al. Anti-Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 6, p. 331-41, Jan 10 2012.
- VOLPATO, G. et al. Avaliação do efeito do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* (Amora) no binômio diabete e gravidez. **Diabetes Clínica**, v. 5, p. 340-345, 2005.
- WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1215, p. 9-15, Jan 2011.
- WANG, C. P. et al. Mulberroside a possesses potent uricosuric and nephroprotective effects in hyperuricemic mice. **Planta Med**, v. 77, n. 8, p. 786-94, May 2011.
- WEBER, M. T.; MAKI, P. M.; MCDERMOTT, M. P. Cognition and mood in perimenopause: a systematic review and meta-analysis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 142, p. 90-8, Jul 2014.
- WEI, H. Photoprotective action of isoflavone genistein: Models, mechanisms, and relevance to clinical dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 2, p. 271-272, 1998.
- WENTZ, W. B. Progestin therapy in endometrial hyperplasia. **Gynecol Oncol**, v. 2, n. 2-3, p. 362-7, Aug 1974.

WHITEHEAD, M. I.; FRASER, D. Controversies concerning the safety of estrogen replacement therapy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 156, n. 5, p. 1313-1322,

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research on the Menopause in the 1990s**. Geneva: 16 p. 1996.

WILLIAMS, R. E. et al. Healthcare seeking and treatment for menopausal symptoms in the United States. **Maturitas**, v. 58, n. 4, p. 348-58, Dec 2007.

WOODS, N. F.; MITCHELL, E. S.; SMITH-DI JULIO, K. Sexual desire during the menopausal transition and early postmenopause: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 19, n. 2, p. 209-18, Feb 2010.

WU, Z. M. et al. Genistein alleviates anxiety-like behaviors in post-traumatic stress disorder model through enhancing serotonergic transmission in the amygdala. **Psychiatry Res**, v. 255, p. 287-291, Sep 2017.

XU, L. J. et al. Isoprenylated flavonoids from *Morus nigra* and their PPAR gamma agonistic activities. **Fitoterapia**, Feb 8 2018.

XU, M. et al. Phytotherapy versus hormonal therapy for postmenopausal bone loss: a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v. 20, n. 4, p. 519-26, Apr 2009.

YANG, X. et al. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 61, n. 19, p. 7025-9, Oct 1 2001.

YEARLEY, E. J. et al. Binding of genistein to the estrogen receptor based on an experimental electron density study. **J Am Chem Soc**, v. 129, n. 48, p. 15013-21, Dec 5 2007.

YOUNES, M.; HONMA, N. Estrogen receptor beta. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 1, p. 63-6, Jan 2011.

ZENI, A. L. B. et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **An Acad Bras Cienc**, v. 89, n. 4, p. 2805-2815, Oct-Dec 2017.

ZERN, T. L. et al. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. **J Nutr**, v. 135, n. 8, p. 1911-7, Aug 2005.

ZHANG, G.; QIN, L.; SHI, Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 7, p. 1072-9, Jul 2007.

ZHENG, Z. P. et al. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 9, p. 5368-73, May 12 2010.

ANEXOS

ANEXO A - Índice de Blatt-Kupperman – IBK.

CALCULADORA DO ÍNDICE DE KUPPERMAN

O Índice Menopausal de Kupperman avalia a intensidade dos sintomas climatéricos e é usado como referência pelos médicos ginecologistas. A classificação vai de leve e moderado a intenso e ajuda a identificar a aproximação da menopausa em mulheres bastante sintomáticas.

| SINTOMAS | LEVES | MODERADOS | INTENSOS |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| ONDAS DE CALOR | 4 <input type="radio"/> | 8 <input type="radio"/> | 12 <input type="radio"/> |
| PARESTESIA | 2 <input type="radio"/> | 4 <input type="radio"/> | 6 <input type="radio"/> |
| INSÔNIA | 2 <input type="radio"/> | 4 <input type="radio"/> | 6 <input type="radio"/> |
| NERVOSISMO | 2 <input type="radio"/> | 4 <input type="radio"/> | 6 <input type="radio"/> |
| DEPRESSÃO | 1 <input type="radio"/> | 2 <input type="radio"/> | 3 <input type="radio"/> |
| FADIGA | 1 <input type="radio"/> | 2 <input type="radio"/> | 3 <input type="radio"/> |
| ARTRALGIA/MIALGIA | 1 <input type="radio"/> | 2 <input type="radio"/> | 3 <input type="radio"/> |
| CEFALÉIA | 1 <input type="radio"/> | 2 <input type="radio"/> | 3 <input type="radio"/> |
| PALPITAÇÃO | 1 <input type="radio"/> | 2 <input type="radio"/> | 3 <input type="radio"/> |
| ZUMBIDO NO OUVIDO | 1 <input type="radio"/> | 2 <input type="radio"/> | 3 <input type="radio"/> |

Resultado: 0

LEVES - ATÉ 19 / MODERADOS - DE 20 A 35 / INTENSOS - MAIS DE 35

Referência: KUPPERMAN, H. S.; BLATT, M. H. G. Menopausal indice. J Clin Endocrinol. v. 13, n.1, p. 888-894, 1953.

ANEXO B - Questionário sobre Qualidade de Vida SF – 36.

Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida -SF-36

1- Em geral você diria que sua saúde é:

| | | | | |
|-----------|-----------|-----|------|------------|
| Excelente | Muito Boa | Boa | Ruim | Muito Ruim |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

| | | | | |
|--------------|-----------------|---------------|---------------|------------|
| Muito Melhor | Um Pouco Melhor | Quase a Mesma | Um Pouco Pior | Muito Pior |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

| Atividades | Sim, dificuldade muito | Sim, dificuldade um pouco | Não, não dificuldade de modo algum |
|---|------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos. | 1 | 2 | 3 |
| b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa. | 1 | 2 | 3 |
| c) Levantar ou carregar mantimentos | 1 | 2 | 3 |
| d) Subir vários lances de escada | 1 | 2 | 3 |
| e) Subir um lance de escada | 1 | 2 | 3 |
| f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se | 1 | 2 | 3 |
| g) Andar mais de 1 quilômetro | 1 | 2 | 3 |
| h) Andar vários quarteirões | 1 | 2 | 3 |
| i) Andar um quarteirão | 1 | 2 | 3 |
| j) Tomar banho ou vestir-se | 1 | 2 | 3 |

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

| | Sim | Não |
|---|-----|-----|
| a) Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades? | 1 | 2 |
| b) Realizou menos tarefas do que você gostaria? | 1 | 2 |
| c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades. | 1 | 2 |
| d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra). | 1 | 2 |

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

| | Sim | Não |
|--|-----|-----|
| a) Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades? | 1 | 2 |
| b) Realizou menos tarefas do que você gostaria? | 1 | 2 |
| c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz. | 1 | 2 |

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

| | | | | |
|------------------|--------------|---------------|----------|--------------|
| De forma nenhuma | Ligeiramente | Moderadamente | Bastante | Extremamente |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

| | | | | | |
|---------|------------|------|----------|-------|-------------|
| Nenhuma | Muito leve | Leve | Moderada | Grave | Muito grave |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

| | | | | |
|-------------------|----------|---------------|----------|--------------|
| De maneira alguma | Um pouco | Moderadamente | Bastante | Extremamente |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

| | Todo Tempo | A maior parte do tempo | Uma boa parte do tempo | Alguma parte do tempo | Uma pequena parte do tempo | Nunca |
|--|------------|------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-------|
| a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode animá-lo? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| i) Quanto tempo você tem se sentido cansado? | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

| | | | | |
|------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|
| Todo Tempo | A maior parte do tempo | Alguma parte do tempo | Uma pequena parte do tempo | Nenhuma parte do tempo |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

| | Definitivamente verdadeiro | A maioria das vezes verdadeiro | Não sei | A maioria das vezes falso | Definitivamente falso |
|---|----------------------------|--------------------------------|---------|---------------------------|-----------------------|
| a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| c) Eu acho que a minha saúde vai piorar | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| d) Minha saúde é excelente | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

CÁLCULO DOS ESCORES DO QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA

Fase 1: Ponderação dos dados

| Questão | Pontuação | |
|---------|--------------------------|-----------|
| 01 | Se a resposta for | Pontuação |
| | 1 | 5,0 |
| | 2 | 4,4 |
| | 3 | 3,4 |
| | 4 | 2,0 |
| | 5 | 1,0 |
| 02 | Manter o mesmo valor | |
| 03 | Soma de todos os valores | |
| 04 | Soma de todos os valores | |
| 05 | Soma de todos os valores | |
| 06 | Se a resposta for | Pontuação |
| | 1 | 5 |
| | 2 | 4 |
| | 3 | 3 |
| | 4 | 2 |
| | 5 | 1 |

| | | |
|----|--|---|
| 07 | Se a resposta for 1 2 3 4 5 6 | Pontuação 6,0 5,4 4,2 3,1 2,0 1,0 |
| 08 | <p>A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7</p> <p>Se 7 = 1 e: valor da questão é (6)</p> <p>Se 7 = 2 à 6: valor da questão é (5)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 2, o valor da questão é (4)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (3)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 4, o valor da questão é (2)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 5, o valor da questão é (1)</p> <p>Se a questão 7 não for respondida, o escore da questão 8 passa a ser o seguinte:</p> <p>Se a resposta for (1), a pontuação será (6)</p> <p>Se a resposta for (2), a pontuação será (4,75)</p> <p>Se a resposta for (3), a pontuação será (3,5)</p> <p>Se a resposta for (4), a pontuação será (2,25)</p> <p>Se a resposta for (5), a pontuação será (1,0)</p> | |
| 09 | <p>Nesta questão, a pontuação para os itens a, d, e ,h, deverá seguir a seguinte orientação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (6)</p> <p>Se a resposta for 2, o valor será (5)</p> <p>Se a resposta for 3, o valor será (4)</p> <p>Se a resposta for 4, o valor será (3)</p> <p>Se a resposta for 5, o valor será (2)</p> <p>Se a resposta for 6, o valor será (1)</p> <p>Para os demais itens (b, c, f, g, i), o valor será mantido o mesmo</p> | |
| 10 | Considerar o mesmo valor. | |
| 11 | <p>Nesta questão os itens deverão ser somados, porém os itens b e d deverão seguir a seguinte pontuação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (5)</p> <p>Se a resposta for 2, o valor será (4)</p> <p>Se a resposta for 3, o valor será (3)</p> <p>Se a resposta for 4, o valor será (2)</p> <p>Se a resposta for 5, o valor será (1)</p> | |

Fase 2: Cálculo do Raw Scale

Nesta fase você irá transformar o valor das questões anteriores em notas de 8 domínios que variam de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio. É chamado de raw scale porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

Domínio:

- Capacidade funcional
- Limitação por aspectos físicos
- Dor
- Estado geral de saúde
- Vitalidade
- Aspectos sociais
- Aspectos emocionais

- Saúde mental

Para isso você deverá aplicar a seguinte fórmula para o cálculo de cada domínio:

$$\text{Domínio: } \frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{Limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

Na fórmula, os valores de limite inferior e variação (Score Range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo.

| Domínio | Pontuação das questões correspondidas | Limite inferior | Variação |
|-----------------------------------|---|-----------------|----------|
| Capacidade funcional | 03 | 10 | 20 |
| Limitação por aspectos físicos | 04 | 4 | 4 |
| Dor | 07 + 08 | 2 | 10 |
| Estado geral de saúde | 01 + 11 | 5 | 20 |
| Vitalidade | 09 (somente os itens a + e + g + i) | 4 | 20 |
| Aspectos sociais | 06 + 10 | 2 | 8 |
| Limitação por aspectos emocionais | 05 | 3 | 3 |
| Saúde mental | 09 (somente os itens b + c + d + f + h) | 5 | 25 |

Exemplos de cálculos:

- Capacidade funcional: (ver tabela)

$$\text{Domínio: } \frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

$$\text{Capacidade funcional: } \frac{21 - 10}{20} \times 100 = 55$$

O valor para o domínio capacidade funcional é 55, em uma escala que varia de 0 a 100, onde o zero é o pior estado e cem é o melhor.

- Dor (ver tabela)
 - Verificar a pontuação obtida nas 07 e 08; por exemplo: 5,4 e 4, portanto somando-se as duas, teremos: 9,4

- Aplicar fórmula:

$$\text{Domínio: } \frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

$$\text{Dor: } \frac{9,4 - 2}{10} \times 100 = 74$$

O valor obtido para o domínio dor é 74, numa escala que varia de 0 a 100, onde zero é o pior estado e cem é o melhor.

Assim, você deverá fazer o cálculo para os outros domínios, obtendo oito notas no final, que serão mantidas separadamente, não se podendo soma-las e fazer uma média.

Obs.: A questão número 02 não faz parte do cálculo de nenhum domínio, sendo utilizada somente para se avaliar o quanto o indivíduo está melhor ou pior comparado a um ano atrás.

Se algum item não for respondido, você poderá considerar a questão se esta tiver sido respondida em 50% dos seus itens.

