



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

ARNALDO LUIZ FLÁVIO SCHAEFER

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CHÁ DE
HIBISCO NOS PARÂMETROS HORMONAIS E
TESTICULARES DE RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Urologia, Programa de Cirurgia
e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Adjunto Paulo Roberto Kawano
Coorientador: Prof. Titular João Luiz Amaro

**Botucatu
2020**

ARNALDO LUIZ FLÁVIO SCHAEFER

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CHÁ DE
HIBISCO NOS PARÂMETROS
HORMONAIS E TESTICULARES DE
RATOS OBESOS

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção
do título de Mestre em
Urologia, Programa de
Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientador: Prof. Adjunto Paulo Roberto Kawano
Coorientador: Prof. Titular João Luiz Amaro

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schaefer, Arnaldo Luiz Flávio.

Avaliação dos efeitos do chá de hibisco nos parâmetros hormonais e testiculares de ratos obesos / Arnaldo Luiz Flávio Schaefer. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Paulo Roberto Kawano
Coorientador: João Luiz Amaro
Capes: 40102092

1. Chá - Uso terapêutico. 2. Obesidade. 3. Testículos.
4. Ratos. 5. Pesquisa médica translacional.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa*; Obesidade; Rato; Testículo.

Dedicatória

Aos meus pais, Sebastião e Vera, e aos meus irmãos, Gu e Tatá, que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei até chegar aqui.

À minha esposa Luiza, fonte de toda inspiração.

À minha filha Cecília, razão de tudo.

Agradecimentos

Ao professor Paulo Roberto Kawano, pela oportunidade desta realização, pelos ensinamentos durante o projeto e especialmente pela maestria na elaboração e condução de toda a dissertação, sempre com muita paciência, sabedoria e efetividade. Serei sempre grato a você.

Ao professor João Luiz Amaro, que primeiro me deu a oportunidade de sonhar com o projeto.

À professora Dra. Alessandra Melchert, docente do Departamento de Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ - UNESP, idealizadora e principal responsável pela supervisão e execução prática do projeto. Nossa gratidão pela oportunidade de estabelecermos esta profícua parceria.

Ao Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - HC-FMB, particularmente aos patologistas Dr. Flávio de Oliveira Lima e Dr. Vinicius Cardoso Nóbrega, pela disponibilidade e agilidade na avaliação histopatológica.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani (Departamento de Estatística do IBB) e Dr. Luis Gustavo Modelli de Andrade (Nefrologista do HCFMB), pela realização das análises estatísticas.

À Dra. Marjorie Golim, do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - HC-FMB, responsável por parte fundamental da execução do projeto.

Ao Laboratório da Unipex, na pessoa da Dra. Maria Regina Moretto, pelo apoio e leitura de parte (método ELISA) na condução do trabalho.

Às secretárias da Pós Graduação, aqui representadas pela Sra. Marcia Fonseca Piagentini Cruz, pela disposição e paciência em sempre ajudar.

Às secretárias do Departamento de Urologia, Andréa e Gabriela pelo apoio e disponibilidade.

À todos os familiares e amigos, que sempre acreditaram e estiveram ao meu lado durante a jornada.

RESUMO

Introdução e objetivo: A obesidade é considerada um problema epidemiológico grave em todo o mundo, estando associada à diversas comorbidades, com destaque para síndrome metabólica, as alterações na função renal, doenças cardiovasculares, hipertensão, hepatopatias, dislipidemias, distúrbios da fertilidade, entre outras. O uso do *Hibiscus sabdariffa* (HS) tem sido sugerido como eficaz no combate a obesidade devido aos seus efeitos no controle da lipemia e na perda de peso. O presente estudo tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos do HS sobre os parâmetros clínicos e testiculares em um modelo de obesidade induzida por dieta palatável hiperlipídica (DPH) em ratos.

Metodologia: 48 ratos *Wistar*, foram randomicamente divididos em 4 grupos (n=12): grupo controle (G1), animais alimentados com ração comercial para ratos (RR) e água; G2: RR e chá de HS (60 mg/kg/dia); G3: suplementação com DPH e água e G4: DPH e HS. Todos os animais receberam as dietas (RR ou DPH) e água/HS durante 16 semanas, *ad libitum*, com ganho de peso e ingesta alimentar/líquida monitoradas. Ao final do estudo, foi realizada coleta de sangue para determinação dos níveis séricos de testosterona, função renal e eletrólitos, perfil lipídico, bem como dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias. Após eutanásia, os testículos foram removidos para análise histopatológica.

Resultados: Os grupos suplementados (G3 e G4) apresentaram ganho de peso significativamente maior que o controle (616,2±98,9 e 591,8±78,9 vs 493,2±52g, respectivamente; p<0,05), porém com estabilização do peso em G4 a partir da 12 semana. Observou-se uma redução significativa da taxa de depuração da creatinina (CCr) no G3 em relação ao controle (1,34±0,83 vs 2,69±1,3mL/Kg/min, p<0,05), mas não no G4 (1,89±0,89 vs

2,69±1,3mL/Kg/min, $p>0,05$), sem alteração nos níveis séricos de creatinina. Os eletrólitos séricos mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade, com destaque para o sódio que se mostrou elevado em relação ao controle entre os animais que receberam o HS (138,23±2,55 vs 139,77±3,90 e 142,15±1,91mmol/L, G1xG2 e G4, respectivamente, $p<0,05$). A avaliação do perfil lipídico demonstrou redução das frações do HDL no G3 (44,54±0,78 vs 45,92±1,44mg/dL, respectivamente; $p<0,05$), bem como do LDL em G2 e G4 em relação ao controle (5,0±1,23 e 5,62±1,19 vs 7,54±5,14mg/dL, respectivamente; $p<0,05$). O G2 apresentou ainda acentuada redução dos triglicerídeos quando comparado a G1 (46,31±15,35 vs 83,2±34,11mg/dL, respectivamente; $p<0,05$). A análise das citocinas pró-inflamatórias revelou aumento da leptina em G3 e G4 em relação ao controle (8552,62 e 7537,30 vs 3157,54, respectivamente; $p<0,01$) e a IL-1 α apresentou redução em G2 e G4, sendo marcadamente mais expressiva neste último, quando comparada ao controle (6,74 e 0,91 vs 17,9, respectivamente; $p<0,05$). Embora não tenha sido observada variação nos níveis séricos de testosterona nos diferentes grupos, a análise histopatológica revelou uma redução no escore de Johnsen no G3 em relação ao controle, mas não no G4 (9,29 vs 9,49 e 9,44, respectivamente, $p<0,01$).

Conclusão: O HS evitou o ganho de peso nos animais suplementados com DPH, exercendo uma modulação favorável sobre a taxa de filtração renal e no perfil lipídico destes animais. Além disso, foi capaz de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e minimizar os danos causados na espermatogênese de ratos expostos a dieta obesogênica hipergodurosa, reforçando assim, as propriedades medicinais previamente atribuídas a esta planta.

Palavras-chave: Rato; obesidade; *Hibiscus sabdariffa*; testículo.

ABSTRACT

Purpose: The prevalence of obesity is increasing worldwide and may cause complex metabolic and endocrine changes with adverse outcomes. This study aimed to evaluate the effects of *Hibiscus sabdariffa* (HS) in clinical and testicular parameters in rats with obesity induced by high fat diet (HFD).

Methods: Forty-eight Wistar male rats were randomly divided into four groups (n=12): G1 (control): fed with commercial rat chow (CRC) and water intake; G2: CRC and HS in aqueous solution (HAS); G3: HFD and water and G4: HFD and HAS, *ad libitum*, for 16 weeks. Weight gain and food/liquid intake were monitored and creatinine clearance (CrC) was measured at the 8th and 16th weeks. At the end, blood samples were collected to determine serum levels of testosterone and electrolytes, renal function, lipid profile and pro/anti-inflammatory cytokines. After euthanasia, testes were removed for histopathological analysis.

Results: The supplemented groups showed significantly more weight gain than control (616.2 ± 98.9 and 591.8 ± 78.9 vs 493.2 ± 52 g, respectively; $p < 0.05$), but with weight stabilization in G4 from the 12th week. A significant reduction in CrC in G3 was observed when compared to control (1.34 ± 0.83 vs 2.69 ± 1.3 mL/kg/ min, $p < 0.05$), but not in G4 (1.89 ± 0.89 vs 2.69 ± 1.3 mL / Kg / min, $p > 0.05$), with no change in creatinine serum levels. Electrolytes remained within normal limits and the lipid profile analysis showed a reduction in HDL fractions in G3, as well as LDL in G2 and G4 in relation to control (5.0 ± 1.23 and 5.62 ± 1.19 vs 7.54 ± 5.14 mg/dL, respectively; $p < 0.05$). G2 also showed a marked reduction in triglycerides when compared to G1 (46.31 ± 15.35 vs 83.2 ± 34.11 mg/dL, respectively; $p < 0.05$). Analysis of proinflammatory cytokines showed an increase in leptin in G3 and G4 compared to control (8552.62 and 7537.30 vs 3157.54 , respectively; $p < 0.01$),

and IL-1 α decreased in G2 and G4, being more expressive in G4 when compared to the control (6.74 and 0.91 vs 17.9, respectively; $p < 0.05$). Although variations in testosterone serum levels were not observed in different groups, histopathological analysis revealed a reduction in Johnsen score in G3 when compared to control, but not in G4 (9.29 vs 9.49 and 9.44, respectively, $p < 0.01$).

Conclusion: HS prevented weight gain in supplemented animals with HFD, exerting a favorable modulation on the renal filtration rates and lipid profile of these animals. In addition, it was able to reduce the expression of proinflammatory cytokines and minimize the damage caused in spermatogenesis of rats exposed to HFD, thus reinforcing the medicinal properties previously attributed to this plant.

