

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA *Morus Nigra L.* (amora) EM
MODELOS ANIMAIS DE “ONDAS DE CALOR” NA MENOPAUSA**

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF *Morus Nigra L.* (mulberry) IN ANIMAL
MODEL OF HOT FLUSHES IN MENOPAUSE**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE *Morus Nigra L.* (morera) EN
MODELOS ANIMALES DE “OLAS DE CALOR” EN LA MENOPAUSIA**

Vitória Nunes de Brito¹

Centro Universitário Dom Bosco, São Luis, Maranhão

Taysa Mendonça Silva²

Centro Universitário Dom Bosco, São Luis, Maranhão

Walex Randly Alves Lima³

Centro Universitário Dom Bosco, São Luis, Maranhão

Klésio Serrão Mendes Filho⁴

Centro Universitário Dom Bosco, São Luis, Maranhão

Haissa Brito⁵

Centro Universitário Dom Bosco, São Luis, Maranhão

RESUMO

Conceitos abordados: O climatério caracteriza-se por um estado hormonal alterado e por uma diminuição na qualidade de vida, devido ao aparecimento de sintomas que podem causar um desconforto significativo para algumas mulheres. Os fogachos na menopausa são os sintomas mais comuns. Objetivo: Avaliar os efeitos do uso da *Morus nigra L.* nos distúrbios vasomotores na menopausa. Metodologia: As camundongas fêmeas foram divididas em três grupos controles: falso-operados (SHAM); ooforectomizadas (OOF), que receberam 0,1mL/100g de solução salina, ooforectomizadas (OOF+SAL) tratadas com solução estroprogestativa (OOF+EP-50µg/Kg); e 3 grupos teste: tratadas EH de *M. nigra* nas doses de 100, 250 e 500mg/kg, (OOF100, OOF250 e OOF500) diariamente, por v.o., durante 15 dias. Os animais foram submetidos à cirurgia de retirada dos ovários ou não e após a confirmação dos anestro, os

¹ Aluno de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: vitoriabrito3197@gmail.com.

² Aluno de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: taysamendoncas@outlook.com.

³ Aluno de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: walexrandly56@gmail.com.

⁴ Aluno de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: ksmendes1@gmail.com.

⁵ Docente do Curso de Medicina da UNDB. Especialista em Biologia Celular e Tecidual (UFPR). Mestre e Doutora em Farmacologia (UFPR). E-mail: haissa.brito@undb.edu.br.

animais foram submetidos ao tratamento. Resultados: No grupo OOF+EP, foi verificado uma redução na variação da temperatura caudal, quando comparado com animais OOF+SAL e um aumento quando comparado com animais SHAM. Já nos animais tratados com os extratos hidroalcoólicos, pode-se verificar um aumento na variação da temperatura caudal nas doses de 100 e 500 mg/kg. A dose de 250 mg/kg apresentou uma reversão na variação da temperatura caudal. Conclusão: Os extratos preveniram os fogachos neste modelo, com eficácia comparável à da terapia de reposição hormonal, sugerindo que mais estudos devem ser estimulados com o objetivo de se encontrar um possível composto que possa estar associado a melhora desses efeitos.

Palavras-chave: *Morus nigra* L . Fogachos. Menopausa.

ABSTRACT

Concepts themselves observed: The climacteric by an altered hormonal state and a change in the state of quality of life, due to the appearance of characteristics that can cause significant discomfort for some women. Menopausal hot flashes are the most common symptoms. Objective: To evaluate the effects of the use of *Morus nigra* L. on vasomotor disorders in menopause. Methodology: Female mice were strongholds in three control groups: sham-operated (SHAM); oophorectomized (OOF), who received 0.1mL/100g of saline solution, oophorectomized (OOF+SAL) treated with estrogestational solution (OOF+EP-50µg/Kg); and 3 groups tested: treated *M. nigra* EH at doses of 100, 250 and 500mg/kg, (OOF100, OOF250 and OOF500) daily, by v.o., for 15 days. The animals were selected for surgery to remove the ovaries or not and after the year of the selected animals, the animals were selected for treatment. Results: OOF+EP was selected for a reduction in tail temperature reduction when compared to OOF+SAL animals and an increase when compared to SHAM animals. In tail temperature treated animals, hydroalcoholic controls can increase the intensity increase at doses of 100 and 500 mg/kg. Conclusion: Preventive extracts are the hot flashes in this model, with effort comparable to replacement therapy hormone, suggesting that further studies should be encouraged in order to find a possible compound that may be associated with an improvement in these effects.