ANEXO C – Certificado de análise do pó da *Morus nigra* L.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

| | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|------------|
| Insuflor: | Amora Pó | Data de Análise: | 27-07-2018 |
| Lote Interno: | 16516-8936-015037 | Lote Fabricante: | MJT00528 |
| Data de Fabricação: | 17-07-2015 | Data de Validade: | 17-07-2018 |
| Origem: | Brasil | Procedência: | Brasil |
| Condições de Armazenamento: | Temperatura Ambiente | Ordem de Procedimento: | 005037 |

| | | | |
|--------------------|--|--|---|
| DCB: | - | DCI: | - |
| CAS: | - | Peso Molecular: | - |
| Fórmula Molecular: | - | | |
| Observação 1: | Família: <i>Rumicaceae</i> Nome Comum: Amora Pó | Medicinal: Amora Pó | |
| Observação 2: | Parte Utilizada: Frutas | Nome Científico: <i>Morus nigra</i> L. | |

| Testes | Especificações | Resultados | Unidade | Referências |
|-------------------------------|-------------------------|-------------|---------|-------------|
| Aspecto | Pó | Conforme | | Fabricante |
| Cor | esverdeado | Conforme | | Fabricante |
| Odo | Característico | Conforme | | Fabricante |
| Sabor | Característico | Conforme | | Fabricante |
| Água (Método anidrómetro) | ≤ 6 | 10,38 | % | Fabricante |
| Umidade | ≤ 10 | 7,17 | % | Fabricante |
| Matéria Sólida | ≤ 2 | Acentuado | % | Fabricante |
| pH (solução saturada 10%) | 5,0 - 7,0 | 6,81 | | Fabricante |
| Densidade aparente | 0,200 - 0,600 | 0,346 | g/mL | Fabricante |
| Solubilidade | Insolúvel em água | Conforme | | Fabricante |
| Determinação de Amido | Indetectável | Pó colorido | | Fabricante |
| Atividade | Teste de redução ≤ 0,12 | 0,15 | % | Fabricante |
| Testes Microbiológicos | | | | |
| Contagem total de bactérias | ≤ 10000 | De acordo | UFC/g | Fabricante |
| Fungos e leveduras | ≤ 100 | De acordo | UFC/g | Fabricante |
| Escherichia coli | Absente | De acordo | g | Fabricante |
| Salmonella | Absente | De acordo | 10g | Fabricante |
| Contagem total de esporos | Absente | De acordo | g | Fabricante |
| Resíduo de Sulfato Total em % | ≤ 100 | De acordo | UFC/g | Fabricante |



CERTIFICADO DE ANÁLISE

| | | | |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------|------------|
| Insunio | Amora Po | Data de Análise: | 27-07-2018 |
| Lote Interno: | HE16-2009-006937 | Lote Fabricante: | AUTO0036 |
| Data de Fabricação: | 17-07-2018 | Data de Validade: | 17-07-2018 |
| Origem: | Brasil | Procedência: | Brasil |
| Condições de Armazenamento: | Temperatura Ambiente | Ordem de Fracionamento: | 003837 |

| | | | |
|--------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|
| DCB: | - | DCH: | - |
| CAS: | - | Peso Molecular: | - |
| Fórmula Molecular: | - | | |
| Observação 1: | Família | Monoceto | |
| | Nome Comum | Amora Po | |
| Observação 2: | Parte Utilizada | Folhas | Nome Científico: Morus nigra L. |


* Realizado em laboratório próprio, no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêuticos Farmacêuticos LTDA. E os dados seguem a legislação vigente em vigor no Brasil.

Condição:

Aprovado: (X)
Rejeitado: ()


 Diretor Técnico
 Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêuticos
 CEP - 00.000.000


 Responsável Técnico
 João Paulo de Jesus Mendes
 CPF - 00.000.000


 Farmacêutico Responsável
 Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêuticos - CEP - 00.000.000
 Dados e informações complete nesta ou, favor ligar:
 (11) 4785-3248

Fim do Documento

ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO UFMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MORUS NIGRA L. EM MULHERES CLIMATÉRICAS

Pesquisador: Luciane Maria Oliveira Brito

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47657315.1.0000.5087

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HUUFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.804.512

Apresentação do Projeto:

O climatério consiste na transição da fase reprodutiva da mulher para a não reprodutiva, com o declínio gradual da função ovariana e a instalação da menopausa provocando modificações no corpo, elevando o risco para várias enfermidades e alterando negativamente a qualidade de vida das mulheres. A terapia de reposição hormonal (TRH), uso de estrogênio ou combinação de estrogênio com progesterona tem sido administrada para

amenizar os sintomas do climatério no entanto, devido aos efeitos adversos e falta de acompanhamento terapêutico, é indicada com cautela atualmente pelo desencadear de várias enfermidades nas usuárias. Assim muitas pacientes abandonaram a terapia hormonal e passaram a utilizar alternativas como as plantas medicinais e tem sido uma prática comum. A *Morus nigra* L., conhecida como amoreira ou amora preta que pertence ao gênero *Morus*, família *Moraceae*. É encontrada em todo o Brasil e é bem conhecida pelas suas propriedades medicinais. Contém uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides isoprenilados, estilbenos, cumarinas, cromonas e xantonas. As isoflavonas e estilbenos são classificados como fitoestrógenos. Os fitoestrógenos são compostos derivados de plantas, populares como alternativa à terapia com estrogênio/progesterona. A preferência crescente pelos fitoestrógenos é justificada pelos benefícios evidenciados que sugerem a diminuição do risco de câncer de mama e da incidência dos sintomas climatéricos. **Objetivo:** analisar os efeitos do uso da *Morus nigra* L. como terapia de

Endereço: Avenida das Portuguesas, 1908 CEB Vello
 Bairro: Bloco C, Sala T, Comitê de Ética CEP: 65.090-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO UFMA**



Continuação do Parecer: 1.094.012

| | | | | |
|---|-------------------------------|------------------------|------------------------------|--------|
| Infraestrutura | PARECER_COMIC.pdf | 18/09/2016 15:14:59 | JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA | Aceito |
| Cronograma | CRONOGRAMA.pdf | 18/09/2016 15:14:25 | JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_MORUS_NIGRA.pdf | 18/09/2016 15:05:59 | JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_MORUS_NIGRA.docx | 18/09/2016 15:05:33 | JOYCE PINHEIRO LEAL COSTA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha de Rosto Dr Luciane.pdf | 28/07/2015 22:13:18 | | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO LUIS, 03 de Novembro de 2016

**Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)**

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bixo C.Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040
UF: MA **Município:** SÃO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

ANEXO E - Termo de outorga da Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão (FAPEMA), por meio do edital 40/2014.

| ESTADO DO MARANHÃO | | Processo |
|---|---|--|
| FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO | | UNIVERSAL-00832/15 |
| TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO | | |
| IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE | | |
| NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br) | | |
| LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003. | | |
| ENDEREÇO: Rua Perdizes, nº 05, Qd 37, | BAIRRO / CEP: Jardim Renascença / 65075-340 | |
| RESPONSÁVEL: Alex Oliveira de Souza | CARGO: DIRETOR-PRESIDENTE | |
| IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO | | |
| NOME: LUCIANE MARIA OLIVEIRA BRITO | | |
| CPF: 042.071.493-68 | IDENTIDADE: 78601 | |
| BANCO: Brasil | Nº AGÊNCIA: 1878-3 | Nº CONTA: 6.447-5 |
| INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO | | |
| DEPARTAMENTO: DEPARTAMENTO DE MEDICINA III | | |
| ENDEREÇO: RUA MITRA Nº13 QD 31 Edifício Space Home Apto. 1201 | BAIRRO: RENASCENÇA II | CIDADE: SÃO LUÍS |
| CEP: 65075-770 | U.F.: MARANHÃO | FONE FIXO: (98)3301-9600 |
| ENDEREÇO ELETRÔNICO: luciane2406@yahoo.com.br | | |
| IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO | | |
| SOLICITAÇÃO: UNIVERSAL-00832/15 | | VIGÊNCIA: 06/08/2015 a 06/08/2017 |
| MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL | | EDITAL: EDITAL FAPEMA Nº 40/2014 UNIVERSAL |
| TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MORUS NIGRA L. EM MULHERES CLIMATÉRICAS | | |
| ÁREA / SUBÁREA: Ciências da Saúde / MEDICINA | | |
| VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO | | |
| DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS | NÚMERO DE PARCELA(S) | VALOR TOTAL |
| 06/09/2017 | 02 | R\$ 41.187,80 |
| TERMO: 009071/2015 | | |

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *MORUS NIGRA* L. EM M
CLIMATÉRICAS**

Prezada Senhora,

Você está sendo convidada para participar do projeto de pesquisa sobre “**Avaliação dos efeitos de *Morus Nigra* l. em mulheres climatéricas**”, sob responsabilidade da Dra. Luciane Maria Oliveira Brito. Esta pesquisa tem como finalidade analisar os efeitos do uso de um comprimido formado a partir da planta *Morus nigra* L, também conhecida como amoreira, para melhorar os sintomas causados pelo climatério (menopausa), como os fogachos, ansiedade, insônia, ressecamento vaginal, entre outros. Se aceitar participar, você será escolhida para participar de um dos três grupos seguintes: o grupo que receberá o tratamento com o comprimido da amora negra, outro que receberá o comprimido convencional de reposição hormonal ou outro que receberá o comprimido de amido. Você não saberá de qual grupo fará parte, para que o resultado da pesquisa não seja prejudicado. O tratamento será realizado com a tomada de 01 comprimido, por via oral, 01 vez ao dia, durante o período de 3 a 6 meses. Muitas mulheres já fazem uso do chá da amoreira para tratar os sintomas climatéricos e referiram melhoras. A terapia de reposição hormonal já é muito utilizada na atualidade e o comprimido de amido não apresenta efeitos danosos ao organismo, na dosagem utilizada.

Além disso, será necessário responder um questionário referente a dados pessoais, biológicos e sociais; coletar amostras de sangue e realizar exame ginecológico e ultrassonográfico das mamas e transvaginal. A coleta de sangue será aproximadamente de 8 mL, que será guardado em tubos identificados e utilizados para a realização de exames laboratoriais somente para esta pesquisa. Essa coleta pode gerar desconfortos, porém mínimos e completamente contornáveis (sensibilidade e escurecimento no local da coleta, possibilidade de diminuição da pressão arterial, esporadicamente náuseas). O exame ginecológico será feito com o mínimo de constrangimento possível e por uma médica experiente. O exame ultrassonográfico será realizado em duas ocasiões, por profissional especializado.

Os benefícios que você terá ao participar deste estudo será uma assistência ginecológica de forma totalmente gratuita, durante a realização da pesquisa, com realização de exames laboratoriais, juntamente com sua interpretação e explicação se você desejar (opção para ser marcada abaixo) ou quando se façam necessários (exames alterados que

necessitarão de encaminhamento médico). Além disso, você estará contribuindo para o esclarecimento do papel da amoreira no tratamento dos sintomas climatéricos.

Todas as informações coletadas serão estritamente confidenciais e utilizadas somente neste estudo, não haverá armazenamento de amostras de sangue para o desenvolvimento de outros trabalhos. Os seus dados serão identificados em um código e, não, com o nome. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados, assegurando assim a sua privacidade. Você poderá sair da pesquisa em qualquer momento, bastando para isso, comunicar aos responsáveis pela investigação, sem prejuízo algum para o seu atendimento.

Não haverá despesa financeira para você e nenhum procedimento que possa prejudicar sua saúde, portanto, não haverá indenização por parte da equipe científica e da Instituição responsável. Sempre que tiver dúvidas ou necessitar de esclarecimentos sobre a pesquisa, você poderá contatar a pesquisadora responsável Profa. Luciane Maria Oliveira Brito pelo número (98) 2109-1273/3272-9520, ou sobre os aspectos éticos, contatar a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, situado na Avenida dos Portugueses s/n, Campus Universitário do Bacanga, Prédio do CEB Velho, PPPG, Bloco C Sala 07 ou pelo telefone (98) 3272-8708. Em caso de denúncias ou questões éticas relativas à pesquisa, o CEP também deverá ser contatado.

Se concordar em participar, você deverá assinar este termo de consentimento em duas vias, ficando uma com você e a outra com o pesquisador e todas as páginas das duas cópias serão rubricadas.

() desejo ser informado sobre os resultados dos meus exames laboratoriais

() não desejo ser informado sobre os resultados dos meus exames laboratoriais.

São Luís _____ de _____ 20 _____

Assinatura da participante

Profa. Dra. Luciane Brito

12 PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

12.1 Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS

Menopause (NEW YORK, N.Y.)

Medicina II: A2

12.2 Normas Editoriais/Normas para os autores

Online Submission and Review System

Instructions for Authors

Reprint Ordering

Permissions Requests

Scope

Menopause is the official journal of The North American Menopause Society (NAMS). A peer-reviewed scientific journal, Menopause provides a forum for new research, applied basic science, and clinical guidelines on all aspects of menopause. The scope of the Journal extends beyond gynecology, encompassing multidisciplinary areas that include internal medicine, family practice, medical subspecialties such as cardiology and geriatrics, epidemiology, pathology, physiology, sociology, psychology, anthropology, and pharmacology.

Manuscript Submission

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Wolters Kluwer Health, Inc. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the Journal, its editors, or the publisher.

All manuscripts must be submitted on-line through the Menopause Editorial Web Site (<http://meno.edmgr.com>). First-time Users: Click the Register Button from the main menu

and enter the requested information. Upon successful registration, you will receive an e-mail with your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Once you have received a user name and password, never register again, even if your status changes (as author, reviewer, or editor). Authors: Click the Login Button from the menu at the top of the page and enter the system as an Author. Upload text, figures and tables as separate files. Do not upload your text as a PDF and do not import figures or tables into the text document. Submit your manuscript according to the author instructions. This Web site also provides an opportunity to track the progress of your manuscript through the peer review process. If you have any questions, please contact:

Diane K. Barker

Managing Editor

E-mail: menopausejournal@menopause.org

Telephone: (617)724-1372

Fax: (617)724-0988

Preparation of Manuscripts

All manuscripts submitted to Menopause should adhere to the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.” Manuscripts must be written in English. Authors whose native language is not English should have their manuscripts checked for correct English grammar prior to submission. Upon submission, if the grammar is considered to be unsuitable by the Editor-in-Chief, the paper will be returned to the corresponding author for necessary revisions prior to being sent out for peer review. All text is subject to editorial revision and review. The author should retain a copy of the complete submission for reference.

Brief Reports/Case Reports: Reports should present focused, new clinical or investigational observations in a format of 9–12 double spaced pages of text (including references) and a maximum of two illustrations or tables.

Original Articles: Articles covering both basic science and clinical topics are welcome. In most cases, each article receives at least two editorial peer reviews and one statistical review.

Basic Science Articles: Basic science research papers must include a paragraph at the end of the Discussion section under the sub header Potential Clinical Value which clearly discusses the possible clinical implications of your research.

Letters to Editor: Letters to the Editor are encouraged and should be submitted in response to work that has already been published in Menopause. All letters must be submitted online through the Menopause Editorial web site and addressed to the Editor-in-Chief. (see instructions for Manuscript Submission). Letters should not exceed 400 words (excluding references, names/addresses). When possible, references should not exceed five, with the related article being one of the five citations. Complete references must be supplied in the proper format (see below). If the letter is accepted for publication the authors of the article that prompted the letter will be given an opportunity to reply.

Details of Style. Please follow the guidelines set by the American Medical Association Manual of Style, 10th edition, Oxford University Press, 2007. The manuscript must include (in the following order): the title page, abstract, text, acknowledgments, references, tables, figure legends, and figures.