Key words: Rat, obesity, *Hibiscus sabdariffa*, testicle.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Relação bidirecional entre obesidade e baixos níveis de testosterona	22
Figura 2: Flor e detalhe do cálice carnosos do <i>Hibiscus sabdariffa</i>	28
Figura 3: Diagrama demonstrando os diferentes momentos e os parâmetros avaliados de acordo com grupo de estudo	36
Figura 4A: Pellets da ração comercial Presence [®] (Purina)	37
Figura 4B: Pellet moldado da DPH após secagem	37
Figura 5: Detalhe do cálice desidratado de <i>Hibiscus sbdariffa</i> utilizado para preparação da infusão (chá)	38
Figura 6: Animal na gaiola metabólica para coleta da urina de 24 horas	41
Figura 7: Ilustração da punção cardíaca para coleta de sangue	42
Figura 8: Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-4 color [®] (BD)	44
Figura 9: Corte histológico do testículo de rato (G1) demonstrando túbulo seminífero e células de Leydig(*), hematoxilina-eosina, 30x	45
Figura 10A: Corte histológico do testículo de rato (G1) demonstrando túbulo seminífero. Visão geral da espermatogênese: (a) espermatogônias, (b) espermatócitos, (c) espermátides, (d) espermatozoides e (L) células de Leydig; hematoxilina-eosina, 30x	47

Figura 10B: Detalhe do túbulo seminífero: (a) espermatogônias, (b) espermatócitos, (c) espermátides e (d) espermatozoides; hematoxilina-eosina, 60x 47

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão (DP) do peso corporal (em gramas) dos animais, segundo diferentes grupos de estudo, ao longo das 1^a, 4^a, 8^a, 12^a e 16^a semanas 49

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão (DP) da taxa de depuração da creatinina (mL/Kg/min) nos diferentes grupos de estudo, segundo momentos de avaliação (8^a e 16^a semanas) 51

Tabela 3: Valores médios e desvio padrão (DP) dos níveis de ureia/creatinina(mg/dL) e demais eletrólitos séricos (mEq/L), nos diferentes grupos de estudo, ao final do experimento (16^a semana) 52

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão (DP) do perfil lipídico sérico (mg/dL) nos animais, segundo diferentes grupos de estudo, ao final do experimento (16^a semana) 54

Tabela 5: Mediana de valores mínimo e máximo de Testosterona sérica (ng/dL) nos animais, segundo grupo de estudo 54

Tabela 6: Mediana de valores mínimo e máximo das interleucinas pró-inflamatórias (pg/mL) dosadas no plasma sanguíneo de ratos, segundo grupo de estudo 56

Tabela 7: Mediana de valores mínimo e máximo das interleucinas pró-inflamatórias dosadas no plasma sanguíneo de ratos, segundo grupo de estudo 57

Tabela 8: Média e desvio padrão do Escore de Johnsen e da contagem das células de Leydig (valores absolutos) no estroma testicular de ratos, segundo grupo de estudo 58

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- . μL : Microlitro.
- . AF: Atividade física.
- . AMP: Adenosina monofosfato.
- . ANGPTL2: Angiopoietin-like protein 2.
- . ATP: Adenosina trifosfato.
- . BMI: *Body mass index*.
- . Cal: calorias.
- . CBA: Cytometric Bead Array.
- . CCL2: Chemokine ligand 2 (Proteína quimiotática de monócitos 2).
- . Ccr: *Clearance* de creatinina.
- . CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais.
- . CONCEA: Controle de Experimentação Animal.
- . cr: Creatinina.
- . CXCL5: Chemokine ligand 5 (Proteína quimiotática de monócitos 5).
- . Da: Dalton.
- . dL: Decilitro.
- . DM: *Diabetes mellitus*.
- . DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- . DPH: Dieta palatável hiperlipídica.
- . DRC: Doença renal crônica.
- . ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática).

- . EUA: Estados Unidos da América.
- . FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- . g: Grama.
- . GH: Hormônio do crescimento.
- . HDL: Lipoproteína de alta densidade.
- . IgE: Imunoglobulina E.
- . IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1.
- . IgM: Imunoglobulina M.
- . IL- 10: Interleucina 10.
- . IL: Interleucina.
- . IL-18: Interleucina 18.
- . IL-1Ra: antagonista do receptor da Interleucina 1.
- . IL-1 α : Interleucina 1 alfa.
- . IL-4: Interleucina 4.
- . IL-6: Interleucina 6.
- . IL-8: Interleucina 8.
- . IM: Intramuscular.
- . IMC: Índice de massa corporal.
- . IMC: Índice de massa corpórea.
- . IP: Via intraperitoneal.
- . Kg: Quilogramas.
- . L: Litro.
- . LDL: Lipoproteína de baixa densidade.

- . LH: Hormônio luteinizante.
- . LP: Leptina.
- . M0: Momento inicial.
- . M1: Momento final (16 semanas após o início do experimento).
- . m²: Metros quadrados.
- . MCP-1 (ligantes da proteína de quimioatração de monócitos).
- . mEq: miliequivalente.
- . mg: Miligramas.
- . min: Minuto.
- . mL: Mililitro.
- . mmol: Milimol.
- . NAMPT: Nictinamide phosphoribosyltransferase.
- . ng: Nanograma.
- . nmol: Nanomol.
- . °C: Graus Celsius.
- . OMS: Organização Mundial de Saúde.
- . ON: Óxido nítrico.
- . pg: Picograma.
- . RBP4: Proteína de ligação ao retinol 4.
- . rpm: Rotações por minuto.
- . RS: Resistina.
- . SHBG: Sex hormone-binding globuline (Globulina ligadora do hormônio sexual).
- . SM: Síndrome metabólica.

- . T: testosterona.
- . TG: Triglicérides.
- . TNF: Fator de necrose tumoral.
- . UNESP: Universidade Estadual Paulista.
- . UNIPEX: Unidade de Pesquisa Experimental.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	04
1.1. Obesidade e Síndrome Metabólica	04
1.1.1. Panorama, definição e caracterização	04
1.1.2. Alterações induzidas pela obesidade	08
1.2. Inflamação e Obesidade	09
1.2.1. Caracterização	09
1.2.2. Citocinas e Inflamação	10
1.2.3. Citocinas Pró-inflamatórias	12
1.2.4. Citocinas Anti-inflamatórias	18
1.3. Alterações testiculares no paciente obeso	20
1.4. Tratamento da Obesidade	23
1.4.1. Tratamento comportamental e mudanças no estilo de vida	23
1.4.2. Atividade Física	24
1.4.3. Cirurgia Bariátrica	25
1.4.4. Tratamento Medicamentoso	26
1.4.5. O uso de produtos naturais	27
1.4.6. O Hibiscus sabdariffa e suas propriedades medicinais atribuíveis	27
02. HIPÓTESES E OBJETIVOS	31

03. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Local da Pesquisa	33
3.2. Animais de experimentação	34
3.3. Grupos experimentais	34
3.4. Delineamento do estudo e sequência experimental	35
3.5. Preparo da dieta palatável hiperlipídica (DPH)	37
3.6. Validação e preparo do chá de Hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	38
3.7. Anestesia geral	39
3.8. Eutanásia	39
3.9. Parâmetros avaliados	40
3.9.1. Peso corporal	40
3.9.2. Ingestão alimentar de sólidos e líquidos	40
3.9.3. <i>Clearance</i> de Creatinina e urina de 24 horas	40
3.9.4. Avaliação dos parâmetros inflamatórios, bioquímicos e hormonais	42
3.9.5. Análise histopatológica dos testículos	44
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5. RESULTADOS	49

5.1. Avaliação do ganho de peso dos animais	49
5.2. Monitorização das ingestas sólidas e líquidas	50
5.3. <i>Clearance</i> de Creatinina e urina de 24 horas	50
5.4. Avaliação dos parâmetros séricos bioquímicos e hormonais	51
5.5. Avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias	55
5.6. Análise histopatológica dos testículos	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9. ANEXOS	86
10. ARTIGO CIENTÍFICO	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

1.1.1. Panorama, definição e caracterização

As mudanças no estilo de vida do homem atual, observadas principalmente a partir da segunda metade do século XX, se deram, em grande parte, em decorrência da modernização e do desenvolvimento tecnológico, sendo impulsionadas pelas recentes transformações sociais e comportamentais. Entretanto, tem-se demonstrado que estes processos apresentam consequências desfavoráveis à saúde humana, nos diferentes aspectos biológicos, psicológicos e sociais [POZZAN et al, 2004].

Como resposta a esta transformação, modificações significativas nos hábitos alimentares da população contribuíram para adoção de um estilo de vida sedentário, resultando em uma verdadeira epidemia de distúrbios psicossociais e de doenças crônicas, tais como a obesidade, o *diabetes mellitus* (DM) e a hipertensão arterial, entre outras. Como consequência, as dislipidemias e o aumento do risco de doença cardiovascular passaram a ser uma característica marcante desta que passou a ser conhecida como a "sociedade moderna" [POZZAN et al, 2004].

A obesidade é uma alteração metabólica, geralmente definida como o aumento do peso corporal, com elevado índice de massa corpórea (IMC) e deposição de gordura corporal em extensão tal que acarreta prejuízos à saúde,

tais como dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos e distúrbios do aparelho locomotor, além de favorecer o surgimento de enfermidades potencialmente letais. Contudo, o grau de excesso de gordura, sua distribuição corpórea e as consequências para a saúde de seus portadores apresentam variação entre os obesos [CHANG et al, 2014].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. De acordo com estimativas da OMS, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos serão classificados como sobrepeso e mais de 700 milhões como obesos [ABESO, 2019]. No Brasil, levantamentos apontam que mais da metade da população já se encontra acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade. Entre as crianças, estima-se que 15% delas sejam consideradas obesas [ABESO, 2019]. Como se vê, esta epidemia de ordem mundial afeta tanto homens como mulheres, crianças, jovens e idosos [PROIETTO et al, 2004]. De acordo com Keaver e colaboradores, em 2030, sobrepeso e obesidade chegarão à proporção de 89% e 85% dos homens e mulheres, respectivamente, contribuindo ainda mais para o aumento da prevalência das doenças relacionadas à obesidade, como as coronariopatias, que poderão acometer 97% dos obesos; cânceres, em 61% e DM tipo 2 em 21% [KEAVER et al, 2018; ENGIN et al, 2017].