Keywords: *Morus nigra* L . Hot flashes. Menopause.

RESUMEN

Conceptos propios observados: El climaterio por un estado hormonal alterado y un cambio en el estado de calidad de vida, debido a la aparición de características que pueden causar molestias importantes para algunas mujeres. Los sofocos de la menopausia son los síntomas más comunes. Objetivo: Evaluar los efectos del uso de *Morus nigra* L. sobre los trastornos vasomotores en la menopausia. Metodología: Los ratones hembra fueron baluartes en tres grupos de control: con operación simulada (SHAM); ooforectomizadas (OOF), que recibieron 0,1mL/100g de solución salina, ooforectomizadas (OOF+SAL) tratadas con solución estrogestacional (OOF+EP-50µg/Kg); y 3 grupos probados: tratados con EH de *M. nigra* a dosis de 100, 250 y 500 mg/kg,

(OOF100, OOF250 y OOF500) diários, por v.o., durante 15 días. Los animales fueron seleccionados para cirugía para extirpar los ovarios o no y después del año de los animales seleccionados, los animales fueron seleccionados para tratamiento. Resultados: Se seleccionó OOF+EP por una reducción en la reducción de la temperatura de la cola en comparación con los animales OOF+SAL y un aumento en comparación con los animales SHAM. En animales tratados con temperatura de cola, los controles hidroalcohólicos pueden aumentar el aumento de intensidad a dosis de 100 y 500 mg/kg. Conclusión: los extractos preventivos son los sofocos en este modelo, con un esfuerzo comparable a la terapia de reemplazo hormona, lo que sugiere que se deben alentar más estudios para encontrar un posible compuesto que pueda estar asociado con una mejora en estos efectos.

Palabras clave: More nigra L . Sofocos. Menopausia.

1 INTRODUÇÃO

O climatério caracteriza-se por um estado hormonal alterado e por uma diminuição na qualidade de vida, devido ao aparecimento de sintomas que podem causar um desconforto significativo para algumas mulheres. Atualmente, com o aumento da expectativa de vida, as mulheres transcorrem um terço de suas vidas no climatério, que pode estender-se dos 35 aos 65 anos de idade (MOREIRA,2014; NELSON, 2008).

Para amenizar esses sintomas, novas alternativas biotecnológicas estão sendo investigadas como estudo de plantas medicinais, na tentativa de identificarmos novos alvos terapêuticos para controle dos sintomas e também compostos inéditos que não foram ainda identificados.

A *Morus nigra* L., conhecida como amoreira ou amora preta, é uma espécie pertencente ao gênero *Morus*, família Moraceae. Esse gênero possui 24 espécies e uma subespécie, com pelo menos 100 variedades conhecidas. 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 usadas como laxante, sedativo, expectorante, emoliente, calmante, diurético, agente hipoglicemiante, antisséptico, anti-inflamatória e antioxidante. (ERCISLI,2007; PADILHA, 2010).

Popularmente, as pacientes já utilizam essa planta para diversos fins. Porém, há necessidade de comprovação científica de que a utilização da planta é segura e com baixa incidência de efeitos adversos.

Baseado nisso, o objetivo geral do trabalho foi de avaliar o efeito do tratamento crônico com extratos de *Morus nigra L.* nos fogachos de animais na menopausa. Mais especificamente, padronizar o modelo de fogachos em animais, avaliar o tratamento com as três doses de extrato 100,250 e 500 mg/kg no modelo de fogachos induzidos por esteira em animais na menopausa, tanto de maneira quantitativa quanto de maneira qualitativa, através da termocâmara.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O período da menopausa 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, 2010).