The electronic version will be typeset and should not contain any extraneous formatting instructions. For example:

Use hard carriage returns only at the end of paragraphs and display lines (eg, titles, subheadings)

Do not use an extra hard return between paragraphs

Do not use tabs or extra space at the start of a paragraph or for list entries

Do not indent run over lines in references

Turn off line spacing

Turn off hyphenation and justification

Do not specify page breaks, page numbers, or headers

Do not specify typeface

Care should be taken to correctly enter “one” (1) and lower case “el” (l), as well as “zero” (0) and capital “oh” (O).

Please observe the following conventions:

Use a single hyphen with space before it for a minus sign, use a double hyphen (with space before and after) to indicate a “long dash” in text, use a single hyphen (with no extra space) to indicate a range of numbers (eg, “23-45”).

Illustrations and tables will be handled conventionally. However, figure and table legends should be included at the end of the electronic file.

Nonstandard characters (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should be coded consistently throughout the text. Please make a list of such characters and provide a listing of the codes used.

Title Page: The title page should contain, in order, the following:

The paper's full title

A running title of no longer than 45 characters and spaces combined

Author line with the first name, middle initial, last name, credentials (eg, MD, PhD), and affiliation of each author

Any source(s) of financial support, if none, please state so

Conflict of interest/financial disclosure, if none please state so

Disclaimers, if any

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

Name, address, phone and fax number, and e-mail address of the author to whom reprint requests should be addressed (if reprints will not be available, please state so). Indicate which author should receive correspondence and provide that person's preferred mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address if different from that indicated by the authors for reprint requests.

Structured Abstract: On the next page, provide an abstract of 250 words or less, organized under the following headings: Objective, Methods, Results, and Conclusions. Also provide with the abstract no more than six key words for database searching.

Text: Begin the body of the manuscript on the next page following the abstract. Although not appropriate for some articles, most regular manuscripts should adhere to the following sequence: Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and Figure Legends.

Drug Names: Use only generic names when referring to drugs. If a trade name is necessary for clarity, place it in parentheses after the generic name. Do not use registration marks or trademarks.

Terminology: When describing postmenopausal hormone therapy, use the words “estrogen plus progestogen therapy,” abbreviated EPT, to describe this combination hormone therapy or “estrogen therapy,” abbreviated ET, to describe treatment with this hormone alone. “Hormone therapy,” abbreviated HT, should be used as an umbrella term to describe both ET and EPT. Use the word “progestogen” as the umbrella term for progestin and progesterone. Use “progestin” and “progesterone” only for those specific agents. When referring to therapy that does not include hormones, the term "nonhormone therapy" should be used to describe this type of treatment.

Abbreviations: Keep abbreviations to a minimum and define each at its first use. Do not use abbreviations in the abstract. Abbreviate units of measure only when used with numbers, and refer to the AMA Manual of Style for standard scientific abbreviations.

Conflicts of Interest: Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading “Conflicts of Interest and Source of Funding:”. For example: Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker’s bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html).

The copyright transfer agreement form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an email with instructions on completing the form upon submission.

References: The number of references should not exceed 75 whenever possible. Accuracy of reference data is the responsibility of the author. Number references in the order of their use in the text; do not alphabetize. Identify references in the text with Arabic superscript numerals. Follow the Index Medicus reference style (see “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals,” *Ann Intern Med* 1988; 108:258-265).

Provide article titles and inclusive pages. Refer to the List of Journals Indexed in Index Medicus for abbreviations of journal names. List all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first three and “et al.” The following are examples of correct format. Refer to the AMA Manual of Style for other examples.

Journal Article

1. Halbreich U, Rojansky N, Palter S. Decreased bone mineral density in medicated psychiatric patients. *Psychosom Med* 1995;57:485-491.

Chapter in a Book

2. Byrne JLB. The role of oral contraceptives. In: Wilansky S., Willerson JT, editors. *Heart Disease in Women*. New York, NY: Churchill Livingstone, 2002:122-127.

Book

3. Rock JA, Jones HW III, ed. *TeLinde’s Operative Gynecology*, Ninth Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Web Site

4. Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology. *JAMA*[serial online].1999;281:2091-2097. Available at: <http://jama.ama-assn.org/issues/v281n22/full/joc90096.html>. Accessed November 15, 1999.
5. The North American Menopause Society. Definitions and statistics. Available at: <http://www.menopause.org/aboutmeno/overview.htm>. Accessed February 15, 2005.

Tables: Tables should be in a separate file from the body of the paper. Tables should be in .doc files only. Tables should not be in excel files. Place explanatory information in footnote. For footnotes, use the following designations: a, b, c, d, e, f. Do not use numbers or symbols to designate footnotes.

Digital Figures:

Creating Digital Artwork

Learn about the publication requirements for Digital Artwork:
<http://links.lww.com/ES/A42>

Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).

Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital art to [journal title]:

Artwork should be saved as TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.

Crop out any white or black space surrounding the image.

Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.

Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.

Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.

Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

Cite figures consecutively in your manuscript.

Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.

Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.

Supplemental Digital Content (SDC): Authors may submit SDC via Editorial Manager to LWW journals that enhance their article's text to be considered for online posting. SDC may include standard media such as text documents, graphs, audio, video, etc. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call-out within the article. SDC files are not copy-edited by LWW staff, they will be presented digitally as submitted. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

SDC Call-outs

Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labeled as “Supplemental Digital Content,” include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article.

Example:

We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

List of Supplemental Digital Content

A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published.

Example:

Supplemental Digital Content 1.wmv

SDC File Requirements

All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

Page Charges. There is currently no submission fee for the journal Menopause.

Permissions. To reprint material that has appeared in or has been adapted from previously published works, the author(s) must obtain written permission from the copyright holder and/or author. Include full credit to the original source in the title or legend of the borrowed material. Photos depicting a recognizable individual must be accompanied by a signed release from that person, explicitly granting permission to publish the illustration. Permission documentation must be submitted with the manuscript or soon thereafter.

After Acceptance

Electronic page proofs and corrections

Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (eg, reprint order form) will be sent to the corresponding author via e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and marking the electronic page proofs. Corresponding author must provide an email address. The proof/correction process is done electronically.

It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Authors who are not native English speakers are strongly encouraged to have their manuscript carefully edited by a native English-speaking colleague. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Electronic proofs must be checked carefully and corrections returned within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Copyright: Copyright on all accepted manuscripts will be held by The North American Menopause Society (NAMS). Current U.S. copyright law makes it necessary to obtain a signed statement from the primary author(s), expressly transferring copyright in the event that the manuscript is published in Menopause. Manuscripts will be considered received by the Editor-in-Chief only when accompanied by a copyright transfer form signed by all listed authors. Manuscripts published in Menopause become the property of the journal and may not be published elsewhere without written permission from both NAMS and Wolters Kluwer Health, Inc.

Open access

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance

process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The article processing charge (APC) is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by the author, funding agency or institution. Payment must be processed for the article to be published open access. For a list of journals and pricing please visit our Wolters Kluwer Open Health Journals page. Any additional standard publication charges, such as for color images, will also apply.

Authors retain copyright

Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant Wolters Kluwer an exclusive license to publish the article and the article is made available under the terms of a Creative Commons user license. Please visit our Open Access Publication Process page for more information.

Creative Commons license

Open access articles are freely available to read, download and share from the time of publication under the terms of the Creative Commons License Attribution-NonCommercial No Derivative (CC BY-NC-ND) license. This license does not permit reuse for any commercial purposes nor does it cover the reuse or modification of individual elements of the work (such as figures, tables, etc.) in the creation of derivative works without specific permission.

Compliance with funder mandated open access policies

An author whose work is funded by an organization that mandates the use of the Creative Commons Attribution (CC BY) license is able to meet that requirement through the available open access license for approved funders. Information about the approved funders can be found here: <http://www.wkopenhealth.com/inst-fund.php>

It is the responsibility of the author to inform the Editorial Office and/or Wolters Kluwer Health, Inc., that they have RCUK funding. Wolters Kluwer Health, Inc., will not be held responsible for retroactive deposits to PMC if the author has not completed the proper forms.

FAQ for open access

<http://www.wkopenhealth.com/openaccessfaq.php>

Reprints. Authors will receive an email notification with a link to the order form soon after their article publishes in the journal (<https://shop.lww.com/author-reprint>). Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201; Fax: 410.558.6234; E-mail: authorreprints@wolterskluwer.com with any questions.

Publisher's Contact: Fax or e-mail corrected page proofs, reprint order form, and any other related materials to Sin Yi Yeung, Fax: 410-630-5753; E-mail: sinyi.yeung@wolterskluwer.com.

12.3 Artigo

Effect of *Morus nigra* L (black mulberry) on menopausal symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

Morus nigra L for menopausal symptoms

Joyce P. L. Costa, MD¹, Leonardo GB. G. Moreira, MD¹, Luiz G. O. Brito, PhD², Haissa O. Brito, PhD¹, Luciane M. O. Brito, PhD¹

From the ¹ Postgraduate Program in Adult Health of the Federal University of Maranhão, Maranhão, Brazil; ² Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Funding/support: This study was sponsored by FAPEMA grant no 00832/15.

Financial disclosure/conflicts of interest: None reported.

Address correspondence to: Luciane Maria Oliveira Brito, PhD, Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, Federal University of Maranhão, São Luiz, Maranhão, Brazil.

E-mail: luciane2406@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: To compare the efficacy of leaf extract of *Morus nigra* L. for the treatment of climacteric symptoms. **Methods:** A randomized, double-blind (patient) clinical trial was performed with 62 climacteric women, divided into three groups: *Morus nigra* (MN) Group - capsule with *Morus nigra* L. powder 250 mg (n = 20), HT - estradiol 1 mg or estradiol 1 mg and norethisterone acetate 0.5 mg (n = 20) and Placebo (n = 22) for 60 days. The response variable was the mean score of the Blatt-Kuppermann Index (BKI) and the Quality of life (QoL) through the SF-36 questionnaire. The level of significance was set at 5%. **Results:** There was a mean reduction in BKI scores in the MN group (18.0 for 10.0, $p < 0.001$) and HT (14.0 for 5.0, $p = 0.001$), except the Placebo (10.5 for 9, $P = 0.083$). The qualitative analysis of symptom improvement showed a significant difference only between the MN group and Placebo ($p = 0.043$). About the QoL, the MN group showed improvement in the functional capacity ($p = 0.006$), vitality ($p = 0.030$), mental health ($p = 0.017$) and social aspect ($p = 0.003$); the HT group presented improvement in the emotional limitation domain ($p = 0.040$) and the Placebo group in the functional capacity ($p = 0.007$), physical limitation ($p = 0.031$) and mental health domains ($p = 0.028$). **Conclusions:** There was improvement of the climacteric symptoms with the use of the extract of *Morus nigra* L. 250 mg for 60 days.

Keywords: Clinical Trial; Climacteric; Morus.

Introduction

The hormonal changes experienced during the climacteric increase the risk for the development of several diseases and interfering in the quality of life of women¹. The most commonly reported symptoms include hot flushes, night sweats, palpitations and headache. In addition to changes in bone metabolism, cardiovascular and psychological manifestations such as depression, irritability, fatigue and loss of libido.²⁻⁴

Hormone therapy (HT) has been established as a gold standard for the treatment of climacteric symptoms and remains the most effective treatment for vasomotor and genitourinary symptoms.⁵ However its use is cautiously indicated after the publication of the Women's Health Initiative study, which identified an increase in the incidence of stroke and thromboembolism with the use of HT.⁶

In the context of climacteric syndrome, the use of medicinal plants with estrogenic effect, phytoestrogens (PE), has been a common practice.⁷ PE are natural polyphenols, which have a similar chemical structure to estradiol and, similarly, have to bind to the estrogen receptor to initiate transcription.^{8,9} Studies suggest that these compounds not only decrease the incidence of climacteric symptoms, but are able to reduce the risk of breast cancer.¹⁰⁻¹²

The *Morus nigra* L., known as black mulberry, is a species belonging to the genus *Morus*, family Moraceae. This genus contains a variety of phenolic compounds, including flavonoids, flavones, isoflavones, isoprenylates, stilbenes, coumarins, chromones and xanthonnes.^{13,14}

The analysis of total flavonoids (TF) in the fruits of the three main types of mulberry trees showed that TF in *Morus nigra* is higher than in *Morus alba* and *Morus rubra*.^{15,16} The TF values in the leaves of *Morus nigra* are also higher than those in *Morus alba*.¹⁷ The flavonoids identified in the extracts of its leaves were quercetin, rutin and campherol.^{18,19}

Some experimental studies have reported the potential estrogenic potential of *M. nigra* in oophorectomized Wistar rats.^{20,21} Other authors have observed the prevention of vaginal and uterine atrophy, as well as the improvement of the lipid profile in rats submitted to chronic treatment with the hydroalcoholic extract of *Morus nigra*.²²

In Brazil, leaf tea from black mulberry is widely used in folk medicine as a hormonal repository during the climacteric period, aiming at relieving symptoms, especially hot flushes. The results obtained by an ethnopharmacological research confirmed that the use of *Morus nigra* L. was effective for the treatment of climacteric symptoms.²³

Preclinical toxicological evaluation of leaf tea from this plant in Wistar rats showed that subchronic administration did not produce deaths or signs of toxicity in animals. In addition,

there was no change in the biochemical and hematological parameters analyzed, which allows to have a notion of safety parameters, allowing the advancement of clinical studies that prove the therapeutic benefits of the plant.²⁴

Although some PE may ameliorate climacteric symptoms and contribute positively to quality of life, there is no scientific evidence to allow replacement of HT, and there are still few studies investigating the estrogenic effect of *Morus nigra* L.²⁵ In this context, this study aims to compare the efficacy of leaf extract of *Morus nigra* L. in the treatment of climacteric symptoms, with HT and a control group (placebo).

Methods

Study design

We performed a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating the effects of treating climacteric symptoms with *Morus nigra* L or HT. All participants read and signed an informed consent form. The study was approved by the research ethics committee of the University Hospital of Federal University of Maranhão (HUUFMA) under the register 1.804.512 and published in Brazilian Registry of Clinical Trials under the register RBR-9t4xxk.

Participants

A total of 97 climacteric women, between the ages of 35 and 65 years, reporting any symptoms evaluated by the Blatt-Kuppermam Index (BKI) were selected to participate in the study. The study was conducted at the Clinical Research Laboratory of the Post-Graduation Program in Adult Health of Federal University of Maranhão – UFMA, Brazil, from November 2016 to March 2018. Exclusion criteria included presence of hepatic insufficiency, previous or family history of breast, ovarian and endometrial cancer; presence of porphyria, abnormal endometrial bleeding, history of myocardial infarction, or previous thromboembolic disease.