Segundo critérios da OMS, o diagnóstico da obesidade é realizado a partir do *body mass index* (BMI) ou índice de massa corporal (IMC), obtido a partir da relação entre peso corpóreo (em quilogramas - Kg) e estatura (em

metros ao quadrado – m²). De acordo com estes parâmetros, são considerados obesos indivíduos cujo valor de IMC for igual ou superior a 30 Kg/m².

Com relação à etiologia da obesidade, admite-se que esta seja multifatorial e suas causas podem ser atribuídas ao conjunto de fatores que envolvem dieta inadequada, alterações genéticas, estilo de vida sedentário e fatores psicológicos, onde o desbalanço entre ingesta e gasto calórico irá resultar no acúmulo de tecido adiposo [LEE et al, 2017].

Impulsionada pelo crescimento da prevalência da obesidade em nível global e, tendo esta última como seu principal fator de risco, a Síndrome Metabólica (SM) rapidamente se tornou mais um dos grandes problemas de saúde pública mundial. Entendida como um grupo de anormalidades clínicas, metabólicas e bioquímicas, a SM eleva o risco de inúmeras doenças como o DM tipo 2, eventos cardiovasculares adversos e esteatose hepática, entre outras [ZAFAR et al, 2018]. É importante destacar que, isoladamente, cada um dos componentes da SM é considerado um fator de risco para morbimortalidade. Porém, quando ocorrem simultaneamente, o risco torna-se maior que a soma dos riscos atribuídos a cada componente separadamente [ISOMAA et al, 2001]. Apenas a critério de exemplificação, a simples associação da SM com doença cardiovascular aumenta a mortalidade geral em cerca de 1,5 vez e o risco de ocorrência de um evento cardiovascular em cerca de 2,5 vezes [LAKKA et al, 2002].

Em 1998, a OMS sugeriu critérios para o diagnóstico da SM que incluem a associação de intolerância à glicose/DM e/ou resistência insulínica,

a pelo menos dois ou mais dos seguintes fatores: hipertensão arterial sistêmica (valores superiores a 140/90mmHg); hipertrigliceridemia (concentrações plasmáticas maiores que 150mg/dl) e/ou concentrações séricas de lipoproteína de alta densidade (HDL) inferiores a 35mg/dl e 39mg/dl, em homens e mulheres, respectivamente; obesidade central (definida por relação cintura-quadril superior a 0,90 para o sexo masculino e 0,85 para o feminino) e/ou IMC maior que 30 Kg/m² [ALBERTI et al, 1998].

A SM é um transtorno complexo e, assim como a obesidade, apresenta etiologia multifatorial. O aumento de sua prevalência, particularmente nas últimas décadas, tem sido atribuído às mudanças no perfil demográfico, com ênfase na urbanização e no envelhecimento das populações, sempre associados às alterações do estilo de vida, sobretudo hábitos alimentares, sedentarismo e obesidade [OLIVEIRA et al, 2004]. Frequentemente, outros fatores de risco estão presentes, tais como tabagismo, hipertensão arterial, consumo de álcool e fatores psicossociais, aumentando em mais de 90% o risco de infarto do miocárdio [OLIVEIRA et al, 2006].

De acordo com estudo realizado na população norte-americana, estima-se que aproximadamente 23,7% dos adultos sejam portadores da SM [FORD et al, 2004]. A relativa escassez de estudos metodologicamente bem delineados e conduzidos não nos permite afirmar com clareza a real prevalência da SM no Brasil, uma vez que apenas ensaios em determinadas populações ou regiões específicas estão disponíveis. Em estudo transversal realizado em 1.439 adultos em Salvador, a prevalência de SM foi de 19,0%

[BARBOSA et al, 2006]. Por outro lado, um outro levantamento realizado no mesmo estado, porém no distrito rural do semiárido baiano, encontrou uma prevalência de SM maior entre as mulheres (38,4%) do que em homens (18,6%) [OLIVEIRA et al, 2006].

1.1.2. Alterações induzidas pela obesidade

Conforme demonstrado, inúmeras doenças crônicas são diretamente causadas ou afetadas pela obesidade. Dentre elas, destacam-se o DM tipo 2, doenças cardiovasculares, numerosos tipos de cânceres, hipertensão arterial, osteoartrite, disfunção renal e infertilidade. Todas elas, por diferentes vias, resultam em piora da qualidade e diminuição da expectativa de vida em pacientes obesos [MELDRUM et al, 2017; MANNA et al, 2015].

A dislipidemia e a resistência à insulina, componentes da SM, estão diretamente associadas a obesidade. O aumento do estresse oxidativo e a inflamação crônica devido à liberação de citocinas inflamatórias pelo tecido gorduroso em excesso são as principais causas de manutenção de resistência insulínica [GIUGLIANO et al, 2004]. A depender de sua intensidade e duração, este ciclo pode propiciar o desenvolvimento de DM tipo 2 que, associado à dislipidemia, serão responsáveis pelo desenvolvimento de alterações vasculares e renais que irão contribuir diretamente para a degeneração da saúde do indivíduo obeso [MELDRUM et al, 2017].

Estudos populacionais têm demonstrado uma clara associação entre obesidade e o desenvolvimento e progressão de doença renal crônica (DRC)

[REIL et al, 2009; FOSTER et al, 2011; KRAMER et al, 2005]. Embora as morbidades obesidade-relacionadas como a hipertensão arterial e o DM tipo 2 estejam associadas à piora da função renal progressiva, a obesidade *per si* representa fator de risco independente para DRC [SALAMADA et al, 2011].

Como se não bastassem todos estes efeitos deletérios à saúde de seus portadores, a obesidade pode resultar ainda em distúrbios hormonais que afetam o sistema reprodutor masculino. Diferentes anormalidades envolvendo o sistema endócrino tem sido relatadas, tais como redução dos níveis de testosterona e do hormônio do crescimento, diminuição da resposta à leptina e à insulina [NEJATBAKHSH et al, 2016], elevação dos níveis de estradiol e, em homens com obesidade mórbida, alteração na secreção de gonadotrofinas [PASQUALI et al, 2006]. Da mesma forma, já foi sugerido que o aumento do IMC está relacionado baixos níveis de Inibina B, que é um marcador de função das células de Sertoli e da espermatogênese [JENSEN et al, 2004; PAULI et al, 2008]. Alguns autores têm investigado ainda se o excesso de peso corporal afetaria a integridade do DNA espermático, o que resultaria em diminuição da capacidade fértil de homens obesos [KORT et al, 2006].

1.2. INFLAMAÇÃO E OBESIDADE

1.2.1. Caracterização

Estudos recentes têm demonstrado que a obesidade é um estado

inflamatório crônico que contribui para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e por consequência, com a ocorrência de SM e suas morbidades [OUCHI et al, 2011; SCARPELLINI et al, 2012].

O tecido adiposo não é somente um reservatório de energia, mas é também um tecido/órgão endócrino que secreta diferentes substâncias bioativas, conhecidas como adipocitocinas ou adipocinas, as quais participam diretamente na secreção de fatores pró e anti-inflamatórios [SCARPELLINI et al, 2012]. Portanto, o tecido adiposo é dinâmico, sendo constituído não somente por adipócitos, mas também por outros tipos de células, como as células endoteliais vasculares, pericitos, células precursoras adiposas, células do sistema imunológico e outras [SAELY et al, 2012]. Acredita-se que a secreção desregulada dessas substâncias é um importante marcador para o desenvolvimento dos distúrbios metabólicos encontrados em pacientes obesos [OUCHI et al, 2011].

1.2.2. Citocinas e Inflamação

Existem dezenas de citocinas, muitas delas conhecidas com o nome de interleucina (IL). Algumas delas mantiveram sua descrição biológica original, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), por exemplo.

Citocinas são proteínas de sinalização secretadas por diferentes tipos celulares e que atuam, através de mecanismos autócrino e parácrino, sobre outras células. Podem apresentar redundância, com várias citocinas exercendo a mesma função ou atuar em sinergismo, onde diferentes citocinas atuam em

conjunto com a mesma finalidade. Outras citocinas podem ainda exibir comportamento antagônico, onde a ação de uma se contrapõe ou anula o resultado de outras. De maneira geral, em um processo inflamatório/infeccioso, estas citocinas interagem entre si regulando sua produção e atividade em outras células, aumentando ou diminuindo assim, a resposta inflamatória [OLIVEIRA et al, 2011].

Uma das maneiras de olhar para as citocinas é considerar o seu papel no processo infeccioso e/ou inflamatório. Dessa forma, de maneira um tanto simplista, pode-se dizer que algumas citocinas promovem claramente a inflamação, sendo por isso chamadas citocinas pró-inflamatórias, enquanto outras, suprimem a atividade inflamatória e são classificadas como citocinas anti-inflamatórias.