A utilização da TRH caiu drasticamente em todo o mundo e muitas pacientes abandonaram a terapia hormonal e passaram a utilizar alternativas como as plantas medicinais. Para ser considerada medicinal, a planta deve ser capaz de produzir princípios ativos que possam alterar o funcionamento de órgãos e sistemas, restaurando o equilíbrio orgânico e fazendo parte do cotidiano da população por seu uso consagrado (MACIEL,2002). No contexto da síndrome climatérica, o uso de plantas medicinais com efeito estrogênico tem sido uma prática comum.

Este gênero contém uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides isoprenilados, estilbenos, cumarinas, cromonas e xantonas (NOMURA,1988; NOMURA,1994). Alguns desses compostos exibem propriedades biológicas interessantes tais como efeito antiflogístico, antiinflamatório, diurético e hipotensor (SYAH, 2000).

As isoflavonas (pertencente ao grupo dos flavonoides) e estilbenos são classificados como fitoestrógenos. Os fitoestrógenos são compostos derivados de plantas, populares 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, 2000; YEARLY,2007).

A preferência crescente pelos fitoestrógenos é justificada pelos benefícios evidenciados por estudos epidemiológicos, que sugerem a diminuição do risco de câncer de mama e da incidência dos sintomas climatéricos (COXAM, 2008; MESSINA, 2008). As isoflavonas são importantes na dieta da população asiática. Segundo alguns estudos, esta população possui menores taxas de fraturas osteoporóticas, doenças cardiovasculares, sintomas pós-menopáusicos e certos tipos de câncer do que a população ocidental (ORGAARA, 2008; USUI, 2006).

3 METODOLOGIA

Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFMA) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o Protocolo de número no. **23115.003777/2017-91**.

O primeiro grupo de experimentos teve como objetivo padronizar a técnica de indução de fogachos no laboratório. Após atingirmos a padronização adequada, fomos avaliar o efeito do tratamento crônico com o extrato da amora em modelo de ondas de calor em camundongos na menopausa. Primeiramente, os animais foram ovariectomizados ou não. Após a confirmação do anestro, os animais iniciaram a sessão de exercício físico forçado durante 3 semanas. Na quarta semana, foi realizada o experimento em si para testar os extratos em diferentes doses. Os animais serão distribuídos de acordo com esses grupos:

- Falso-Operado tratado com salina
- Ovariectomia tratado com veículo

- Ovariectomia tratado com estroprogestativo, 1 mg/kg, v.o.
- Ovariectomia tratado com extrato *M.nigra* dose 100 mg/kg
- Ovariectomia tratado com extrato *M.nigra* dose 250 mg/kg
- Ovariectomia tratado com extrato *M.nigra* dose 500 mg/kg

Segue abaixo a descrição dos procedimentos que foram utilizados:

Material botânico e Preparação do extrato hidroalcolólico: Folhas da espécie *Morus nigra* foram coletadas no Sul do Maranhão, Município de Sucupira do Norte – Brasil. Uma amostra da planta foi encaminhada ao Herbário Ático Seabra da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foi identificada e catalogada sob o número 1627. Após a coleta, as folhas foram secas em temperatura ambiente, pulverizadas em moinho para obtenção do pó. O pó foi submetido a processo de extração (maceração), durante 48 horas, com etanol 70%, na proporção de 1:3 v/v, e filtrado. Este procedimento foi repetido três vezes e o filtrado das três extrações foi reunido, concentrado em rotaevaporador e denominado extrato hidroalcolólico (EH). Para determinação do peso seco e rendimento foram utilizadas três alíquotas de 1ml do EH, separados, em três frascos previamente tarados. As alíquotas foram evaporadas sob corrente de ar quente e, em seguida, os frascos resfriados e pesados em balança analítica digital. Esta operação foi repetida diversas vezes até a obtenção de pesos constantes. A concentração obtida do extrato foi de 242 ng/ml.