Evaluation and treatment

The women underwent clinical and gynecological examinations, had mammography, breast and vaginal ultrasound examinations before enrollment. Serum levels of fasting glycemia, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, total cholesterol, AST, ALT, urea,

creatinine, uric acid, alkaline phosphatase, ultra-sensitive C-reactive protein (CRP), estradiol, FSH, TSH and free T4 were measured.

The participants were randomly assigned via computer to three groups: *Morus nigra* L (MN) Group - capsule with *Morus nigra* L. powder 250 mg , HT group - estradiol 1 mg or estradiol 1 mg + norethisterone acetate 0.5 mg and Placebo group for 60 days. All the selected participants answered the BKI and the quality of life questionnaire 36-Item Short Form Survey (SF-36).

The BKI and SF - 36 questionnaires were applied before and after treatment. All the exams were performed at these two moments, except the imaging tests, which were performed only at the baseline evaluation. No participant presented breast or pelvic alteration identified by the imaging tests that contraindicated the treatments.

BKI

The climacteric symptoms were evaluated based on the Blatt-Kupperman Index, which measures the intensity of several symptoms as reported by the respondent. Symptom severity is considered mild when the score is equal to or lower than 19; moderate, from 20 to 35; and severe, above 35. The symptoms included are hot flashes, paresthesia, insomnia, nervousness, depression, fatigue, arthralgia/myalgia, headache, palpitations and tingling.²⁶

SF-36

Quality of life (QoL) was assessed by the 36-Item Short Form Health Survey. This multidimensional QoL instrument was developed in 1992 by Ware and Sherbourne and validated in Brazil by Ciconelli et al. (1999). The evaluation of the results was done by assigning scores for each question, which comprised eight domains (functional capacity, physical aspects, pain, general health, vitality, social aspects, emotional aspects and mental health), which were transformed into a scale from zero to 100, where zero corresponded to a worse quality of life and 100 to a better quality of life.²⁷

Statistical analyses

The normality of the variables was verified by the Shapiro-Wilk test. The Kruskal-Wallis test was used to compare the difference between the medians of the variables at each time point (T0: baseline and T1: after 2 months of treatment) among the 3 groups. In the comparison of the medians of the numerical variables of each treatment group between T0 and T1, the Wilcoxon test was used. Pearson's chi-square test was used to verify the association of

outcome (symptom improvement) with other variables analyzed, and relative risk (RR) was calculated with their respective confidence intervals (CI) 95%. In the analysis of the biochemical tests between T0 and T1, the T-Pair Test was used. A significance level of 5% was adopted for all analyzes.

Results

A total of 62 climacteric women was included in this study (MN group: 20, TH group: 22, placebo group: 20), 35 were excluded: 02 women did not meet the inclusion criteria, 08 refused to participate in the study, 06 had symptomatic uterine myomatosis, and 19 did not complete the baseline tests. In the MN group, all patients completed the treatment and completed the follow-up. In the HT group, there was one withdrawal from the treatment, due to a spotting complaint, remaining 19 who completed the follow-up. In the placebo group, 02 women withdrew from the treatment, without specific complaint, totaling 20 for follow-up (Figure 1).

The analysis of the BKI score and the SF-36 domains showed that there was no statistically significant difference between the three groups before and after treatment ($P > 0.05$). After treatment, there was a reduction in the BKI score and an increase or maintenance of values related to the eight domains on QoL in all groups (Table 1).

In the individual comparison of each group at both moments (baseline and after treatment), a significant reduction in the BKI score in the MN group (18.0 for 10.0, $P < 0.001$) and HT group (14.0 for 5, $P < 0.001$) was observed, except in the placebo group (10.5 to 9.0, $P = 0.083$). About the QoL, the MN group showed improvement in the functional capacity ($P = 0.006$), vitality ($P = 0.030$), mental health ($P = 0.017$) and social aspect ($P = 0.003$); the HT group presented improvement in the domain emotional limitation ($P = 0.040$) and the placebo group in the functional capacity domains ($P = 0.007$), physical limitation ($P = 0.031$) and mental health ($P = 0.028$) (Table 2).

Table 3 represents the paired analysis of the improvement of the BKI score of each participant, after the intervention. It was considered that there was an improvement of the symptoms when the total score decreased, and in the negative case there was an increase in the score or the maintenance of its value. It was observed that there was a significant difference only between the MN and Placebo groups ($P = 0.043$), with a 46% increase in the probability of improvement of the climacteric symptoms with *Morus nigra* L (RR = 1.46, 95% CI = 1.04-2.05).

Regarding the side effects that arose in the groups during treatment, breast tenderness was identified as more frequent and present only in the HT group (36.8%), with a very significant difference ($P < 0.001$). The spotting occurred in 26,3% ($P = 0,003$) (Table 4).

The analysis of biochemical tests revealed that fasting glycemia increased in all three groups, producing a significant difference between baseline and post-intervention values (MN: $P = 0.030$, HRT: $P = 0.0001$ and Placebo: $P = 0.003$). In the MN group, the free T4 and estradiol hormones also increased ($P = 0.011$ and $P = 0.031$, respectively). In the HT group there was a reduction in HDL ($P = 0.042$). Finally, in the Placebo group there was reduction of total cholesterol ($P = 0.036$) (Table 5).

Discussion

The observed similarity between the groups in the baseline assessment of BKI and SF-36 domains demonstrates homogeneity of the participants regarding these characteristics. The analysis before and after the treatment for each group showed that there was improvement of the climacteric symptoms in the MN and HT groups, but the analysis of improvement of the symptoms by the decrease of the individual BKI revealed that there was only difference between the group Placebo and the MN group, presenting a probability of almost 50% improvement in climacteric symptoms among women who received *Morus nigra* L.

In the study about the 8-prenylnaringenin present in hops, Stulikova et al.²⁸ concluded that this prenylated flavonoid, a class of PE that can also be found in the species *Moraceae*, has the ability to alleviate the symptoms of menopause. Villa et al.²⁹, in turn, evaluated the impact of nutritional supplementation composed of PE and some vitamins in a pilot study with 90 perimenopausal women. The BKI decreased significantly compared to the control group after 3 and 6 months of treatment. PE-based nutritional supplementation significantly reduced vasomotor symptoms and also ameliorated neurological and psychological symptoms such as insomnia, fatigue, and irritability.²⁹

Pahani et al.³⁰ conducted a randomized clinical trial of 66 symptomatic climacteric women and evaluated the effects of an herbal remedy based on avocado and soybean oil compared to HT. In this study, BKI reduced in both groups in a similar way (reduction of 8.50 ± 4.83 in the PE group and 8.33 ± 4.89 in the HT group). The severity and duration of the heat waves also showed the same decrease.

The clinical trial performed by Costa et al.³¹ identified that 10 weeks of physical training was effective in improving climacteric symptoms in postmenopausal women and that supplementation with isoflavones did not promote additional effects in improving these symptoms.

Until this date, no clinical trial evaluating the effect of *Morus nigra* L on climacteric symptoms has been found. However, it has been found that black mulberry is rich in flavonoids and these, in turn, may alleviate some of these symptoms. The amount of flavonoids present in *Morus nigra* L is higher than that found in *Morus alba* and *Morus rubra*.¹⁵ These flavonoids are able to soften the pain, mainly reducing the duration of the inflammatory phase. In addition, black mulberry flavonoids have been shown to decrease IL-6 (inflammatory cytokine) production and to significantly increase IL-10 (anti-inflammatory cytokine).¹⁶ Thus, this anti-inflammatory effect may influence pain-related symptoms, such as arthralgia / myalgia and headache.

The depression symptom, evaluated by BKI, can also be alleviated by *Morus nigra* L. Dalmagro et al.³² demonstrated that the acute and subchronic administration of *Morus nigra* or syringogenic acid, the main phenolic component identified in the leaves, exerted antidepressant properties in the behavioral tests in mice. The observed effect involved the modulation of oxidative stress, both in the serum and in the brains of the mice. *Morus nigra* extract or syringic acid were able to contain glutamate induced cell death in the hippocampus and cortex cells, implying a neuroprotection activity in the antidepressant effect.

Regarding the participants' quality of life, it is known that the reduction of estrogen levels favors the classic climacteric symptoms, but also interferes in the physical and cognitive functioning, implying quality of life. Atteritano *et al.*³³ conducted a randomized, placebo controlled trial of 389 postmenopausal women to investigate the effects of genistein on quality of life and depressive symptoms for 2 years. In the genistein group, all domains improved significantly compared to baseline.

In general, it is observed that the PE smoothes climacteric symptoms and improves the quality of life. One of the hypotheses to justify this significant improvement would be its performance with the most frequent climacteric symptom, the hot flashes. It was observed in our clinical practice that women who used black mulberry reported significant relief from hot flashes in about 1 to 2 weeks of regular use.

Pinkerton et al.³⁴ showed that the frequency and severity of the hot flashes showed approximately linear relationships with parameters of quality of life and sleep. Among the neurotransmitters involved in the thermoregulatory process, it is considered that

norepinephrine is the main responsible for the reduction of thermoregulatory reference value and for triggering mechanisms of heat loss.³⁵⁻³⁷

Serotonin is another key neurotransmitter in the mechanism of heat waves.³⁸ The production of noradrenaline and its release in the thermoregulatory nucleus can be inhibited by endorphins and byproducts of estrogen metabolism.^{35, 36, 39} Decreased estrogen may also reduce plasma levels of serotonin.^{40, 41} Considering that estradiol modulates the serotonergic and noradrenergic system, PE can also modulate these systems. According to Shanafelt et al.⁴², this modulation does not interfere only in the regulation of body temperature, but in the maintenance of mood.

Studies investigating the specific effects of PE on nerve tissue and its influence on quality of life are still scarce. Toyohira et al.⁴³ demonstrated that genistein positively regulated the activity of noradrenaline and serotonin transporters, probably through processes involving tyrosine phosphorylation. Rodriguez-Landa et al.⁴⁴ evaluated the anxiolytic effects of identical doses of genistein and 17 β -estradiol in ovariectomized rats and concluded that genistein exerted an anxiolytic effect similar to 17 β -estradiol.

Regarding the placebo effect, some studies suggest that 1 in 5 women will experience a 50% or greater reduction in hot flushes with placebo and that one in 10 women will experience a reduction of at least 75% with placebo.⁴⁵⁻⁴⁷ A systematic review by Lethaby et al.⁴⁸ concluded that placebo exerted a strong effect in most clinical trials, with a reduction in the frequency of hot flushes ranging from 1% to 59%.

The psychological disposition, contextual and biological factors dramatically affect a person's susceptibility to the placebo effect. The release of endogenous opioids mediates many forms of analgesia with placebo and the dopaminergic pathways have already been implicated in the placebo response in pain and depression.⁴⁹

In addition, the placebo effect in our study may have been influenced by women's knowledge of climacteric symptoms. Many were unaware that various symptoms may be related to ovarian failure, once they are aware of the menopausal period, their associated changes and complaints, these women can more easily host menopause and develop techniques to deal with it.⁵⁰

When investigating the side effects of treatments, we observed that breast tenderness and spotting were reported only by the HT group and the other groups did not report adverse effects. It is known that there is a greater risk of occurrence of spotting among women users of HT.⁵¹ In postmenopausal women, spotting or unscheduled vaginal bleeding is common in the first 6 months of continued HT use and does not necessarily need to be investigated as

long as colposcopy exams are up-to-date. Women should be informed about the high probability of spotting during this period.⁵²

Evidence suggests that exposure to HT induces changes in the density, distribution, and structure of endometrial vessels, as well as changes in the stroma, which may increase local production of vasoactive mediators and promote vessel rupture.⁵³

A recent randomized clinical trial evaluated the prevalence of breast tenderness in a population treated with HT and *Cimicifuga foetida* extract.⁵⁴ The prevalence of breast tenderness in the groups exposed to HT were higher (80.8% and 72.0%, respectively) and there was no significant difference between them. While in the group exposed to the PE the prevalence corresponded to 27.3%⁵⁴. In a meta-analysis, the incidence of breast tenderness was significantly lower among women treated with PE than those treated with HT.⁵⁵

Breast tenderness is a common adverse effect of HT and is a key factor in long-term adherence to HT.⁵⁶ According to the WHI study, the presence of breast tenderness among women treated with conjugated equine estrogen and medroxyprogesterone acetate was associated with an increased risk for breast cancer. This association was especially pronounced among women who had previous breast tenderness.⁵⁷

Most of the current literature is in favor of PE safety in breast cancer survivors, because of the protective effect evidenced by decreased recurrence of this cancer and mortality.⁵⁸ Some authors state that the property of accumulating in breast tissue and preferentially activating estrogen receptor- β (ER- β) are related to the chemoprophylactic effect of PE.⁵⁹ This chemoprophylactic effect may be explained by the antiproliferative and anticarcinogenic action that ER- β seems to trigger, acting as a tumor suppressor by controlling ER- α -induced proliferation which, in turn, would be related to the promotion of carcinogenesis.^{60, 61}

In addition to PE inhibiting ER-positive breast cancer cells, they may also inhibit ER-negative breast cancer cells. Many investigators have already demonstrated the possibility of epigenetic reactivation of ER- α in human ER- α negative breast cancer cells.^{62, 63} Li et al.⁶⁴ showed that genistein can epigenetically restore ER- α expression, which in turn increased tamoxifen-dependent antiestrogenic therapeutic sensitivity in vitro and in vivo.

Regarding biochemical changes, it was observed that glycemia increased in all groups, including in the MN group, although its hypoglycemic effect was identified by Junior et al.⁶⁵, who observed that the ethanolic extract of *Morus nigra* L leaves reduced hyperglycemia, improved oral glucose tolerance and minimized dyslipidemia. A recent study identified in *Morus nigra* L four compounds called nigragenons, which have agonist activity over PPAR γ , an important anti-diabetic target.⁶⁶

A meta-analysis that evaluated the lipid profile of women submitted to a PE-rich diet concluded that there is a hypolipidemic effect, with a reduction in LDL.⁶⁷ In our study, there was reduction of LDL in the MN group, but not significant. Other studies have shown positive effects, mainly in hypercholesterolemic patients and a moderate effect in patients with normal lipid profile.^{68, 69} The experimental study carried out by Zeni et al.¹⁹ demonstrated that *Morus nigra* L lowered serum cholesterol, triglycerides and normalized lipoproteins, providing evidence that black mulberry leaf extract may normalize the hyperlipidemic disorder.