Este conceito de que algumas citocinas atuam, principalmente, induzindo a inflamação enquanto outras a suprimem está baseado na presença de genes que codificam a síntese de pequenas moléculas mediadoras deste processo e que tem sua produção aumentada durante a inflamação. Sendo assim, genes pró-inflamatórios por exemplo, codificariam enzimas (Fosfolipase tipo A2, a Ciclooxigenase 2 (COX-2) e o Óxido Nítrico sintase) que aumentam a síntese de fator de ativação plaquetária e leucotrienos, prostanoídes e óxido nítrico. Outra classe de genes regulam a produção de marcadores pró-inflamatórios, como as quimiocinas, pequenos peptídeos de 8.000 Da, que facilitam a quimiotaxia dos leucócitos para os tecidos. Tomados em conjunto, citocinas pró-inflamatórias e a própria inflamação constituem

uma cascata de produtos que intensificam uma reação, que geralmente, é mantida sob controle em pessoas saudáveis [DINARELLO et al, 2000].

Contrariamente, citocinas anti-inflamatórias modulariam esse processo, ou pelo menos suprimiriam a intensidade desta cascata inflamatória, promovendo um “equilíbrio” entre os efeitos pró e anti-inflamatórios. Muitos autores acreditam que as citocinas sejam responsáveis por determinar o resultado final de muitas doenças, seja em curto ou longo prazo. Isto porque estudos têm sugerido que a suscetibilidade para algumas destas condições é geneticamente determinada pelo desequilíbrio na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias [DINARELLO et al, 2000].

1.2.3. Citocinas Pró-inflamatórias

As adipocitocinas pró-inflamatórias mais conhecidas são a Leptina, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a Interleucina-6 (IL-6). Mais recentemente, outros marcadores de atividade inflamatória foram identificados, como a Interleucina 18 (IL-18), a Resistina, a Lipocalina 2, a Proteína de ligação ao retinol 4 (RBP4), as quimiocinas como a CCL2 e a CXCL5 (Chemokine ligand 5), o ANGPTL2 (Angiopoetin-like protein 2) e NAMPT (Nictinamide phosphoribosyltransferase) [SCARPELLINI et al, 2012].

a. Leptina (LP)

A LP foi o primeiro hormônio a ser categorizado com uma adipocitocina

por ser quase totalmente secretada pelo tecido adiposo. Age no sistema nervoso central, mais especificamente em nível hipotalâmico, levando à redução da ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético. Várias outras ações fisiológicas foram ainda atribuídas à leptina, entre elas, envolvimento na função reprodutiva, hematopoiese, angiogênese, resposta imune e formação óssea [CIOFFI et al, 1996]. Entretanto, reconhece-se que a região do cérebro associado ao controle central do balanço energético constitui o maior alvo dessa adipocitocina.

Existe uma correlação direta entre os níveis plasmáticos de LP e quantidade de tecido adiposo. Assim, indivíduos obesos apresentam maior quantidade de LP circulante, porém, não exibem comportamento de saciedade alimentar. Esse paradoxo pode ser explicado pela constatação da diminuição de seu transporte através da barreira hematoencefálica bem como pela menor expressão/mutação observada em seus receptores resultando em uma falha na ativação dos mediadores neuroendócrinos reguladores do peso corporal [KALRA et al, 2001].

Muitos estudos têm demonstrado que a LP tem ação direta e inibitória sobre a secreção de insulina pela ativação dos canais de potássio dependentes de adenosina trifosfato (ATP) ou via interação com a sinalização da proteína AMP quinase A [SEUFERT et al, 1999]. Evidências adicionais sugerem que a leptina promove a oxidação de triacilgliceróis no tecido adiposo e reduz o acúmulo de gordura, inibindo a lipogênese e estimulando a lipólise [AHREN et al, 1999].

Sua atividade pró-inflamatória se dá pelo aumento da produção do fator de necrose tumoral (TNF) e de IL-6 nos monócitos e pelo estímulo da produção de quimiocinas pelos macrófagos, que vão levar a aumento na produção de linfócitos T citotóxicos (CD8+) e manter a cascata inflamatória ativada.

b. Resistina (RS)

A RS pertence a uma família de proteínas ricas em cisteína, encontrada em locais onde a inflamação se faz presente. É produzida especificamente pelo tecido adiposo branco e expressa em monócitos e macrófagos [QATANANI et al, 2007].

Assim como a leptina a RS aumenta a produção de TNF e IL-6 pelos monócitos [BOKAREWA et al, 2005], sendo por isso considerada um marcador com potencial inflamatório [FRANCISQUETI et al, 2015]. Sua secreção está fortemente relacionada à resistência à insulina, verificando-se aumento nas concentrações de RS em animais obesos e diabéticos [STEPPAN et al, 2001]. Estudos tem demonstrado que sua administração é capaz de induzir resistência à insulina em ratos [STEPPAN et al, 2001] e em humanos [REILLY et al, 2005].

c. Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Produzida em sua maioria por monócitos e macrófagos, o TNF apresenta papel fundamental nas doenças inflamatórias e autoimunes. Sua

expressão encontra-se notadamente aumentada em modelos experimentais de animais com obesidade e DM tipo 2 [FRIEDMAN et al, 1998], assim como em pacientes obesos. Da mesma forma, a perda de peso está relacionada a diminuição de sua expressão e melhora da sensibilidade à insulina [FRUHBECK et al, 2001].

Apesar de ser secretado pelos adipócitos, apenas uma pequena parte do TNF expresso é atribuída a estas células, sendo a grande maioria produzida pelos macrófagos infiltrados no tecido adiposo inflamado [WEISBERG et al, 2003]. Sua correlação com o processo inflamatório é demonstrada pelo fato de que o aumento na produção de TNF leva a aumento na produção de outras citocinas pró-inflamatórias e reduz a produção de citocinas anti-inflamatórias como as adiponectinas [KARASTERGIOU et al, 2010].

d. Interleucina 1 alfa (IL-1 α)

A IL-1 também é uma das importantes citocinas pró-inflamatórias, estando relacionada com a indução de febre, síntese de proteínas da fase aguda hepática e liberação de neutrófilos como mediador de respostas inflamatórias agudas, juntamente com algumas outras citocinas [HE et al, 2006]. A IL-1 é produzida e secretada por uma variedade de células, incluindo macrófagos/monócitos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e hepatócitos [BEVILACQUA et al, 1984].

A família do gene IL-1 consiste em duas moléculas agonistas principais, ou seja, IL-1 α e IL-1 β , e uma citocina antagonista, o antagonista do receptor

da IL-1 (IL-1Ra) [DINARELLO et al, 1998]. Tanto a IL-1 α como a IL-1 β são produzidas por linfócitos B ou monócitos nos locais de inflamação.

Estudos realizados tanto em ratos como em humanos obesos encontraram níveis plasmáticos elevados de IL- α , estando os mesmos diretamente correlacionados com a porcentagem de gordura corpórea [DI RENZO et al, 2007]. Da mesma forma, a administração exógena de IL- α demonstrou uma elevação dos níveis de triglicérides após 12 horas, bem como inibição da secreção de adiponectina e aumento da produção de IL-6 de maneira da dose dependente. Outros autores sugerem ainda um papel da IL-1 α como mediadora da resistência celular à insulina [HE et al, 2006].

e. Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina inflamatória que atua na mediação de uma série de funções, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos [KAMIMURA et al, 2003]. Encontra-se aumentada no plasma de indivíduos obesos e assim como ocorre com o TNF, a redução de peso leva a sua diminuição. Um terço de toda IL-6 circulante é produzida pelo tecido adiposo, sendo que o tecido adiposo visceral produz e secreta três vezes mais IL-6 do que o subcutâneo [FRIED et al, 1998].

Os níveis plasmáticos de IL-6 apresentam-se positivamente correlacionados com o aumento da massa corporal e, inversamente, à sensibilidade à insulina. Há indícios de que a IL-6 seja capaz de alterar a

sinalização insulínica nos hepatócitos, mediante a inibição do receptor de insulina dependente de autofosforilação, promovendo, desse modo, resistência à ação da insulina no tecido.

f. Interleucina 8 (IL-8)

Trata-se de uma das primeiras quimiocinas descobertas, sendo inicialmente identificada como um fator quimiotático produzido por monócitos ativos e macrófagos, que promovem a migração coordenada e direcional de células do sistema imune como neutrófilos, basófilos e linfócitos T [BAGGIOLINI et al, 1989].

A expressão de IL-8 é influenciada por diversos estímulos, principalmente que desencadeiam estresse celular, como por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio, deprivação de nutrientes, hipóxia e secreção de fatores pró-inflamatórios como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ ou infiltração de macrófagos.

Estudos recentes têm demonstrado que, a exemplo do que ocorre com a IL-6, o tecido adiposo visceral libera mais IL-8 do que o tecido adiposo subcutâneo, razão pela qual os níveis de IL-8 circulante estão elevados na obesidade. Esses achados sugerem a possibilidade de que a elevação das quimiocinas em pacientes obesos contribuem para patologias relacionadas à obesidade, como diabetes e aterosclerose [KIM et al, 2006].

1.2.4. Citocinas anti-inflamatórias

As citocinas anti-inflamatórias são uma série de moléculas imunorreguladoras que controlam a resposta pró-inflamatória, auxiliando no combate ao estado patológico nos estados inflamatórios sistêmicos. As principais citocinas anti-inflamatórias incluem as interleucinas (IL), tais como a IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13 [OPAL et al, 2000].

Estudos sugerem ainda evidências crescentes de algumas citocinas produzidas diretamente pelos adipócitos, como a adiponectina por exemplo, possuem propriedades imunossupressoras potentes, capazes de induzir a produção dos mediadores anti-inflamatórios em monócitos humanos primários, macrófagos derivados de monócitos e células dendríticas. Além disso, a adiponectina reduziu significativamente a produção da citocina pró-inflamatória IFN- γ em macrófagos humanos [OPAL et al, 2000].

a. Adiponectina (ADP)

São quase que exclusivamente produzidas pelos adipócitos [OUCHI et al, 2011], mas são também secretadas, em menor proporção, pelo músculo esquelético, células endoteliais e cardiomiócitos [KADOWAKI et al, 2005]. É abundante no plasma, em uma faixa que varia de 3-30 μ g/mL, sendo observada uma forte correlação negativa entre adiponectina e IMC, tanto em humanos quanto em animais [OUCHI et al, 2003].