Os animais foram previamente anestesiados com cetamina/xilasina (60/7,5 mg/kg, ip) e logo em seguida foi realizada uma assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana. Os ovários e as trompas foram identificados, as trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente, a incisão foi suturada. Após 21 dias foi feita a comprovação do anestro através do esfregaço vaginal. Animais falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico mas os ovários e as trompas permaneceram intactos.

Registro da temperatura caudal e processamento da imagem através da termografia em infravermelho :A temperatura da pele da cauda foi medida

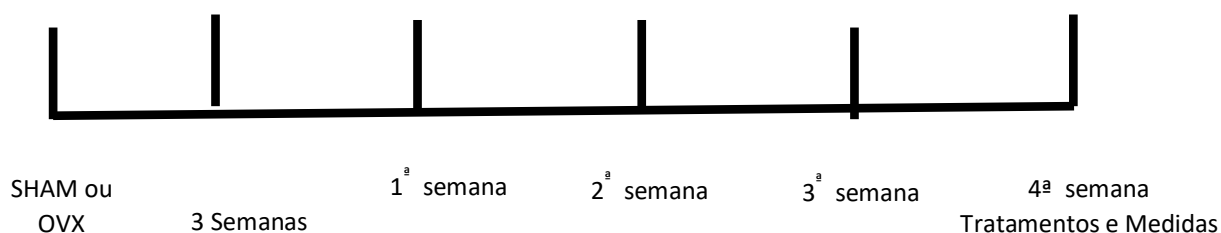
através da termocâmera FlirC2 através de luz infravermelha com lentes de vidro. A distância óptica para uma medida térmica adequada foi estabelecido para ser entre 16-25 cm. Os animais foram mantidos em contenção, com prévia ambientação dos mesmos, em um contensor LE5014 .Durante os experimentos, as imagens térmicas foram tiradas antes do exercício físico (basal) e ao longo de 6 minutos com blocos de 1 minuto de intervalo. Todas as medidas de temperatura caudal foram realizadas entre 08:00 e 17:00hs. O processamento da imagem foi realizado pelo Programa Image J.

Exercício forçado para indução de fogachos/ondas de calor:

Primeiramente, os animais foram condicionados durante 3 semanas na esteira com velocidade ascendente após a ovariectomia .Durante o condicionamento, após a corrida, os animais foram acomodados em um contensor aonde permaneceram 5 minutos a fim de condicionarem e lembrarem do exercício que estavam realizando frequentemente. No dia do experimento, os animais foram forçados a correr e após isso foram contidos antes (basal) e depois do exercício (6 minutos) para a medida da temperatura da temperatura caudal. A temperatura da cauda foi comparada com a média da temperatura da cauda medida de acordo com a essa equação:

ΔT_{ST} ($\Delta T_{ST} = (\text{temperatura da cauda}) - (\text{média da temperatura basal})$).

Figura 1 – Frequência de fases do ciclo estral de cada grupo no período de tratamento de 15 semanas.



3 semanas de treinamento:

1ª semana: velocidade 4 m/min – duração: 1 min
velocidade 7 m/min- duração: 5 min
Uma vez na semana

2ª semana: velocidade 7 m/min – duração: 5 min
velocidade 15 m/min- duração: 5 min
Uma vez na semana

3ª semana: velocidade 10 m/min – duração: 10 min
Duas vezes na semana

Fonte: Brito (2021).