Our study has some limitations. Because it was a pioneering study, it was decided to estimate a small sample and perform a short-term intervention, and the ideal dose of *Morus nigra* L. leaves extract was not identified. These facts may have prevented gradual changes in intensity of climacteric symptoms, the quality of life of the women evaluated and the biochemical profile.

However, our study demonstrated that leaf extract of *Morus nigra* L was able to improve climacteric symptoms, was well tolerated by users, did not present toxicity and did not produce side effects, suggesting superior benefits to HT. However, new clinical trials about the use of this plant need to be performed in order to prove the estrogenic effects of black mulberry and to reinforce its use with an alternative to hormonal therapies.

Conclusions

The leaf extract of *Morus nigra* L. was able to ameliorate the climacteric symptoms and to improve the quality of life after 2 months of exposure, in a way superior to HT and placebo. Breast tenderness and spotting occurred only among women exposed to HT. No adverse effects were reported by women exposed to *Morus nigra* L. Regarding the biochemical profile, *Morus nigra* L did not present a hypoglycemic and hypolipidemic effect during the exposure period. There was no suggestive alteration of hepatotoxicity and nephrotoxicity in any group.

References

1. Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sardão VA. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014 9//;143(0):61-71.

2. Blumel JE, Castelo-Branco C, Binfa L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B, et al. Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas*. 2000 Jan 15;34(1):17-23.
3. Demetrio F.N.. Efeito da terapia de reposição estrogênica no humor em mulheres menopausadas. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2001;28(2): 72-88.
4. Malheiros ESdA, Chein MBdC, Silva DSMd, Dias CLL, Brito LGO, Pinto-Neto AM, et al. Síndrome climatérica em uma cidade do Nordeste brasileiro: um inquérito domiciliar. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2014;36:163-9.
5. Nams. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2017 Jul;24(7):728-53.
6. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*. 2002;288(3):321-33.
7. Schulz V HR, Tyler VE. *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. 4, editor. São Paulo: Manole; 2002.
8. Nikov GN, Hopkins NE, Boue S, Alworth WL. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environmental health perspectives*. 2000 Sep;108(9):867-72.
9. Yearley EJ, Zhurova EA, Zhurov VV, Pinkerton AA. Binding of genistein to the estrogen receptor based on an experimental electron density study. *Journal of the American Chemical Society*. 2007 Dec 5;129(48):15013-21.
10. Coxam V. Phyto-oestrogens and bone health. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2008 May;67(2):184-95.
11. Messina M. Investigating the optimal soy protein and isoflavone intakes for women: a perspective. *Women's health*. 2008 Jul;4(4):337-56.
12. Hsieh CJ, Hsu YL, Huang YF, Tsai EM. Molecular Mechanisms of Anticancer Effects of Phytoestrogens in Breast Cancer. *Current protein & peptide science*. 2018;19(3):323-32.
13. Nomura T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe = Progress in the chemistry of organic natural products Progres dans la chimie des substances organiques naturelles*. 1988;53:87-201.
14. Nomura T, Hano Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. *Natural product reports*. 1994 Apr;11(2):205-18.
15. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*. 2007 2007/01/01;103(4):1380-4.
16. Chen H, Yu W, Chen G, Meng S, Xiang Z, He N. Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries. *Molecules*. 2017 Dec 21;23(1).
17. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Hernández F, Martínez JJ. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods*. 2015 2015/10/01;18:1039-46.
18. Tallini LR, Pedrazza GPR, Bordignon SAdL, Costa ACO, Steppe M, Fuentesfria A, et al. Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25:219-27.
19. Zeni ALB, Moreira TD, Dalmagro AP, Camargo A, Bini LA, Simionatto EL, et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2017 Oct-Dec;89(4):2805-15.

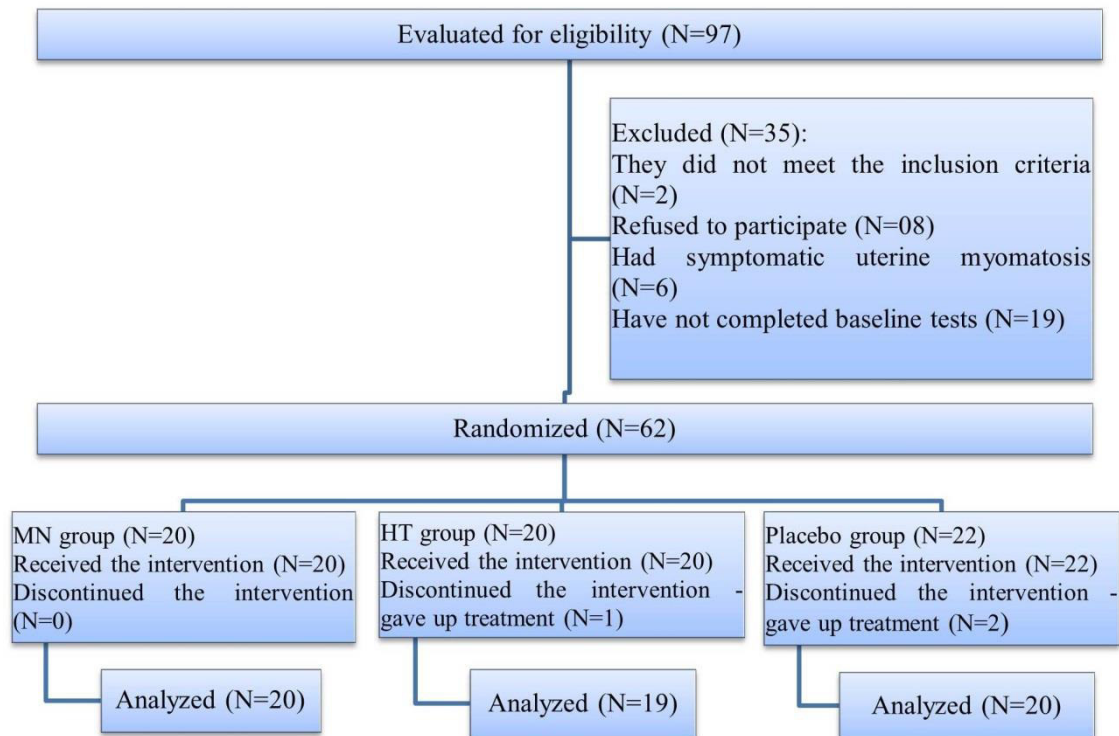
20. Ercisli S, Orhan E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*. 2008 3/10;116(1):41-6.
21. Silva I, Santos IC, Peters VM, Faria RE, Andrade ATL. Avaliação do potencial estrogênico de *Morus sp* em ratas Wistar. Juiz de Fora: Centro de Biologia da Reprodução 2003.
22. Castro AS. Efeito de *Morus nigra* L. como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2010.
23. Miranda MA, Vieira GD-V, Alves MS, Yamamoto CH, Pinho JdJRGd, Sousa OVD. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil
Ethnomedicinal use of tea from *Morus nigra* L. in the treatment of the climacteric symptoms in women from Muriaé, Minas Gerais, Brazil. *HU rev*. 2010 2010/03PY - 2010;36(1).
24. Oliveira ACB, Oliveira AP, Guimarães AL, Oliveira RA, Silva FS, Reis SAGB, et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2013;15:244-9.
25. Vieira LHL, Soares Júnior JM, Nunes MG, Simões RS, Kaari C, Haidar MA, et al. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equínos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2007;29:248-52.
26. Kupperman HS, Blatt MH, Wiesbader H, Filler W. Comparative clinical evaluation of estrogenic preparations by the menopausal and amenorrheal indices. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1953 Jun;13(6):688-703.
27. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev bras reumatol*. 1999;39(3):143-50.
28. Stulikova K, Karabin M, Nespor J, Dostalek P. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. *Molecules*. 2018 Mar 15;23(3).
29. Villa P, Amar ID, Bottoni C, Cipolla C, Dinoi G, Moruzzi MC, et al. The impact of combined nutraceutical supplementation on quality of life and metabolic changes during the menopausal transition: a pilot randomized trial. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2017 Oct;296(4):791-801.
30. Panahi Y, Beiraghdar F, Kashani N, Baharie Javan N, Dadjo Y. Comparison of piascledine (avocado and soybean oil) and hormone replacement therapy in menopausal-induced hot flashing. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2011 Fall;10(4):941-51.
31. Costa JG, Giolo JS, Mariano IM, Batista JP, Ribeiro ALA, Souza TCF, et al. Combined exercise training reduces climacteric symptoms without the additive effects of isoflavone supplementation: A clinical, controlled, randomised, double-blind study. *Nutrition and health*. 2017 Dec;23(4):271-9.
32. Dalmagro AP, Camargo A, Zeni ALB. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. *Metabolic brain disease*. 2017 Dec;32(6):1963-73.
33. Atteritano M, Mazzaferro S, Bitto A, Cannata ML, D'Anna R, Squadrito F, et al. Genistein effects on quality of life and depression symptoms in osteopenic postmenopausal women: a 2-year randomized, double-blind, controlled study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2014 Mar;25(3):1123-9.
34. Pinkerton JV, Abraham L, Bushmakin AG, Cappelleri JC, Komm BS. Relationship between changes in vasomotor symptoms and changes in menopause-specific quality of life and sleep parameters. *Menopause*. 2016 Oct;23(10):1060-6.

35. Casper RF, Yen SS. Neuroendocrinology of menopausal flushes: an hypothesis of flush mechanism. *Clinical endocrinology*. 1985 Mar;22(3):293-312.
36. Rosenberg J, Holst Larsen S. Hypothesis: Pathogenesis of postmenopausal hot flush. *Medical hypotheses*. 1991 1991/08/01;35(4):349-50.
37. Freedman RR, Krell W. Reduced thermoregulatory null zone in postmenopausal women with hot flashes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999 Jul;181(1):66-70.
38. Berendsen HH. The role of serotonin in hot flushes. *Maturitas*. 2000 Oct 31;36(3):155-64.
39. Kronenberg F, Downey JA. Thermoregulatory physiology of menopausal hot flashes: a review. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1987 Jun;65(6):1312-24.
40. Gonzales GF, Carrillo C. Blood serotonin levels in postmenopausal women: effects of age and serum oestradiol levels. *Maturitas*. 1993 Jul;17(1):23-9.
41. Blum I, Vered Y, Lifshitz A, Harel D, Blum M, Nordenberg Y, et al. The effect of estrogen replacement therapy on plasma serotonin and catecholamines of postmenopausal women. *Israel journal of medical sciences*. 1996 Dec;32(12):1158-62.
42. Shanafelt TD, Barton DL, Adjei AA, Loprinzi CL. Pathophysiology and treatment of hot flashes. *Mayo Clinic proceedings*. 2002 Nov;77(11):1207-18.
43. Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Itoh H, Sakai N, Saito N, et al. Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenaline transporter and serotonin transporter activity. *Molecular nutrition & food research*. 2010 Apr;54(4):516-24.
44. Rodriguez-Landa JF, Cueto-Escobedo J, Puga-Olguin A, Rivadeneyra-Dominguez E, Bernal-Morales B, Herrera-Huerta EV, et al. The Phytoestrogen Genistein Produces Similar Effects as 17beta-Estradiol on Anxiety-Like Behavior in Rats at 12 Weeks after Ovariectomy. *BioMed research international*. 2017;2017:9073816.
45. Barton DL, Loprinzi CL, Quella SK, Sloan JA, Veeder MH, Egner JR, et al. Prospective evaluation of vitamin E for hot flashes in breast cancer survivors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998 Feb;16(2):495-500.
46. Loprinzi CL, Kugler JW, Sloan JA, Mailliard JA, LaVasseur BI, Barton DL, et al. Venlafaxine in management of hot flashes in survivors of breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2000 Dec 16;356(9247):2059-63.
47. Quella SK, Loprinzi CL, Barton DL, Knost JA, Sloan JA, LaVasseur BI, et al. Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: A North Central Cancer Treatment Group Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000 Mar;18(5):1068-74.
48. Lethaby A, Marjoribanks J, Kronenberg F, Roberts H, Eden J, Brown J. Phytoestrogens for menopausal vasomotor symptoms. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013 Dec 10(12):CD001395.
49. Murray D, Stoessl AJ. Mechanisms and therapeutic implications of the placebo effect in neurological and psychiatric conditions. *Pharmacology & therapeutics*. 2013 Dec;140(3):306-18.
50. Cetisli NE, Saruhan A, Kivcak B. The effects of flaxseed on menopausal symptoms and quality of life. *Holistic nursing practice*. 2015 May-Jun;29(3):151-7.
51. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002 Jul 17;288(3):321-33.
52. Roberts H, Hickey M. Managing the menopause: An update. *Maturitas*. 2016 Apr;86:53-8.

53. Hickey M, Pillai G, Higham JM, Sullivan M, Horncastle D, Doherty D, et al. Changes in endometrial blood vessels in the endometrium of women with hormone replacement therapy-related irregular bleeding. *Human reproduction*. 2003 May;18(5):1100-6.
54. Gao L, Zuo H, Zheng T, Xue W, Wang Y, Deng Y, et al. Influence of hormone therapy or *C. foetida* extract on breast tenderness in postmenopausal women. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2018 Jun;21(3):292-7.
55. Xu M, Qi C, Deng B, Deng PX, Mo CW. Phytotherapy versus hormonal therapy for postmenopausal bone loss: a meta-analysis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2009 Apr;20(4):519-26.
56. Barnabei VM, Cochrane BB, Aragaki AK, Nygaard I, Williams RS, McGovern PG, et al. Menopausal symptoms and treatment-related effects of estrogen and progestin in the Women's Health Initiative. *Obstetrics and gynecology*. 2005 May;105(5 Pt 1):1063-73.
57. Crandall CJ, Aragaki AK, Cauley JA, McTiernan A, Manson JE, Anderson G, et al. Breast tenderness and breast cancer risk in the estrogen plus progestin and estrogen-alone women's health initiative clinical trials. *Breast cancer research and treatment*. 2012 Feb;132(1):275-85.
58. Alipour S, Jafari-Adli S, Eskandari A. Benefits and harms of phytoestrogen consumption in breast cancer survivors. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(8):3091-396.
59. Bilal I, Chowdhury A, Davidson J, Whitehead S. Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. *World journal of clinical oncology*. 2014 Oct 10;5(4):705-12.
60. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. 2014 Nov;90:13-29.
61. Rietjens IM, Sotoca AM, Vervoort J, Lousse J. Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Molecular nutrition & food research*. 2013 Jan;57(1):100-13.
62. Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer research*. 2001 Oct 1;61(19):7025-9.
63. Meeran SM, Patel SN, Li Y, Shukla S, Tollefsbol TO. Bioactive dietary supplements reactivate ER expression in ER-negative breast cancer cells by active chromatin modifications. *PloS one*. 2012;7(5):e37748.
64. Li Y, Meeran SM, Patel SN, Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. *Molecular cancer*. 2013 Feb 4;12:9.
65. Junior I, Barbosa HM, Carvalho DCR, Barros RA, Albuquerque FP, da Silva DHA, et al. Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *TheScientificWorldJournal*. 2017;2017:5275813.
66. Xu LJ, Yu MH, Huang CY, Niu LX, Wang YF, Wu CZ, et al. Isoprenylated flavonoids from *Morus nigra* and their PPAR gamma agonistic activities. *Fitoterapia*. 2018 Feb 8.
67. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England journal of medicine*. 1995 Aug 3;333(5):276-82.

68. Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, et al. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *The Journal of nutrition*. 2005 Aug;135(8):1911-7.
69. Clerici C, Setchell KD, Battezzati PM, Pirro M, Giuliano V, Asciutti S, et al. Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk. *The Journal of nutrition*. 2007 Oct;137(10):2270-8.

Figure 1. Flowchart of progress of clinical trial phases.



Tables

Table 1. Comparison of BKI medians and SF-36 domains among the MN, HT and placebo groups at two different times: baseline and after 2 months of treatment.

| Variables | Basal | | | <i>P</i> * | After 2 months | | | <i>P</i> * |
|----------------------|-------|-------|---------|------------|----------------|-------|---------|------------|
| | Group | | | | Group | | | |
| | MN | HT | Placebo | | MN | HT | Placebo | |
| BKI | 18.0 | 14.0 | 10.5 | 0.488 | 10.0 | 5.0 | 9.0 | 0.311 |
| Functional capacity | 85.0 | 75.0 | 80.0 | 0.445 | 92.5 | 95.0 | 90.0 | 0.723 |
| Physical limitation | 100.0 | 100.0 | 62.5 | 0.303 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 0.901 |
| Emotional limitation | 100.0 | 100.0 | 66.6 | 0.348 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 0.715 |
| Pain | 72.0 | 72.0 | 56.5 | 0.514 | 100.0 | 72.0 | 72.0 | 0.462 |
| Vitality | 60.0 | 60.0 | 62.5 | 0.847 | 75.0 | 65.0 | 70.0 | 0.438 |
| Mental Health | 76.0 | 80.0 | 68.0 | 0.483 | 84.0 | 80.0 | 78.0 | 0.508 |
| Social aspect | 88.0 | 87.5 | 88.0 | 0.392 | 100.0 | 100.0 | 87.5 | 0.170 |
| General state | 77.0 | 67.0 | 74.5 | 0.716 | 81.0 | 77.0 | 74.5 | 0.616 |

*Kruskal-WallisTest

Table 2. Comparison of BKI medians and SF-36 domains at baseline and after 2 months of treatment, for each group individually.

| Variables | MN | | | HT | | | Placebo | | |
|----------------------|-------|-------------------|------------|-------|-------------------|------------|---------|-------------------|------------|
| | Basal | After 2 months | <i>P</i> * | Basal | After 2 months | <i>P</i> * | Basal | After 2 months | <i>P</i> * |
| BKI | 18.0 | 10.0 | <0.001 | 14.0 | 5.0 | 0.001 | 10.5 | 9.0 | 0.083 |
| Functional capacity | 85.0 | 92.5 | 0.006 | 75.0 | 95.0 | 0.179 | 80.0 | 90.0 | 0.007 |
| Physical limitation | 100.0 | 100.0 | 0.236 | 100.0 | 100.0 | 0.111 | 62.5 | 100.0 | 0.031 |
| Emotional limitation | 100.0 | 100.0 | 0.317 | 100.0 | 100.0 | 0.040 | 66.6 | 100.0 | 0.114 |
| Pain | 72.0 | 100.0 | 0.153 | 72.0 | 72.0 | 0.283 | 56.5 | 72.0 | 0.109 |
| Vitality | 60.0 | 75.0 | 0.030 | 60.0 | 65.0 | 0.304 | 62.5 | 70.0 | 0.060 |
| Mental Health | 76.0 | 84.0 | 0.017 | 80.0 | 80.0 | 0.077 | 68.0 | 78.0 | 0.028 |
| Social aspect | 88.0 | 100.0 | 0.003 | 87.5 | 100.0 | 0.230 | 88.0 | 87.5 | 0.665 |
| General state | 77.0 | 81.0 | 0.057 | 67.0 | 77.0 | 0.113 | 74.5 | 74.5 | 0.125 |

*Wilcoxon Test

Table 3. Analysis of the improvement of the climacteric symptoms evaluated by BKI after 2 months of treatment.

| Group | Improvement of symptoms | | RR (CI 95%) | P* |
|---------|-------------------------|------------|-------------|-------|
| | YES | NO | | |
| | n (%) | n (%) | | |
| MN | 19,0 (95,0) | 1,0 (5,0) | 1,46 | 0,043 |
| PLACEBO | 13,0 (65,0) | 7,0 (35,0) | (1,04-2,05) | |
| MN | 19,0 (95,0) | 1,0 (5,0) | 1,13 | 0,342 |
| HT | 16,0 (84,2) | 3,0 (15,8) | (0,91-1,40) | |
| HT | 16,0 (84,2) | 3,0 (15,8) | 1,29 | 0,273 |
| PLACEBO | 13,0 (65,0) | 7,0 (35,0) | (0,89-1,88) | |

* Qui-quadrado Test

Table 4. Association between the occurrence of breast tenderness, spotting and the type of treatment.

| Variable | Group | | | P* |
|-------------------|--------------|-------------|------------------|--------|
| | MN n (%) | HT n (%) | Placebo n (%) | |
| Breast tenderness | | | | |
| Yes | - | 7,0 (36,8) | - | <0,001 |
| No | 20,0 (100,0) | 12,0 (63,2) | 20,0 (100,0) | |
| Spotting | | | | |
| Yes | - | 5 (26,3) | - | 0,003 |
| No | 20,0 (100,0) | 14 (73,7) | 20,0 (100,0) | |

* Qui-quadrado Test

Table 5. Comparison of the biochemical exams of the MN, HT and Placebo groups at two different moments: at baseline and after 2 months of treatment.

| Variável | MN | | | HT | | | Placebo | | |
|-------------------------|-------|-------------------|------------|-------|-------------------|------------|---------|-------------------|------------|
| | Basal | After 2 months | <i>P</i> * | Basal | After 2 months | <i>P</i> * | Basal | After 2 months | <i>P</i> * |
| Fasting glycemia | 97,3 | 102,9 | 0,030 | 88,3 | 94,4 | 0,0001 | 98,8 | 104,9 | 0,003 |
| Total cholesterol | 190,0 | 197,5 | 0,263 | 216,7 | 217,6 | 0,863 | 218,9 | 203,1 | 0,036 |
| HDL | 58,3 | 56,3 | 0,150 | 60,0 | 55,3 | 0,042 | 53,9 | 51,5 | 0,367 |
| LDL | 120,3 | 100,4 | 0,352 | 132,2 | 134,1 | 0,712 | 135,6 | 126,7 | 0,082 |
| Triglyceride | 160,8 | 186,3 | 0,249 | 122,4 | 140,1 | 0,057 | 146,6 | 135,9 | 0,387 |
| Urea | 27,6 | 26,3 | 0,281 | 29,0 | 27,3 | 0,206 | 25,2 | 24,1 | 0,415 |
| Creatinine | 0,7 | 0,7 | 0,226 | 0,7 | 0,7 | 0,800 | 0,7 | 0,6 | 0,309 |
| Uric acid | 4,8 | 4,9 | 0,675 | 4,0 | 4,2 | 0,071 | 3,9 | 3,8 | 0,624 |
| Alkaline phosphatase | 76,3 | 74,8 | 0,536 | 73,4 | 72,6 | 0,711 | 71,0 | 73,6 | 0,339 |
| AST | 32,0 | 20,0 | 0,366 | 19,3 | 20,0 | 0,411 | 18,6 | 19,2 | 0,423 |
| ALT | 30,4 | 17,7 | 0,296 | 18,4 | 17,6 | 0,509 | 17,7 | 16,7 | 0,549 |
| TSH | 1,9 | 2,1 | 0,315 | 1,9 | 1,8 | 0,435 | 2,3 | 2,4 | 0,926 |
| T4 Free | 14,9 | 15,6 | 0,011 | 14,7 | 15,2 | 0,071 | 13,8 | 14,9 | 0,244 |
| Estradiol | 30,1 | 87,2 | 0,031 | 80,6 | 55,4 | 0,431 | 115,8 | 130,1 | 0,375 |
| FSH | 43,8 | 46,3 | 0,677 | 64,6 | 63,4 | 0,768 | 28,3 | 25,3 | 0,034 |
| CRP | 0,5 | 0,3 | 0,503 | 0,4 | 0,4 | 0,791 | 0,2 | 0,2 | 0,918 |

* Paired T Test

13 SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

13.1 Nome do periódico com sua classificação na WEBQUALIS

Maturitas

Medicina II: A2

13.2 Normas Editoriais/Normas para os autores

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 ground-breaking 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.

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 (see also www.strobe-statement.org)

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 PRISMA guidelines. Meta-analysis of observational studies should follow the MOOSE guidelines. Further information can be obtained from the EQUATOR web site: <<<http://www.equator-network.org/resource-centre/library-of-health-research-reporting/reporting-guidelines>>>

Minireviews: a focused review of prior publications relating to an important clinical subject (1,500 words and 20 references with an unstructured abstract of no more than 250 words). In more detail the following is recommended:

- Management should be described in practical terms, so that it can be translated to the individual patient. Use appropriate examples to illustrate management problems, so that the reader actually knows what to do, when to do it, how to do it and why.

- Recommendations should be evidence-based. The quality of the information available and what remains unknown should be highlighted. Meta-analysis data and systematic reviews should be used where available. Emphasis should be given to randomized controlled trials, translating data from such trials to clinical practice wherever possible. If recommendations are not evidence-based, this should be clearly stated.

- Make clear what we know, what we think we know and what we do not know. Use Practice Points and Research Agenda to emphasise these.

- As one of the primary functions of this type of article is educational, please ensure that it is well structured and clearly laid out, with level of headings clearly indicated and figures, diagrams, tables and flow-charts used to explain points and reduce explanatory text.

- The abstract should include the key issues which will be addressed in your article, emphasising what we know, what we think we know and what we do not know.

- The summary should focus on the conclusions reached in the article, indicating unanswered and unanswerable questions.

- Practice Points. Where appropriate, present the most important points to note in current clinical practice; these should be brief and set out as a bullet point list at the end of the main text.

- Research Agenda. Please indicate points which you feel would repay further research, again presented as a bullet point list at the end of the text.

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 <https://www.elsevier.com/profile/api/navigate/MAT>. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the *Maturitas* Editorial Office at mat@elsevier.com.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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 Internet)
 - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
 - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

Article structure 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

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

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

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions 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. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase 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 will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

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 separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

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 proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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 for further information. Embedded math equations If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this (related support information).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, 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 (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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 (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

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

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation 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.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. 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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/maturitas>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

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.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

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] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

13.3 Artigo

USE OF *MORUS NIGRA L.* AS COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE THERAPY FOR MENOPAUSE SYMPTOMS

Joyce Pinheiro Leal Costa^a, Matheus Veras Guterres Mendes^b Haissa Oliveira Brito^a, Luciane
Maria Oliveira Brito^a

^a Postgraduate Program in Adult Health of the Federal University of Maranhão, Brazil.

^b Medicine Faculty of the Federal University of Maranhão, Brazil.

Corresponding author: Luciane Maria Oliveira Brito, Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga,
Federal University of Maranhão, São Luiz, Maranhão, Brazil.

E-mail: luciane2406@yahoo.com.br

ABSTRACT

It has been estimated that about half of women over the age of 50 will experience menopause related symptoms that will cause somewhat or fairly difficult problems. The hormone replacement therapy, considered a therapeutic standard, is currently indicated with caution due to adverse effects and its use is falling dramatically around the world. Many patients have started to use complementary and alternative medicine (CAM) therapies such as phytoestrogens (PE), making their use a common practice for the treatment of climacteric symptoms. Among the several types of PE, the *Morus nigra* (MN) has been used empirically to treat menopause symptoms and some studies have already reported the use of this plant as a CAM to this treatment, suggesting promising results. This narrative review aims to investigate in the published literature the use of MN as a CAM therapy for menopausal symptoms. We searched PubMed and Cohrane articles published between 2007 and 2018. PE are natural polyphenols and have a chemical structure similar to estradiol, necessary for binding with estrogen receptors. The total flavonoids, a type of PE, in the MN was higher than those in white mulberry and red mulberry. It was observed that most of the studies deal with the antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant effects of the constituent flavonoids in MN. In relation to the specific use of MN in menopausal symptoms, an experimental study about the hydroalcoholic extract of MN leaves revealed important effects in ovariectomised rats.

Keywords: Morus, Menopause, Complementary Therapies.

1. Introduction

Menopause related illnesses constitute a major public health concern. Currently, with the increase in life expectancy, women spend one third of their lives in the climacteric, which can extend from 35 to 65 years of age [1,2]. This period consists of the transition from the reproductive phase of the woman to the non-reproductive phase, with the gradual decline of ovarian function and the onset of menopause [3].

The hormonal changes experienced during the climacteric, such as the decrease of 17- β -estradiol and the increase of the follicle-stimulating hormone cause several changes in the body, increasing the risk for the development of several diseases.² It has been estimated that about half of women over the age of 50 will experience menopause related symptoms that will cause somewhat or fairly difficult problems at work and about 5% will have severe difficulties [4].

The most commonly reported symptoms include hot flushes, night sweats, palpitations and headache. Changes in bone metabolism, cardiovascular and psychological manifestations such as depression, irritability, fatigue and loss of libido are associated with this syndrome [5,6]. Hot flushes manifest as a spontaneous sensation of heat in the chest, neck and face, usually associated with palpitations. When they persist for several years, the hot flashes interfere with the daily activities and with the regularity of the sleep, being able to generate anxiety, irritation and panic [6].