Estudos em modelos experimentais tem demonstrado uma ação protetora das adiponectinas contra as disfunções metabólicas obesidade

relacionadas [SCARPELLINI et al, 2012], agindo como fator cardioprotetor e melhorando a sensibilidade dos tecidos à insulina [FRANCISQUETI et al, 2015]. Sua secreção é inibida por fatores pró-inflamatórios, hipóxia e estresse oxidativo [SAMARAS et al, 2010]. Adicionalmente, baixos níveis de adiponectinas estão relacionados a ocorrência de diversos tipos de câncer [ISHIKAWA et al, 2005; BRAKENHIELM et al, 2004].

Essa adipocina também aumenta a sensibilidade à insulina e previne a inflamação vascular [RONTI et al, 2006] inibindo a adesão de monócitos ao endotélio vascular, suprimindo, inclusive, a expressão de TNF- α . Nesse sentido, a ADP parece proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose. Foram observadas várias disfunções metabólicas associadas em indivíduos que apresentaram uma redução nos teores circulantes da ADP, onde a maior ocorrência de diabetes, hipertensão, dislipidemia e aterosclerose sugere a existência de associação entre hipoadiponectinemia e o estabelecimento da síndrome metabólica [FUNANASHI et al, 2004].

Algumas evidências suportam ainda que a ação anti-inflamatória das adiponectinas seja modulada por ação macrofágica através da supressão do fator kappa B [OHASHI et al, 2010].

b. Interleucina-4 (IL-4)

É uma glicoproteína com propriedades anti-inflamatórias, sendo produzida por linfócitos T CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos, induzindo

a formação de IgM e IgE; imunoglobulinas estas particularmente importantes nas respostas alérgicas. Em pacientes obesos sua ação anti-inflamatória se dá pela ação sobre os mastócitos ativados, diminuindo os efeitos de adipocinas inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-8.

c. Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a síntese de adipocinas pró-inflamatórias por linfócitos T e macrófagos. Ela inibe a síntese do TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 em monócitos e macrófagos. Embora várias hipóteses tenham sido propostas para explicar seu mecanismo de ação, um dos mais estudados sugere que a IL-10 promova a inibição da ativação do fator de transcrição nuclear em monócitos e células T [FERNÁNDEZ et al, 2002].

Estudos demonstram ainda que a IL-10 está correlacionada negativamente com os níveis de IMC, porcentagem de gordura e glicemia de jejum. Da mesma forma, níveis baixos de IL-10 estão associados à síndrome metabólica, alterações de sensibilidade à insulina e ao DM tipo 2 [BLÜHER et al, 2005].

1.3. ALTERAÇÕES TESTICULARES NO PACIENTE OBESO

A testosterona é o principal hormônio sexual masculino e é quase que exclusivamente produzido pelos testículos. Sua ação está relacionada ao desenvolvimento de características da sexualidade e masculinidade como

aumento de massa muscular, pelos faciais, libido e produção espermática [RAHNEMA et al, 2015].

É reconhecido, há mais de trinta anos, que homens obesos apresentam menores taxas de testosterona que indivíduos magros [GLASS et al, 1977]. Desde então, diversos estudos populacionais têm procurado evidências que justifiquem este fato. Um estudo de coorte conduzido na Europa, envolvendo 3.219 homens, mostrou que obesidade aumenta em 8,7 vezes, e o sobrepeso em 3,3 vezes, o risco relativo de desenvolvimento de hipogonadismo, definido pelos autores como testosterona total abaixo de 10,5 nmol/L [LEE et al, 2009]. Da mesma forma, outra pesquisa realizada com 1.849 homens norte-americanos obesos evidenciou que 40% deles apresentavam baixos níveis de testosterona [DHINDSA et al, 2010]. De fato, observa-se que, quanto maior o IMC, maior a redução dos níveis de testosterona, onde homens com IMC acima de 35-40 Kg/m² apresentam redução de 50% nos níveis de testosterona quando comparados com homens magros [ALLAN et al, 2010].

Entretanto, as reais explicações do porquê indivíduos obesos apresentam redução dos níveis de testosterona em comparação com indivíduos magros ainda não está completamente esclarecida. Uma das inúmeras hipóteses apresentadas sugere que a aromatização da testosterona em estradiol causada pelo tecido adiposo inflamado e o estado de resistência insulínica - característica dos obesos, atuariam em nível hipotalâmico no sistema nervoso central, bloqueando o eixo hipotalâmico-hipofisário (Figura 1) [FUI et al, 2014].

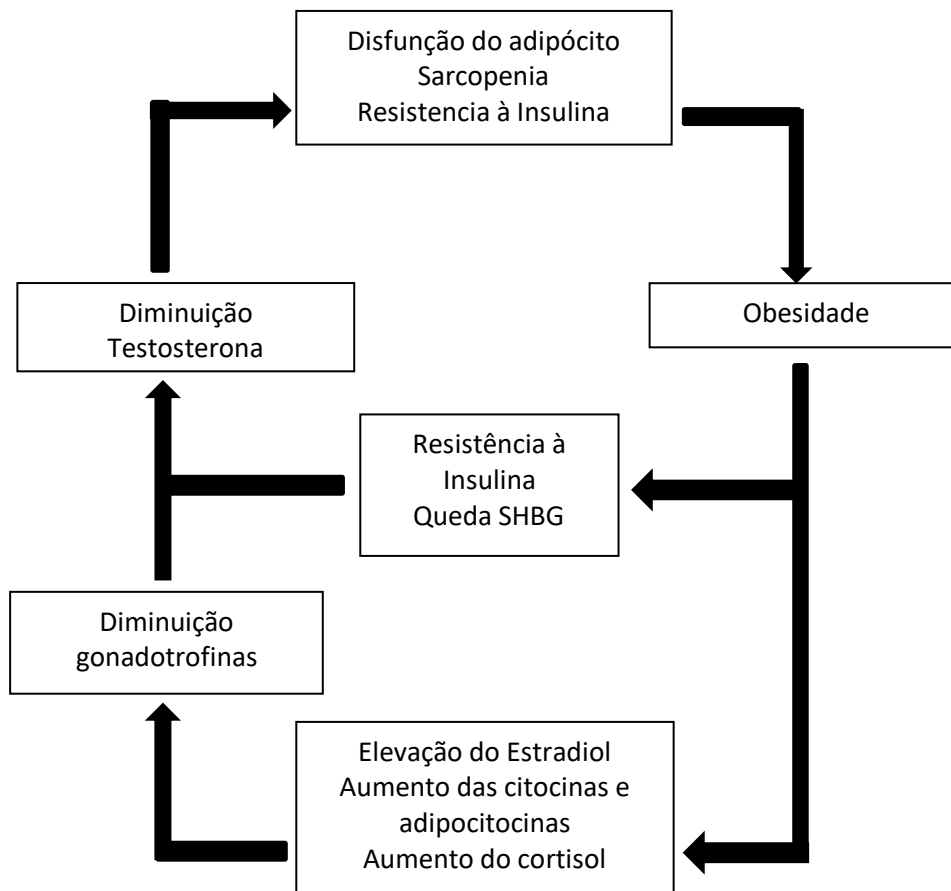


Figura 1: Relação bidirecional entre obesidade e baixos níveis de testosterona [FUI et al, 2014].

Vermeulen e colaboradores, estudando grupo de homens obesos, verificaram que os níveis de SHBG correlacionaram-se inversamente com os níveis de insulina, IGF-1 e concentração do hormônio do crescimento (GH) em 24 horas [VERMEULEN et al, 1968]. Assim, a queda do nível de testosterona total estaria ligada ainda à menor disponibilidade de SHBG em pacientes obesos, os quais são condicionados aos altos níveis de insulina circulante [PLYMATE et al, 1991]. Um fato que corrobora esta teoria é que

a perda de peso em pacientes obesos com níveis de testosterona sabidamente diminuídos foi capaz de reduzir a concentração de insulina plasmática a níveis quase normais e resultou na normalização dos níveis de SHBG e testosterona séricos [LIMA et al, 2000].

Da mesma forma, é bem conhecido que a redução nos níveis de testosterona associada à obesidade é acompanhada por uma diminuição intratesticular suficiente desse hormônio para alterar a espermatogênese e reduzir a quantidade de espermatozoides em indivíduos obesos [HAMMOUND et al., 2008]. Outro fator a ser considerado é a grande quantidade de gordura depositada no escroto de pacientes obesos, onde a resposta inflamatória crônica e seus subprodutos podem causar estresse oxidativo [DANDONA et al., 2005], oxidando lipídios, aminoácidos e carboidratos; além de danificar o próprio epidídimo e o DNA dos espermatozoides ali armazenados [KASTURI et al., 2008].

1.4. TRATAMENTO DA OBESIDADE

O tratamento da obesidade deve ser individualizado, levando-se em conta a idade, sexo, grau de obesidade, riscos individuais à saúde, características psicocomportamentais e resultado de tentativas anteriores de perda de peso [HAINER et al, 2008].

1.4.1. Tratamento comportamental e mudanças no estilo de vida

Embora existam inúmeras opções de tratamento para obesidade com

promessas de bons resultados, parece consensual que o padrão ouro seja um plano nutricional adequado associado à atividade física supervisionada, objetivando assim um maior gasto de energia [PRADO et al, 2010]. Entretanto, a estratégia de tratamento da obesidade tem sofrido profundas modificações nos últimos anos, onde a abordagem nutricional atual baseia-se mais em um planejamento de reeducação alimentar do que nas dietas tradicionais, uma vez que estas últimas frequentemente fracassam em manter a perda de peso [PRADO et al, 2010].