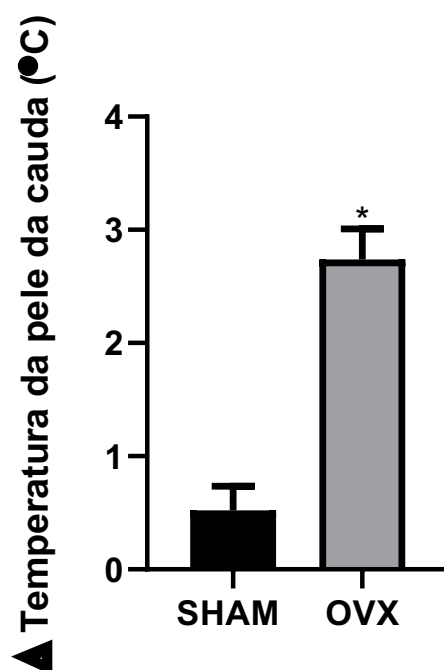
3.5 Análise estatística

One-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls foi utilizado para se analisar a diferença entre as análises bioquímica e os dados do ciclo estral foi demonstrado no formato de frequência. Foram consideradas significativas os dados com nível de significância de $p < 0,05$. Todas as analyses foram feitas utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, padronizamos a indução do modelo de fogachos em camundongos submetidos ou não a cirurgia de retirada dos ovários. Após comprovação do anestro, os animais foram submetidos à uma serie de sessões de caminhada na esteira com velocidade ascendente a medida que as semanas iriam avançando na tentativa do animal condicionar o comportamento da caminhada na esteira. Na última semana, logo após a sessão de exercício físico, os animais foram contidos e durante 6 minutos foi medido a temperatura cutânea caudal. Foi verificado que os animais submetidos à cirurgia falso-operado apresentaram uma menor variação de temperatura quando comparado com animais ovariectomizados (Fig.1). Essa variação brusca verificada nos animais ovariectomizados após a indução do estresse, mas não nos animais falso-operados, sugere que ali temos um episódio de fogachos, conforme visualizado e replicado pela literatura.

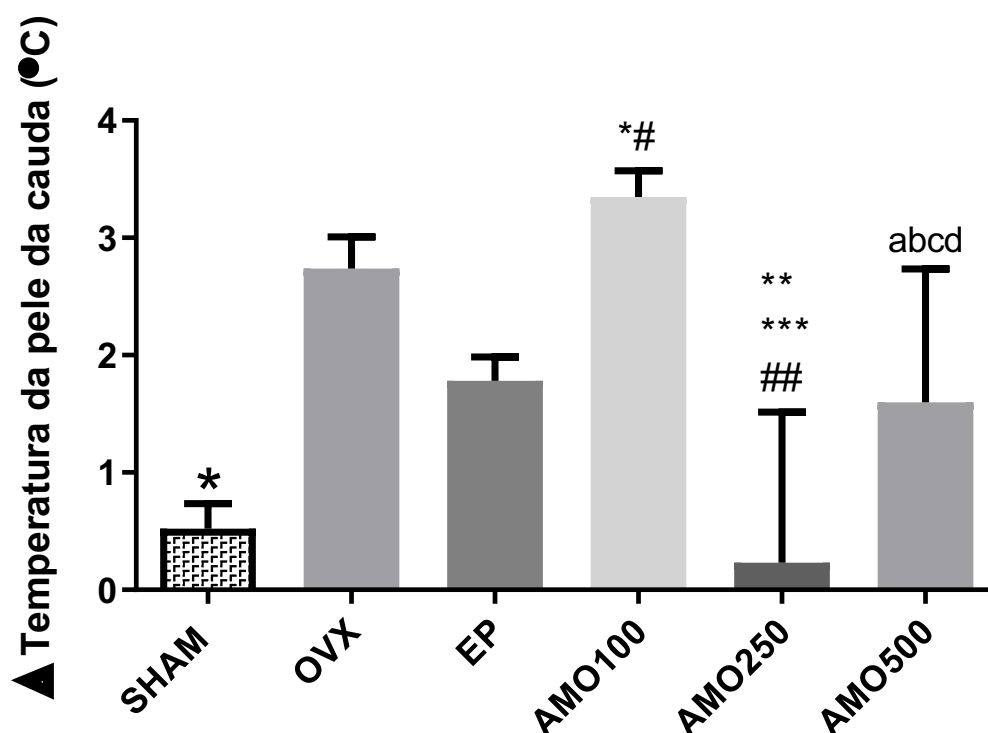
Figura 1: Variação da Temperatura da pele da cauda de camundongos submetidos a exercício forçado como indutor de fogachos em animais falso-operados e ovariectomizados. SHAM: ratas com gônadas intactas que receberam apenas o veículo (controle); OVX: camundongos ovariectomizados tratadas com salina; Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 8 - 10 animais por grupo experimental.