Hormone replacement therapy (HRT), estrogen use or combination of estrogen and progesterone, has been available since 1940 and has been given to relieve symptoms of climacteric [7]. It was considered a therapeutic standard because women under HRT presented a lower risk of vertebral and hip fractures, reduced vasomotor symptoms and a delayed onset of Alzheimer's disease [8,9].

However, HRT is currently indicated with caution due to adverse effects and lack of therapeutic follow-up. According to a study conducted by the WHI (Women's Health Initiative), HRT resulted in an increased incidence of stroke and thromboembolism. This study also showed that estrogen-based HRT has negative effects on postmenopausal women including a significant increase in the incidence of breast cancer, heart disease, pulmonary embolism, and vascular dementia [10]. After the release of these data, the use of HRT fell dramatically around the world and many patients abandoned hormone therapy and started to use complementary and alternative medicine (CAM) therapies such as phytoestrogens (PE), making their use a common practice for the treatment of climacteric symptoms [11].

Numerous experimental studies have analyzed pharmacological activities related to the components of *Morus nigra* (MN), as hypoglycemic, anti-inflammatory, laxative, antidepressive and apoptotic action [12-16]. Some studies have already reported the use of this plant for the treatment of specific symptoms of menopause, as a PE, suggesting promising results [17,18]. A clinical trial about the estrogenic effect of MN is underway, whose partial results have already shown improvement in the life's quality of menopausal women.

2. Methods

It is a narrative review about MN as a complementary and alternative medicine therapy for Menopause. We searched PubMed and Cochrane for articles related to this subject. MeSH Terms included: mulberry OR morus, mulberry OR morus AND menopause, mulberry OR morus AND climacteric, mulberry OR morus AND phytoestrogen.

Because we aimed to update the literature about the use of this plant for the treatment of menopausal symptoms, we included articles published between 2007 and 2018. We provide a broader framework for understanding and contextualizing the results about the phytoestrogen as a CAM and the use of MN in menopause.

3. CAM in menopause: phytoestrogens

CAM is a diverse group of healthcare practices and products not traditionally associated with the medical profession or medical curriculum [19]. It is widely used for menopause, although not all women disclose use to their healthcare providers [20]. The phytotherapies are considered CAM, among the many types of them, there are the PE, which have a chemical structure similar to 17- β -estradiol and are a popular alternative to estrogen / progesterone therapy [21,22].

PE are natural polyphenols, with different classes: flavonols (quercetin, kaempferol), flavones (naringenin), coumarins, chalcones, stilbenes (resveratrol), isoflavones, cumestans (cumestrol) and lignans (enterodiol and enterolactone) [23,24]. PE have a molecular weight similar to estradiol and a phenolic ring, a chemical structure necessary for binding with estrogen receptors (ER). There are two types of ER: α and β . ER- α are the major receptors found in the breast and uterus, and ER- β is found in the cardiovascular system and bones [25,26]. The estrogenic or antiestrogenic properties of the PE depends on the specific target

organ involved in the interaction with the ER, in addition to their concentration and their own endogenous steroids [25, 27].

Isoflavones are the most common PE and behave as selective estrogen receptor modulators (SERMs). They are present in soy products, green peas, lentils, beans and blackberries, like black mulberry (*Morus nigra*). Isoflavones include daidzein, genistein, glycitein, biochanin A and formononetin [28, 29].

The physiological effects of flavonoids depend on their bioavailability. After ingestion, the enzyme glucosidases hydrolyzes the isoflavone glucosides to aglycones. This reaction occurs in the small intestine, where part of the metabolites are absorbed. The rest of them are metabolized into other metabolites by intestinal microflora in the large intestine [30]. After the absorption, the metabolites enter the portal vein and undergo to the liver. Isoflavones persist in plasma for about 24 h and the average half-life is 6–8h [31].

The effect of PE on the attenuation of hot flushes has not been fully elucidated. However, some studies suggest that isoflavones may ease vasomotor symptoms, after identifying that episodes of hot flashes and night sweats were less frequent and weaker among women who consumed this compound [32-34].

The position of the phenolic ring and the distance between the two phenolic oxygen atoms in the chemical structure of the isoflavones is similar to the estradiol structure. This similarity allows them to bind to the ER, displacing estradiol. This feature explains the mechanism by which PE protect against breast cancer, although it is unclear how this competition occurs, either by binding at the primary site of the receptors, or by binding at the secondary site, that alters the binding pocket of estradiol [35,36]. Some authors claim genistein inhibits mammary epithelial cell growth, increases expression of tumor suppressor genes, and inhibits the expression of two tumor promoter genes: p21 and p16 [37].

However, isoflavones present different activities in ER. Regarding endometrial tissue, genistein and daidzein increased C3 complement production in endometrial adenocarcinoma cells in the rat. Another study evidenced an increase in alkaline phosphatase activity in culture of similar cells. Both C3 production and alkaline phosphatase activity are known as effects of estrogenic stimulation [38, 39].

Isoflavones has a protective effect for cardiovascular disease by lowering total cholesterol and LDL. There is a hypothesis of increased cholesterol degradation through increased biliary secretion, inhibition of endogenous cholesterol synthesis, up-regulation of the cholesterol receptor, which induces a increase in mRNA expression for the LDL receptor in mononuclear cells, and increased the thyroid function [40,41].

Genistein demonstrates pharmacological cardioprotection after a post-ischemic condition by activating RE PI3K / Akt and preserving mitochondrial function. The consumption of soybeans, a phytoestrogen already known, lowers blood pressure in postmenopausal women and acts by slowing the process of atherosclerosis, preventing the development of heart disease [42-44].

The PE also have an effect on neurodegeneratives diseases. Apoptosis in the brain of D-galactose-treated mice was decreased by daidzein, due to a decrease in the expression of the caspase-3. In a Parkinson's disease mouse model, genistein caused the increase of Bcl-2 gene expression, preventing the loss of neurons [45]. Its use in acute treatments suggests to be useful in improving memory deficits associated with the decrease in levels of estradiol [46].

Skin changes are frequent in the climacteric, it becomes dry, thinner and without elasticity due to hypoestrogenism of the age and exposure to the sun. The actions of isoflavones appear to be beneficial through their antioxidant action, reducing free radicals and inhibiting damage caused by ultraviolet rays [47].

Many authors affirm that the loss of bone mass that occurs in this period can be reduced by the consumption of PE. Some studies have shown that Japanese women has a lower risk of hip fracture than white women and this protection is due not only to factors such as height, physical exercise, but also the type of diet with PE and calcium [48-50].

4. *Morus nigra* L. as a phytoestrogen

Morus nigra L. is a species belonging to the genus *Morus*, family Moraceae. This genus has 24 species and one subspecies, with at least 100 known varieties [51]. In general, three main types of mulberry are grown for fruit production, including mulberry (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black mulberry (*Morus nigra*) [52]. This species can be found between regions of temperate and subtropical climate in the northern hemisphere to the tropics of the southern hemisphere and grow in varied climatic and topographic conditions [53].

The black mulberry tree is the *Morus* species with the highest chromosome number [54]. It originated in Iran and is one of the most important species cultivated in the Mediterranean countries [52]. The fruits, leaves, barks and roots are used as laxative, sedative, expectorant, emollient, soothing, diuretic, hypoglycemic agent, antiseptic, anti-inflammatory and antioxidant [51]. This genus contains a variety of polyphenols, flavonoids and anthocyanins [51, 55, 56].

4.1. Black mulberry fruits

In the analysis of total flavonoids (TF) in the fruits of the three main types, it was observed that the TF in black mulberry was higher than those in white mulberry and red mulberry.⁵¹ Another study identified the fruits of black mulberries were rich in flavonoids, while non-black mulberries had low amounts of it [57].

This study observed the effect of the flavonols of MN under two phases of pain mechanisms, a neurogenic pain phase and inflammatory pain phase. The second phase was significantly shorter in the MN group than in the control group [57]. The authors also studied the mechanism of antinociceptive effects of flavonols in MN and measured the levels of an inflammatory cytokine (IL-6) and an anti-inflammatory cytokine (IL-10). The IL-6 level in serum was significantly reduced by flavonols and only the flavonols in MN significantly increased the serum level of IL-10 compared with the model group [57].

In summary, the TF of black mulberries fruits significantly reduced the level of an early and mid-term development of inflammatory cytokine (IL-6) and increased the level of an anti-inflammatory cytokine (IL-10), while TF of non-black mulberries had significant effects on IL-6 production. In relation to the expression of inflammation related proteins, expression of the phosphorylated products (p-p65 and p-I κ B α) decreased significantly in the TF-treated groups, especially in the MN group [57].

As in that study, previous studies showed that flavonoids of MN regulated the inflammatory process mainly by affecting the NF- κ B and NO pathways. The expression of IL-6 is regulated by the NF- κ B [58, 59]. Other study has found that TF of MN possess an antioxidant activity, besides the anti-inflammatory [60]. It had more reducing power and scavenging power for OH \cdot and ABTS radical cation than vitamin C, which suggesting that its flavonoids has good antioxidant activity and can have potential effects on human health [60].

TF is non-cytotoxic at relevant concentrations. These findings suggest that the black mulberry fruits are a valuable source of flavonoids and a natural antioxidant with no toxic side effects. Thus, the fruits are an alternative treatment for inflammatory and nociceptive diseases [60].

4.2. Black mulberry leaves

The health-promoting features of mulberry tree are limited not only to their fruits, but also to the leaves that have shown wide biological properties. The total phenolic content values in the leaves of MN are also higher than for *Morus alba* [61]. As in the fruits, the flavonoids quercetin, rutin and kaempferol were identified in the hydrolyzed leaves extracts [62, 63].

The phenolic acids, gallic and chlorogenic acids, were also present in the extract of its leaves. The constituents as quercetin, gallic and chlorogenic acids maybe involved in the higher antioxidant capacity found in the infusion and hydromethanolic extracts. The amounts of chlorogenic acid and quercetin in leaves of MN could be sharing the responsibility for the hypolipidemic effect found in its results [63].

It was also possible to verify the antinociceptive activity of the ethanol extract of the leaves of MN, with central and peripheral effect. This extract also produced a significant inhibition of both phases of the formalin test, and the effect was more significant in the second phase (inflammatory pain) [53]. MN leaf also demonstrated antiinflammatory effects by reduced paw edema induced by carragenan and significantly inhibited the formation of granulomatous tissue [64].

Considering the acute toxicity of the crude ethanolic extract, it was observed that the leaves extract can be considered to be of low toxicity, because it did not cause death or change of parameters biochemical and hematological tests in animals after administration of the doses [65, 66].

Dalmagro et al (2017) showed that acute and subchronic MN or syringic acid administration, its major phenolic constituent identified in the leaves, exerted antidepressant-like property in the behavioral testes in mice. Moreover, the observed effect involves the nitro-oxidative system modulation in both the serum and brain of mice. MN or syringic acid was able to contain the glutamate-induced cell death in the hippocampal and cortical slices implicating the neuroprotection activity in the antidepressant-like effect [15].

Others results showed that MN leaves has the potential in improving cognitive deficits in mice and that it may be useful to suppress aging, partially due to its scavenging activity of free radicals and high antioxidant capacity. MN significantly improved learning dysfunctions and increased memory retention [67].

The specific use of MN, whether fruit or leaf, in menopausal symptoms is scarce in the literature. An experimental study about the hydroalcoholic extract of MN leaves revealed important effects in ovariectomised rats. This hydroalcoholic extract induced a significant modification of the vaginal sear of ovariectomised rats, that indicated prolongations of the

proestrous and oestrous phases despite of the low level of estradiol [68]. Others plants that contain isoflavones have also induced a prolonged oestrous phase of the vaginal epithelium in ovariectomised rats [69, 70].

Furthermore, the administration of MN significantly prevented the atrophy of the vaginal epithelium and caused a vacuolation of the cell, which implied an increase in mucopolysaccharide content [68]. In relation to the toxicity, the dose used in this study did not change liver and kidney biochemical parameters. An acute toxicity testing procedures showed a dose of 2g/kg of body weight is considered to be the limit test [71].

Regarding use in humans, the results obtained by an ethnopharmacological research confirmed that the use of MN was effective for the treatment of climacteric symptoms, with a considerable consensus of popular use (greater than 50%), and could constitute a potential natural medicinal product for chemical studies and pharmacological agents, especially as a source of substances with estrogenic activity [17].

5. Others effects of *Morus nigra* L.

Phytochemical studies on MN have demonstrated the presence of others minerals, vitamins (β -carotenes, thiamine, riboflavin, niacin, biotin, and ascorbic acid), polysaccharides (1-deoxynojirimycin, rhamnose, and galacturonic acid), sterols (β -sitosterol, terpenoids, and sesquiterpenes), fatty acids (linoleic acid) and alkaloids (morrols and mulbaines) [51, 72-75].

It is proved that various phytochemicals isolated from MN have antibacterial, antithrombotic, antiviral, antifungal, antityrosinase, antihyperuricemic, antiatherogenic, antidiabetic and anticancer activities [76-79]. Several studies have also showed that MN possesses cardioprotective, hepatoprotective, neuroprotective, vasomodulatory, immunomodulatory and nephroprotective properties [80-84].

The crude extract of *M. nigra* possess prokinetic and laxative activities, possibly mediated through stimulation of muscarinic receptors and it has an antidiarrheal activity, possibly through a combination of Ca^{2+} channel blockade and anticholinergic effects [14].

Qadir et al. (2014) investigated the cytotoxic effect of MN on cancer cells and concluded that MN leaves possess anticancer activity against cervical (HeLa) cancer cell line.⁸² It was demonstrated that MN leaf extract has potential as a promising whitening agent of natural source against skin hyperpigmentation by tyrosinase inhibition. Cytotoxicity was not observed on murine melanomas, human keratinocytes and mouse fibroblastos [85].

Another experimental study aimed to evaluate biochemical and histopathological changes in kidneys of diabetic rats after treatment with a hydroalcoholic extract of MN. The glomerular damage was lower in the group treated with the black mulberry extract when compared to the control group, stating that its use may aid in the prevention of renal tissue damage in diabetic patients [86].