Por outro lado, é sabido que o comprometimento com as mudanças no estilo de vida associado à necessidade de manutenção duradoura das intervenções propostas, condições estas indispensáveis para o sucesso do tratamento, são os principais responsáveis pelas altas taxas de abandono e fracasso terapêuticos. Neste sentido, com intuito de facilitar a adaptação e melhorar a adesão dos indivíduos ao tratamento escolhido, muitos profissionais têm optado pela adoção medidas alternativas complementares.

1.4.2. Atividade Física

A atividade física (AF) contribui não apenas para um aumento do gasto energético e da perda de gordura, mas também protege contra a perda de massa corporal magra, melhora a aptidão cardiorrespiratória, reduz os riscos à saúde relacionados à obesidade, e promove sensação de bem-estar [HAINER et al, 2008].

Recomenda-se AF de intensidade moderada, com duração de 30

minutos, realizada 5 dias por semana, a qual pode resultar em uma perda efetiva de peso de até 0,5 kg/mês [HAINER et al, 2008]. Para pacientes com artrite e problemas graves de mobilidade, é recomendável a realização de exercícios de baixo impacto, como hidroginástica, por exemplo.

Qualquer tipo de AF regular representa um importante fator que contribui para a manutenção da perda de peso em longo prazo [PHALAN et al, 2006]. Curiosamente, a associação de exercícios estruturados ao aconselhamento dietético pode não resultar em melhor controle da síndrome metabólica em homens obesos quando comparado à orientação dietética isolada [KUKKONEN-HARJULA et al, 2005].

1.4.3. Cirurgia Bariátrica

A cirurgia bariátrica (CB) é o tratamento mais eficaz para obesidade mórbida em termos de perda de peso, riscos à saúde e melhoria da qualidade da vida [FRIED et al, 2007].

Esta opção de tratamento deve ser considerada em pacientes com IMC $40,0 \text{ Kg/m}^2$ ou com IMC entre $35,0$ e $39,9 \text{ Kg/m}^2$ com comorbidades [FRIED et al, 2007]. A CB pode ser cuidadosamente considerada em adolescentes gravemente obesos que falharam em perder peso apesar de orientação/tratamento especializados. Já em pacientes idosos (60 anos ou mais), o objetivo principal da cirurgia é melhorar a qualidade de vida e a relação risco-benefício deve ser considerada individualmente [FRIED et al, 2007].

Atualmente diferentes técnicas estão disponíveis, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Porém, não existem dados suficientes, baseados em evidências, para definir qual procedimento bariátrico é melhor, sendo necessário avaliar caso a caso [HAINER et al, 2008]. De maneira geral, após 10 anos, a perda de peso média é de 25% após o *bypass* gástrico, 16% após gastroplastia vertical com bandagem e 14% após banda gástrica.

1.4.4. Tratamento Medicamentoso

Os medicamentos utilizados no combate à obesidade foram desenvolvidos para atuarem como terapia auxiliar na perda de peso. Sendo assim, a farmacoterapia deve ser aplicada como parte de um gerenciamento abrangente da obesidade, que inclui modificação do estilo de vida, atividade física, adequação alimentar, entre outros [HAINER et al, 2004]. Dessa forma, o tratamento em diferentes frentes, auxilia na manutenção da perda de peso e na redução dos riscos relacionados à obesidade [HAINER et al, 2008].

Medicamentos que combatam a obesidade afetam diferentes alvos no sistema nervoso central e/ou tecidos periféricos e visam normalizar distúrbios regulatórios ou metabólicos envolvidos na patogênese da obesidade. Atualmente, poucos medicamentos são utilizados com sucesso no controle de peso em longo prazo, onde a perda de peso induzida por este tipo de tratamento é apenas modesta, atingindo cerca de 5 a 8% do peso corporal inicial [TORGERSON et al, 2004].

1.4.5. O uso de produtos naturais

O emprego de produtos de origem natural no combate à obesidade apresentou um aumento considerável nos últimos anos. A fitoterapia, como medicina alternativa, ou como terapia complementar, é um fenômeno social no mundo atual, estando a fitoterapia clássica presente há muito tempo no tratamento da obesidade [PRADO et al, 2010].

O reconhecimento de como a interação dietética com os fitoterápicos é capaz de modificar e estimular o desenvolvimento físico e mental do indivíduo aumentando seu bem-estar e diminuindo a susceptibilidade frente às doenças crônicas, tem grandes implicações sociais, especialmente frente a condições de elevada prevalência, como a doença cardiovascular, obesidade, SM e o câncer [PRADO et al, 2010].

1.4.6. O *Hibiscus sabdariffa* e suas propriedades medicinais atribuíveis.

O *Hibiscus sabdariffa*, é um arbusto da família *Malvaceae* que pode atingir de dois a três metros de altura e pertence ao gênero *Hibiscus*, que compreende cerca de 200 espécies de plantas. Tipicamente, apresenta inflorescências constituídas por cálices vermelhos com cinco sépalas carnosas de coloração igualmente avermelhada. A cápsula deiscente é o fruto que possui aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento, onde se localizam as sementes (Figura 2). Originária da Ásia ou África tropical, é amplamente cultivada nos trópicos, sendo popularmente conhecida como hibisco,

vinagreira, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, quiabo-róseo, rosélia ou rosa da Jamaica [MAHADEVAN et al, 2009].



Figura 2: Flor e detalhe do cálice carnosos do *Hibiscus sabdariffa*,

Seu cultivo se destina a diferentes propósitos. Seus galhos podem ser utilizados na indústria têxtil; na China suas sementes são empregadas na produção de óleo e a planta utilizada devido as suas propriedades medicinais; na África suas folhas e sementes são utilizadas na culinária [DA COSTA ROCHA et al, 2014]. Em sua maioria, suas flores e cálices são utilizados para consumo humano em infusões na forma de chá [DOMINGUEZ-LOPES et al, 2008].

Esta planta é rica em diferentes substâncias como vitamina C, betacaroteno, licopeno, polifenóis, antocianinas e outros antioxidantes solúveis em água. Dentre os princípios ativos mais estudados do hibisco destacam-se as antocianinas, cujo método mais eficaz para sua extração é o

uso de água quente [WONG et al., 2002; WANG et al., 2011].

As antocianinas são compostos polifenólicos que apresentam atividade antioxidante e conferem proteção contra o estresse oxidativo. Os cálices da planta são uma fonte de substâncias/moléculas bioativas com efeitos antioxidante, antilipemiante, anti-hipertensivo, antimicrobiano, anti-inflamatório, antidiabético e anticancerígeno [RIAZ et al, 2018]. Devido à sua potente atividade antioxidante e antineoplásica [LIN et al, 2007] seu extrato aquoso tem sido comumente usado na medicina popular para o tratamento da hipertensão, febre, inflamação, doenças do fígado e obesidade [FERNÁNDEZ-ARROYO et al, 2012].

São atribuídos ainda ao *Hibiscus sabdariffa* diversos efeitos medicinais, tais como diurético, sudorífico, agente antibacteriano, uricosúrico, antifúngico, laxante suave, sedativo, antitussígeno, lítico para calculose renal, redutor da viscosidade do sangue, atenuador dos efeitos secundários da embriaguez, tratamento de distúrbios gastrointestinais e hepáticos, hipercolesterolemia e no combate à obesidade [ALARCON-AGUILAR et al, 2007].

Diferentes estudos demonstram a atividade hipolipemiante do hibisco no homem [GURROLA-DÍAZ et al, 2010; MOZAFFARI-KHOSRAVI et al, 2009; LIN et al, 2007], em ratos [OCHANI & D'MELLO, 2009; FAROMBI & IGE, 2007; CARVAJAL-ZARRABAL et al, 2005; SACHDEWA & KHEMANI, 2003] e em coelhos [CHEN et al, 2003], resultando em redução dos níveis de LDL e incremento do HDL, o que confere proteção contra

doenças ateroscleróticas. Estes efeitos podem ser resultado de diversos fatores, tais como: aumento da inibição da absorção intestinal de colesterol promovido pelo hibisco; interferência na produção de lipoproteínas; aumento da expressão de receptores de LDL hepáticos e a sua proteção, conduzindo a um aumento da remoção de LDL sanguíneo; aumento da degradação e catabolismo do colesterol. Todos estes fatores, individualmente ou associados, podem promover redução dos níveis séricos de LDL e, conseqüentemente, do colesterol total [OCHANI & D'MELLO, 2009].

Diante de tudo o que foi anteriormente exposto, apesar dos potenciais efeitos sugeridos do Hibisco no combate aos distúrbios causados pela obesidade, existem poucos estudos avaliando seus eventuais benefícios em modelos experimentais de obesidade. Ademais, não foram encontrados na literatura consultada, estudos acerca dos prováveis efeitos desta planta sobre os parâmetros inflamatórios, hormonais, metabólicos e testiculares em condições de obesidade.

Sendo assim, novos estudos se fazem necessários para avaliar, de maneira científica e confiável, se as propriedades medicinais atribuídas a esta planta são verdadeiras, ou se representam apenas crendices que se consagraram pelo seu uso cotidiano baseado na sabedoria popular.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1. Hipóteses

A suplementação alimentar com dieta palatável hiperlipídica (DPH) em ratos seria capaz de induzir obesidade nestes animais, alterando seus parâmetros bioquímicos séricos, hormonais e inflamatórios; caracterizados por alterações do perfil lipídico, da função renal, dos níveis de testosterona e das concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias. Paralelamente, os efeitos da obesidade sob a fertilidade poderiam se traduzir em alterações na arquitetura testicular destes animais, as quais seriam avaliadas por meio da análise histopatológica.

A segunda hipótese relaciona-se à pesquisa dos efeitos do uso do chá de *Hibiscus sabdariffa* no combate aos eventuais efeitos adversos induzidos pela obesidade observados nestes animais. Esta proposta está baseada em estudos disponíveis na literatura que atribuem a esta planta diferentes efeitos medicinais, os quais incluiriam propriedades anti-inflamatórias, hipolipemiantes e de combate aos efeitos gerais da obesidade.