*Diferença estatística ao SHAM $p < 0,0001$. Fonte: Brito (2021).

Após ter demonstrado padronizar o modelo de indução de fogachos em animais ovariectomizados, resolvemos então investigar se o extrato hidroalcoólico da folha da *M.nigra* em três doses, administrados nos animais durante o período de 15 dias iria apresentar algum efeito nos sintomas vasomotores e outros da menopausa.

Figura 2: Variação na temperatura caudal dos animais. SHAM: ratas com gônadas intactas que receberam apenas o veículo (controle); OVX: camundongos ovariectomizados tratadas com salina; EP: camundongos ovariectomizados tratadas com estroprogestrativo; AMO100, AMO250 e AMO500: camundongos ovariectomizados tratados com extratos da *M.nigra* em diferentes doses. durante 15 dias. Os pontos e barras verticais representam a média \pm erro padrão das médias de 8 - 10 animais por grupo experimental.



*Diferença estatística amo100 x sham $p < 0,001$.# Diferença estatística amo100 x EP $p < 0,0001$.**Diferença estatística amo250 x OVX $p < 0,0001$.*** Diferença estatística amo250 x EP $p < 0,001$.## Diferença estatística amo250 x amo100 $p < 0,0001$.^a Diferença

estatística amo500 x sham $p=0,0036$.^b Diferença estatística amo500 x OVX $p=0,0230$.^c Diferença estatística amo500 x amo100 $p<0,0001$.^d Diferença estatística amo500 x amo250 $p=0,0005$. Fonte: Brito (2021).

A primeira variável investigada foi o fogacho devido a padronização previamente realizada. Quando os animais ovariectomizados foram tratados com estrogênio-progesterona, foi verificado uma redução na variação da temperatura caudal, quando comparado com animais ovariectomizados sem tratamento e um aumento quando comparado com animais falso-operados. Já os animais tratados com os extratos hidroalcoolicos, pode-se verificar um aumento na variação da temperatura caudal nas doses de 100 e 500 mg/kg quando comparado com os demais grupos, entretanto, somente a dose de 250 mg/kg apresentou uma reversão na variação da temperatura caudal .

No presente trabalho, foi avaliado o efeito do uso de folhas de *Morus nigra* L. (amora) como tratamento alternativo em modelos animais de “ondas de calor” na menopausa, além de outros sintomas relacionados ao hipoestrogenismo. A queixa mais frequente das pacientes que se apresentam a consulta ginecológica são os fogachos. Os mesmos são extremamente difíceis e complicados de manejar tanto farmacologicamente quanto não-farmacologicamente pois não há medicações específicas para esta patologia.

Os modelos de indução de fogachos em animais são imprescindíveis para que possa se compreender melhor sua fisiopatologia e com isso, desenvolver fármacos que possam auxiliar no controle desse sintoma, foram elaborados por diversos pesquisadores.