6. Conclusions

It has been proven that MN has a total amount of flavonoids superior to the other best known plants of the genus, justifying its popular use for several purposes, including as a CAM therapy for the treatment of menopausal symptoms. In relation to its use as a phytoestrogen, it was observed that most of the studies deal with the antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant effects of the constituent flavonoids. Few studies have investigated its specific estrogenic effect, which reflects the need for new studies, either experimental or clinical trials, as the double-blind randomized study about the use of this plant, which is being carried out by our team of researchers.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This study was sponsored by FAPEMA grant no 00832/15.

REFERENCES

1. Makara-Studzinska MT, Krysz-Noszczyk KM, Jakiel G. Epidemiology of the symptoms of menopause - an intercontinental review. *Przegląd menopauzalny = Menopause review*. 2014 Jun;13(3):203-11.
2. Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sarda VA. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014 Sep;143:61-71.
3. Nelson HD. Menopause. *Lancet*. 2008 Mar 1;371(9614):760-70.
4. Kopenhagen T, Guidozi F. Working women and the menopause. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2015 Jun;18(3):372-5.
5. Blumel JE, Castelo-Branco C, Binfa L, Gramagna G, Tacla X, Aracena B, et al. Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas*. 2000 Jan 15;34(1):17-23.
6. Malheiros ESdA, Chein MBdC, Silva DSMd, Dias CLL, Brito LGO, Pinto-Neto AM, et al. Síndrome climatérica em uma cidade do Nordeste brasileiro: um inquérito domiciliar. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2014;36:163-9.
7. Kopera H, van Keep PA. Development and present state of hormone replacement therapy. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology*. 1991 Oct;29(10):412-7.
8. Barrett-Connor E. Hormone replacement therapy. *Fortnightly review*. 1998;317(7156):457-61.
9. Lisabeth L, Bushnell C. Stroke risk in women: the role of menopause and hormone therapy. *The Lancet Neurology*. 2012 Jan;11(1):82-91.
10. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002 Jul 17;288(3):321-33.
11. Schulz VH, R.; Tyler, V. E. *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. São Paulo: Manole; 2002.
12. Aghababae SK, Vafa M, Shidfar F, Tahavorgar A, Gohari M, Katebi D, et al. Effects of blackberry (*Morus nigra* L.) consumption on serum concentration of lipoproteins, apo A-I, apo B, and high-sensitivity-C-reactive protein and blood pressure in dyslipidemic patients. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2015 Jul;20(7):684-91.
13. Araujo CM, Lucio Kde P, Silva ME, Isoldi MC, de Souza GH, Brandao GC, et al. *Morus nigra* leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. *Food & function*. 2015 Nov;6(11):3490-9.
14. Akhlaq A, Mehmood MH, Rehman A, Ashraf Z, Syed S, Bawany SA, et al. The Prokinetic, Laxative, and Antidiarrheal Effects of *Morus nigra*: Possible Muscarinic, Ca(2+) Channel Blocking, and Antimuscarinic Mechanisms. *Phytotherapy research : PTR*. 2016 Aug;30(8):1362-76.
15. Dalmagro AP, Camargo A, Zeni ALB. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. *Metabolic brain disease*. 2017 Dec;32(6):1963-73.
16. Turan I, Demir S, Kilinc K, Burnaz NA, Yaman SO, Akbulut K, et al. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017 2017/02/01;25(2):241-8.
17. Miranda M, Del-Vechio Vieira G, Alves M, Yamamoto C, Pinho J, Vieira de Sousa O. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil 2010.

18. Seeram NP, Momin RA, Nair MG, Bourquin LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2001 Sep;8(5):362-9.
19. Adams J AG, Barnes J, Broom A, Magin P. . *Traditional, Complementary and Integrative Medicine: An International Reader*. 1, editor. London: Palgrave MacMillan; 2012.
20. Tonob D, Melby MK. Broadening our perspectives on complementary and alternative medicine for menopause: A narrative review. *Maturitas*. 2017 May;99:79-85.
21. Mahmud K. Natural hormone therapy for menopause. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2010 Feb;26(2):81-5.
22. Rietjens I, Lousse J, Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British journal of pharmacology*. 2017 Jun;174(11):1263-80.
23. Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Annals of internal medicine*. 2002 Nov 19;137(10):805-13.
24. Jacquot Y, Rojas C, Refouvelet B, Robert JF, Leclercq G, Xicluna A. Recent advances in the development of phytoestrogens and derivatives: an update of the promising perspectives in the prevention of postmenopausal diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2003 Aug;3(5):387-400.
25. The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2000 Jul-Aug;7(4):215-29.
26. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2011 Jul 22;11(8):597-608.
27. Evers NM, van den Berg JH, Wang S, Melchers D, Houtman R, de Haan LH, et al. Cell proliferation and modulation of interaction of estrogen receptors with coregulators induced by ERalpha and ERbeta agonists. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014 Sep;143:376-85.
28. Dixon RA. Phytoestrogens. *Annual review of plant biology*. 2004;55:225-61.
29. Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2000 Jun;11(6):326-31.
30. Medjakovic S, Mueller M, Jungbauer A. Potential health-modulating effects of isoflavones and metabolites via activation of PPAR and AhR. *Nutrients*. 2010 Mar;2(3):241-79.
31. Barnes S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic research and biology*. 2010 Mar;8(1):89-98.
32. Taku K, Melby MK, Kronenberg F, Kurzer MS, Messina M. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Menopause*. 2012 Jul;19(7):776-90.
33. Jenks BH, Iwashita S, Nakagawa Y, Ragland K, Lee J, Carson WH, et al. A pilot study on the effects of S-equol compared to soy isoflavones on menopausal hot flash frequency. *Journal of women's health*. 2012 Jun;21(6):674-82.
34. Bolanos-Diaz R, Zavala-Gonzales JC, Mezones-Holguin E, Francia-Romero J. Soy extracts versus hormone therapy for reduction of menopausal hot flashes: indirect comparison. *Menopause*. 2011 Jul;18(7):825-9.
35. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May 25;276(21):17808-14.
36. Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta medica*. 2008 Oct;74(13):1656-65.

37. Li Y, Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. *PloS one*. 2013;8(1):e54369.
38. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gulpide E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993 May;45(5):399-405.
39. Hale GE, Hughes CL, Cline JM. Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002 Jan;87(1):3-15.
40. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW, Jr. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 1998 Dec;68(6 Suppl):1375S-9S.
41. Glazier MG, Bowman MA. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Archives of internal medicine*. 2001 May 14;161(9):1161-72.
42. Song WO, Chun OK, Hwang I, Shin HS, Kim BG, Kim KS, et al. Soy isoflavones as safe functional ingredients. *Journal of medicinal food*. 2007 Dec;10(4):571-80.
43. Tissier R, Waintraub X, Couvreur N, Gervais M, Bruneval P, Mandet C, et al. Pharmacological postconditioning with the phytoestrogen genistein. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007 Jan;42(1):79-87.
44. Carlson S, Peng N, Prasain JK, Wyss JM. Effects of botanical dietary supplements on cardiovascular, cognitive, and metabolic function in males and females. *Gender medicine*. 2008;5 Suppl A:S76-90.
45. Liu LX, Chen WF, Xie JX, Wong MS. Neuroprotective effects of genistein on dopaminergic neurons in the mice model of Parkinson's disease. *Neuroscience research*. 2008 Feb;60(2):156-61.
46. Alonso A, Gonzalez-Pardo H, Garrido P, Conejo NM, Llana P, Diaz F, et al. Acute effects of 17 beta-estradiol and genistein on insulin sensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats. *Age*. 2010 Dec;32(4):421-34.
47. Wei H. Photoprotective action of isoflavone genistein: Models, mechanisms, and relevance to clinical dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 39(2):271-2.
48. Komm BS, Chines AA. An update on selective estrogen receptor modulators for the prevention and treatment of osteoporosis. *Maturitas*. 2012 Mar;71(3):221-6.
49. Ho SC, Bacon WE, Harris T, Looker A, Maggi S. Hip fracture rates in Hong Kong and the United States, 1988 through 1989. *American journal of public health*. 1993 May;83(5):694-7.
50. Lanou AJ. Soy foods: are they useful for optimal bone health? *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2011 Dec;3(6):293-300.
51. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*. 2007 2007/01/01;103(4):1380-4.
52. Kamiloglu S, Serali O, Unal N, Capanoglu E. Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (*Morus nigra* L.) products 2013.
53. Rocha Souza G, Cabral Silva J, Gonçalves de Oliveira Júnior R, Raquel Gomes de Lima-Saraiva S, Leite Guimarães A, Oliveira A, et al. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (*Moraceae*) 2015.
54. He N, Zhang C, Qi X, Zhao S, Tao Y, Yang G, et al. Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis*. *Nature Communications*. [Article]. 2013 09/19/online;4:2445.
55. Jiang Y, Nie WJ. Chemical properties in fruits of mulberry species from the Xinjiang province of China. *Food Chem*. 2015 May 1;174:460-6.

56. Gundogdu M, Muradoglu F, Sensoy RIG, Yilmaz H. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*. 2011 2011/12/05/;132:37-41.
57. Chen H, Yu W, Chen G, Meng S, Xiang Z, He N. Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries. *Molecules*. 2017 Dec 21;23(1).
58. Matsui H, Ihara Y, Fujio Y, Kunisada K, Akira S, Kishimoto T, et al. Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes. *Cardiovascular research*. 1999 Apr;42(1):104-12.
59. Chan K-C, Huang H-P, Ho H-H, Huang C-N, Lin M-C, Wang C-J. Mulberry polyphenols induce cell cycle arrest of vascular smooth muscle cells by inducing NO production and activating AMPK and p53. *Journal of Functional Foods*. 2015 2015/05/01/;15:604-13.
60. Chen H, Pu J, Liu D, Yu W, Shao Y, Yang G, et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). *PloS one*. 2016;11(4):e0153080.
61. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Hernández F, Martínez JJ. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods*. 2015 2015/10/01/;18:1039-46.
62. Tallini LR, Pedrazza GPR, Bordignon SAdL, Costa ACO, Steppe M, Fuentesfria A, et al. Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25:219-27.
63. Zeni ALB, Moreira TD, Dalmagro AP, Camargo A, Bini LA, Simionatto EL, et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2017 Oct-Dec;89(4):2805-15.
64. Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, dos Santos MH, et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytotherapy research : PTR*. 2010 Oct;24(10):1496-500.
65. R. G. da S. Almeida J, L. GuimarÃEs A, Oliveira A, Araújo E, Silva F, F. Neves L, et al. Evaluation of Hypoglycemic Potential and Pre-Clinical Toxicology of *Morus nigra* L. (*Moraceae*)2011.
66. Oliveira ACB, Oliveira AP, Guimarães AL, Oliveira RA, Silva FS, Reis SAGB, et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (*Moraceae*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2013;15:244-9.
67. Turgut NH, Mert DG, Kara H, Egilmez HR, Arslanbas E, Tepe B, et al. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of D-galactose-induced aging mice. *Pharmaceutical biology*. 2016;54(6):1052-64.
68. Silva SN. Atividade Fitoestrogênica de *Morus Nigra* L, *Moraceae*, em ratas ovariectomizadas. Sao Luiz: Federal University of Maranhão; 2012.
69. Circosta C, Pasquale RD, Palumbo DR, Samperi S, Occhiuto F. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. *Phytotherapy research : PTR*. 2006 Aug;20(8):665-9.
70. Occhiuto F, Pasquale RD, Guglielmo G, Palumbo DR, Zangla G, Samperi S, et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytotherapy research : PTR*. 2007 Feb;21(2):130-4.
71. Health effects test No 423: Acute toxic class method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: OECD Publishing.; 2002.

72. Akbulut M, Ozcan MM. Comparison of mineral contents of mulberry (*Morus* spp.) fruits and their pekmez (boiled mulberry juice) samples. *International journal of food sciences and nutrition*. 2009 May;60(3):231-9.
73. Iqbal S, Younas U, Sirajuddin, Chan KW, Sarfraz RA, Uddin K. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (*Morus* sp.): a comparative study. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(6):6651-64.
74. Calin-Sanchez A, Martinez-Nicolas JJ, Munera-Picazo S, Carbonell-Barrachina AA, Legua P, Hernandez F. Bioactive compounds and sensory quality of black and white mulberries grown in Spain. *Plant foods for human nutrition*. 2013 Dec;68(4):370-7.
75. Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei DZ, Lu YH. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009 Oct 14;57(19):9133-40.
76. Fukai T, Kaitou K, Terada S. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 2005 Dec;76(7-8):708-11.
77. He H, Lu YH. Comparison of inhibitory activities and mechanisms of five mulberry plant bioactive components against alpha-glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013 Aug 28;61(34):8110-9.
78. Zheng ZP, Cheng KW, Zhu Q, Wang XC, Lin ZX, Wang M. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010 May 12;58(9):5368-73.
79. Wang CP, Wang Y, Wang X, Zhang X, Ye JF, Hu LS, et al. Mulberroside a possesses potent uricosuric and nephroprotective effects in hyperuricemic mice. *Planta medica*. 2011 May;77(8):786-94.
80. Farzaei MH, Shams-Ardekani MR, Abbasabadi Z, Rahimi R. Scientific Evaluation of Edible Fruits and Spices Used for the Treatment of Peptic Ulcer in Traditional Iranian Medicine. *ISRN Gastroenterology*. 2013;2013:12.
81. Kwon HJ, Kim YY, Choung SY. Amelioration effects of traditional Chinese medicine on alcohol-induced fatty liver. *World journal of gastroenterology*. 2005 Sep 21;11(35):5512-6.
82. Qadir MI, Ali M, Ibrahim Z. Anticancer activity of *Morus nigra* leaves extract. 2014. [Anti-cancer; *Morus nigra*]. 2014 2014-10-09;9(4):2.
83. Ns M, Hamed M, Sa A. Association between efficiency of certain medicinal plants and severity of renal disorders in rats 2012.
84. Painuly D, kumar Shukla R, Shukla A, Kumar V, Singh J, Porval A, et al. Physical evaluation, proximate analysis and antimicrobial activity of *Morus Nigra* seeds 2015.
85. de Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, William Fagg C, Neves Silva Guerra E, de Medeiros Nobrega YK, et al. Extracts of *Morus nigra* L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. *PloS one*. 2016;11(9):e0163130.
86. Rahimi-Madiseh M, Naimi A, Heydarian E, Rafieian-Kopaei M. Renal biochemical and histopathological alterations of diabetic rats under treatment with hydro alcoholic *Morus nigra* extrac. *Journal of renal injury prevention*. 2017;6(1):56-60.