Até onde sabemos, não estão disponíveis na literatura estudos focados em avaliar os efeitos do hibisco sob tais parâmetros em condições experimentais de obesidade.

2.2. Objetivos

Objetivo geral: Avaliar os eventuais efeitos da obesidade induzida a partir da suplementação alimentar de ratos com dieta palatável hiperlipídica (DPH) sobre seus parâmetros bioquímicos séricos, hormonais, inflamatórios e testiculares, por meio de análises do perfil lipídico, função renal, níveis séricos de testosterona e das concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias, além da análise histopatológica testicular.

Objetivo específico: Pesquisar se as diferentes propriedades medicinais atribuíveis ao *Hibiscus sabdariffa* seriam capazes de evitar ou atenuar os eventuais efeitos adversos induzidos pela obesidade nestes animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da pesquisa

O material utilizado no presente estudo tem como referência o projeto de pesquisa realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da UNESP, Campus de Botucatu, submetido e aprovado junto Comitê de Ética em Pesquisa Animal da referida instituição, sob o título: “Influência do chá de *hibiscos sabidariffa* na função renal, perfil lipídico e eletrolítico. Modelo experimental de obesidade em ratos” (número de protocolo: 235/2012). O referido projeto foi coordenado da professora Dra. Alessandra Melchert, docente do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ-UNESP, responsável pela idealização e condução do estudo.

Trata-se de um projeto conjunto envolvendo o Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e os Laboratórios de Patologia e Clínico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da UNESP de Botucatu, com a participação do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP – UNIPEX.

O protocolo experimental deste estudo foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Sendo assim, o mesmo foi também previamente submetido e aprovado junto Comitê de

Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina - UNESP, sob o título: “*Avaliação dos efeitos do chá de Hibisco nos parâmetros hormonais e testiculares de ratos obesos*” (Certificado nº 1232/2017 – CEUA) (ANEXO1).

3.2. Animais de experimentação

Foram utilizados 48 ratos *Wistar* machos, adultos, com cerca de 52 dias de vida e peso variando entre 180 a 220 gramas, provenientes do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Com uma semana de antecedência ao início do experimento, os animais foram acondicionados no Biotério da UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) para adaptação ao novo ambiente e detecção de possíveis problemas clínicos. Durante o experimento os animais foram mantidos no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da Unesp, em caixas plásticas, alocados individualmente, com livre acesso a água ou chá de HS, ração ou dieta palatável hiperlipídica (DPH) – de acordo com o grupo a que pertenciam, com controle de luz (ciclos de 12 horas), temperatura de aproximadamente 22-25°C, sendo realizada a eutanásia ao final do experimento.

3.3. Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos a saber (n=12):

- Grupo CONTROLE (G1): animais alimentados com ração comercial para ratos (Presence[®], Purina) e ingestão de água;
- Grupo CONTROLE + CHÁ DE HIBISCO (G2): animais alimentados com dieta comercial para ratos (Presence[®], Purina) e ingestão de chá de hibisco;
- Grupo OBESO (G3): animais alimentados com dieta palatável hiperlipídica (DPH) e ingestão de água;
- Grupo OBESO + CHÁ DE HIBISCO (G4): animais alimentados com DPH e ingestão de chá de hibisco.

O fornecimento de ração (normal ou hiperlipídica) e água (G1 e G3) ou chá de hibisco (G2 e G4) foram administrados *ad libitum*, sendo as bebidas deixadas à disposição dos animais em bebedouro próprio para ratos durante todo o período do experimento (16 semanas).

3.4. Delineamento do estudo e sequência experimental

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais a fim de permitir adequado controle da ingestão de sólidos e líquidos. O experimento teve duração de 16 semanas e, durante este período todos os procedimentos realizados envolvendo coleta de materiais, aferição de dados, bem como administração das dietas foram realizados diariamente pelo mesmo observador.

Após o início do fornecimento das dietas e da ingestão hídrica (chá ou água) de acordo com os grupos previamente estabelecidos, os animais tiveram

suas ingestas monitoradas diariamente e seus pesos avaliados semanalmente. Ao final de 16 semanas, após sedação e anestesia, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras de sangue e tecido (testículos) para realização das dosagens das citocinas pró e anti-inflamatórias, hormonais, função renal, perfis glicêmico e lipídico, além da análise histopatológica, respectivamente (Figura 3).

A seguir, serão descritos detalhadamente os passos da pesquisa bem como os parâmetros estudados, em cada grupo.

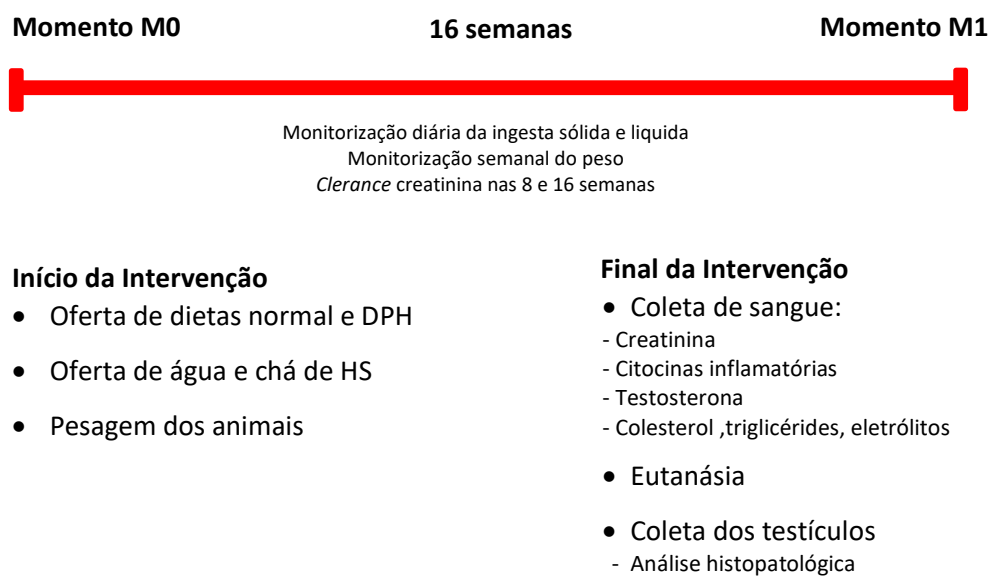


Figura 3: Diagrama demonstrando os diferentes momentos e os parâmetros avaliados de acordo com grupo de estudo.

3.5. Preparo da dieta palatável hiperlipídica (DPH).

A DPH ou dieta de cafeteria utilizada foi a padronizada por Estadella e colaboradores e consistiu em uma mistura hipercalórica, normoproteica e hiperlipídica contendo ração comercial Presence, Purina® (Figura 4-A), amendoim torrado, chocolate ao leite e bolacha maisena na proporção 3:2:2:1, administrada “*ad libitum*”. Esta dieta apresenta a seguinte composição: 20% de proteínas, 20% de lipídios, 48% de carboidratos e 4% de fibras [ESTADELLA et al, 2004]. Apenas para efeito de comparação, a composição da ração comercial utilizada (Presence®), de acordo com o fabricante, é de 4,0% de lipídios, proteína 23,0%, resíduos minerais 10,0%, carboidratos 55% e fibra 7,0%.

Para preparo da referida dieta foram moídos, separadamente, em liquidificador industrial, os ingredientes secos (ração, bolacha de maisena e amendoim). Após a moagem, o chocolate ao leite foi derretido e incorporado aos ingredientes secos, formando uma massa, a qual foi moldada em forma de pellets de ração (figura 4-B) que, após secagem, foi armazenada sob refrigeração. A DPH foi preparada semanalmente.



Figura 4A: Pellets da ração comercial Presence® (Purina).



Figura 4B: Pellet moldado da DPH após secagem

3.6. Validação e preparo do chá de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa*)

Após aquisição do chá comercial de *Hibiscus sabdariffa* (HS), uma amostra dos cálices foi recolhida. A partir da amostra hidratada realizou-se uma avaliação histopatológica para comparação com a planta *Hibiscus sabdariffa* coletada “*in loco*” e seca, de acordo com as técnicas do Departamento de Botânica da Unesp, Campus de Botucatu. Este procedimento permitiu a identificação e validação do chá comercial, provando que a amostra comercial realmente era originária da planta (Figura 5). Todos os chás adquiridos pertenciam ao mesmo lote comercial.



Figura 5: Detalhe do cálice desidratado de *Hibiscus sbdariffa* utilizado para preparação da infusão (chá).

Após a devida identificação e validação, o chá foi preparado diariamente, de acordo com a metodologia preconizada por McKay e

colaboradores (McKAY et al, 2010). Em linhas gerais, o preparo envolveu a adição de 240 mililitros de água quente a 60°C em 1,25 gramas de chá de HS (60 mg/Kg/dia). A mistura permaneceu sob infusão durante seis minutos. Após este tempo o chá foi coado e aguardado o tempo para que o mesmo resfriasse naturalmente até a temperatura ambiente. Em seguida, o chá foi oferecido aos animais como única fonte hídrica no bebedouro próprio para ratos, para os grupos G2 e G4. A cada 24 horas foi realizado novo preparo do chá, obedecendo à mesma rotina anteriormente descrita, para substituição no bebedouro dos ratos, sempre no período da manhã.

3.7. Anestesia geral

Ao final das 16 semanas do estudo, os animais foram anestesiados, com a associação de tiletamina e zolazepan (Zoletil®), na dose de 30 miligramas por quilograma de peso (mg/Kg), via intramuscular (IM) e tiopental sódico (Thiopentax®), na dose de 60 mg/Kg, via intraperitoneal (IP) (KANASHIRO & CASSU, 2008), para coleta de sangue.