No presente trabalho, verificamos que antes do exercício forçado nos animais falso-operado e ovariectomizados, suas medidas eram em média, similares. Entretanto, verificamos que após o exercício forçado os valores da temperatura no grupo falso-operado iniciaram baixas e após alguns minutos, foram se elevando. Já nos animais ovariectomizados, logo em seguida à exposição do exercício forçado os animais tiveram um pico de temperatura elevado e ao longo do tempo, isso foi se reduzindo. A resposta produzida pelos

animais falso-operados pode ser verificada em animais que são submetidos ao exercício físico ou até mesmo em seres humanos, ativando respostas no eixo simpático/parassimpático com preservação da fisiopatologia dos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo anterior. Entretanto, os animais ovariectomizados em situação de hipoestrogenismo passam a regular sua temperatura de maneira diferente. Outro fator que contraprova isso, é que uma vez que o estrogênio é repostado através do tratamento com terapia de reposição hormonal, a variação de temperatura é restaurada aos níveis do falso-operado, reduzindo essa variação. Na verdade, se sugere que a ovariectomia exerce uma função mãos vasodilatadora que vasoconstritora nos vasos periféricos.

O mesmo resultado foi obtido por outros autores como SHUTO (2011) , demonstrando a clara reprodutibilidade da técnica .

O tratamento com os extratos nas doses de 250 e 500 mg/kg foram, dentre as três doses, os que mais reduziram a variação na temperatura caudal dos animais ovariectomizados. Além disso, é importante mencionar que a dose de 500 mg/kg exerceu efeito em quase todos os parâmetros analisados, sugerindo que a mesma possa possuir um constituinte que exerça sua função via estimulação estrogênica.

Até o momento, existem alguns poucos modelos em ratas ovariectomizadas tratadas com CGRP intravenoso ou administração intracerebroventricular de LHRH, uma vez que a elevação desses hormônios são verificados durante esses eventos . Entretanto, o diferencial do presente modelo é que o mesmo foi desenvolvido por um modelo utilizado e idealizado para pesquisa dos fogachos em mulheres. Para a indução desses episódios, as pacientes eram submetidas à exercício físico na esteira e acompanhadas ao longo do tempo a fim de verificarem alguma episódio transitório de fogachos e neste momento, efetuar a intervenção (FREEDMAN, 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o presente trabalho, sugerimos então que *M. nigra* é eficaz da prevenção dos sintomas associados ao climatério, nomeadamente os fogachos.

REFERÊNCIAS

- Coxam V. Phyto-oestrogens and bone health. **The Proceedings of the Nutrition Society**, 2008 May;67(2):184-95.
- Chedraui P, Perez-Lopez FR, Aguirre W, Calle A, Hidalgo L, Leon-Leon P. Perceived control over menopausal hot flushes in mid-aged women. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, 2010 Aug;26(8):607-11.
- Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, 2007 //;103(4):1380-4.
- Freedman RR. Physiology of hot flushes. **Am J Hum Biol**, 2001; 13; 453-464.
- 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.
- Messina M. Investigating the optimal soy protein and isoflavone intakes for women: a perspective. **Women's health**, 2008 Jul;4(4):337-56.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr. VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 2002;25:429-38.
- 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.
- 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.
- Nelson HD. Menopause. **Lancet**, 2008 Mar 1;371(9614):760-70.
- Nomura T, Hano Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. **Natural product reports**, 1994 Apr;11(2):205-18.
- 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.

Orgaard A, Jensen L. The effects of soy isoflavones on obesity. **Experimental biology and medicine**, 2008 Sep;233(9):1066-80.

Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, dos Santos MH, Antiinflammatory properties of Morus nigra leaves. **Phytotherapy research : PTR**, 2010. Oct;24(10):1496-500.

Syah YM, Achmad SA, Ghisalberti EL, Hakim EH, Iman MZ, Makmur L, et al. Andalasin A, a new stilbene dimer from Morus macroura. **Fitoterapia**, 2000 Dec;71(6):630-5.

Shuto H, Tominaga K, Yamauchi A, Ikeda M, Kusaba K, Mitsunaga D, Hirabara Y, Egawa T, Takano Y, Kataoka Y. The statins fluvastatin and pravastatin exert anti-flushing effects by improving vasomotor dysfunction through nitric oxide-mediated mechanisms in ovariectomy animals. **Eur Jour Pharm**, 2011, 651, 234-239.

Usui T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. **Endocrine Journal**, 2006 Feb;53(1):7-20.

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.