3.8. Eutanásia

Ao final das 16 semanas do estudo, após anestesia geral e coleta de sangue, a eutanásia dos animais foi realizada com sobredose de anestésico, utilizando-se o triplo da dose de tiopental sódico (Thiopentax®) preconizada pela literatura [KANASHIRO & CASSU, 2008], portanto, 120 mg/Kg, por via intraperitoneal. Após verificação da ausência de parâmetros vitais, como

movimentos respiratórios e cardíacos compatíveis com a vida, foi constatado óbito do animal e procedeu-se à laparotomia para remoção dos testículos.

3.9. Parâmetros avaliados

3.9.1. Peso corporal

Os animais foram pesados no início do experimento (M0) e a seguir, semanalmente durante todo o período de experimento, utilizando-se uma balança digital de precisão da marca Filizola[®], sempre no período da manhã. O peso obtido foi expresso em gramas (g).

3.9.2. Ingestão alimentar de sólidos e líquidos

A monitorização do consumo das respectivas dietas (normal ou DPH) e da ingestão hídrica (HS ou água) foi realizada diariamente, sempre no mesmo horário. Para tal, o peso das sobras (no caso das rações) e o volume (água e chá) eram aferidos a cada 24 horas. Em seguida, os valores obtidos eram descontados do peso/volume pré-estabelecidos por ocasião do início da oferta no dia anterior. A ração ofertada (normal ou DPH) foi pesada sempre na mesma balança digital de precisão (Filizola[®]) e a água ou chá tiveram seu volume expresso em mililitros, mensurado por meio de proveta graduada.

3.9.3. Clearance de Creatinina e urina de 24 horas

Em dois momentos específicos do estudo, oitava e décima sexta

semanas de experimentação, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina durante o período de 24 horas (Figura 6).



Figura 6: Animal na gaiola metabólica para coleta da urina de 24 horas.

A depuração da creatinina (*Clearance* de creatinina - Ccr) foi calculada a partir fórmula transcrita a seguir [KEENAN et al, 2000], sendo seu resultado final expresso em mililitros/minuto/quilo de peso (mL/min/Kg). Para este cálculo foram utilizados os valores da creatinina sérica obtida no momento da eutanásia, da dosagem da creatinina urinária de cada animal em cada uma das amostras, o volume urinário de 24 horas nos diferentes momentos e o peso corporal do animal em cada momento da avaliação.

$$\text{Ccr} = \frac{\text{Cr de urina (mg / dL)} \times \text{volume de urina (mL)}}{(\text{mL/Kg/min}) \text{ Cr sérica (mg/dL)} \times [1000 / \text{peso corporal (g)}] \times 1440 (\text{min})}$$

3.9.4. Avaliação dos parâmetros inflamatórios, bioquímicos e hormonais.

Após realização da sedação e anestesia dos animais, foi realizada toracotomia e exposição do coração para punção cardíaca com agulha 30 x 0,7 acoplada à seringa de cinco mililitros (ml) para obtenção de sangue e posterior determinação dos parâmetros bioquímicos séricos (Figura 7). Cerca de 5 a 7 ml de sangue de cada animal foram mantidos em tubo de vidro seco, em repouso, por cerca de 15 minutos, após o qual ocorreu a retração do coágulo. Em seguida, o soro foi separado utilizando-se a centrífuga *IEKE*® modelo LC a 2500 rotações por minutos (rpm) por 15 minutos. O soro resultante deste processo foi identificado e congelado, sendo mantido a – 180°C em freezer (*Cônsul*® *Practice 240l*), até o momento das dosagens séricas pelo método automatizado *Cobas Mira Plus*, no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu.

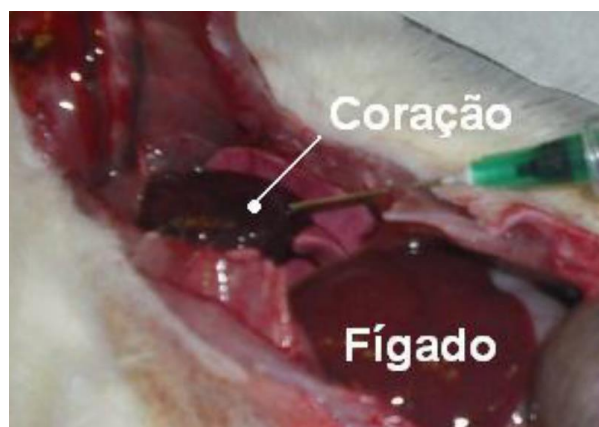


Figura 7: Ilustração da punção cardíaca para coleta de sangue.

Tal amostra se destinou à mensuração das citocinas de atividade anti e pró-inflamatórias, testosterona, ureia e creatinina séricas, cálcio, sódio, potássio, dosagem de triglicérides, colesterol total e suas frações de baixo e alto peso molecular (LDL e HDL, respectivamente). A dosagem da creatinina foi realizada utilizando-se o *kit* bioquímico da marca *KATAL*[®] pelo método do picrato alcalino (Bioclin[®], Química básica, Brasil).

As concentrações da leptina, adiponectina e interleucina 8 (IL-8) foram determinadas no soro usando kits de ensaio de imunoabsorção (ELISA) comercialmente disponíveis, especiais para ratos (Millipore, St. Charles, MO, EUA). Toda metodologia foi realizada nas dependências dos laboratórios da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Os valores foram relatados em nanogramas por decilitro de soro (ng/dL).

As dosagens das interleucinas 4 e 1 alfa foram realizadas pelo método de CBA (Cytometric Bead Array[®]) utilizando kits CBA Rat Soluble Protein – Flex Set, de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 50 microlitros (μ L) de plasma de cada animal para detecção simultânea das proteínas solúveis. Neste imunoenensaio cada uma das *beads* fluorescentes é conjugada a um anticorpo específico e a detecção de ligação entre anticorpo e proteína de interesse é feita por anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos ficoeritina (PE) (fluorescência distinta das *beads*), fornecendo sinal de fluorescência proporcional à quantidade de citocina presente na amostra, avaliados por citometria de fluxo. As aquisições foram realizadas em

citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-4 color® (BD) e analisadas no software BD FCAPArray® (Figura 8). Os resultados foram expressos em picogramas por mililitros (pg/mL).



Figura 8: Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-4 color® (BD).

3.9.5. Análise histopatológica dos testículos

Imediatamente após a constatação do óbito, ambos os testículos foram removidos por meio de incisão cirúrgica tipo laparotômica. Os testículos foram dissecados e, após limpeza e remoção dos tecidos adjacentes, os mesmos foram fixados em formaldeído 10% tamponado durante 24h. Posteriormente, foram mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão em parafina.

O material obtido foi processado no Laboratório do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Após inclusão em blocos de parafina, os testículos foram

seccionados longitudinalmente com espessura de cinco micrômetros e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas obtidas foram escaneadas utilizando-se o *scanner* Autostainer Link 48, da marca DAKO®. Uma vez digitalizadas, as imagens foram avaliadas de maneira cega por um único patologista que, utilizando microscopia óptica sob aumento de 40 vezes, contou os grupamentos de células de Leydig presentes no estroma de cada lâmina. Em seguida, foi determinado o número de células presentes em cada grupamento e número final de células foi expresso em valores médios por grupamento em cada animal (Figura 9).

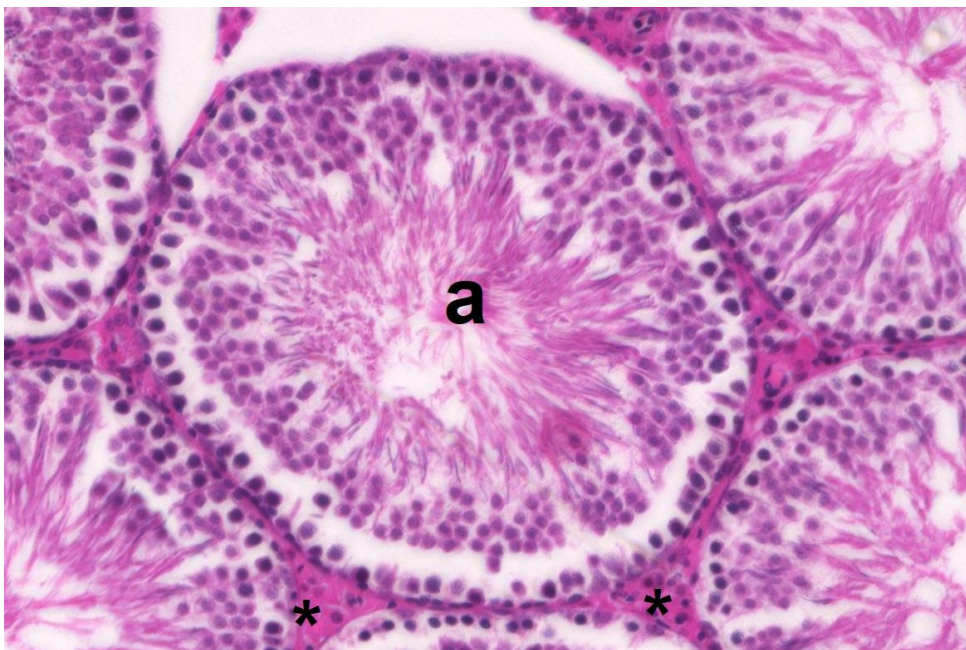


Figura 9: Corte histológico do testículo de rato (G1) demonstrando túbulo seminífero (a) e células de Leydig (*), hematoxilina-eosina, 30x.

A espermatogênese foi categorizada contando-se o número de camadas de células germinativas nos testículos (Figuras 10A e 10B) e a pontuação realizada de acordo com o *Score* de Johnsen [JOHNSEN, 1970]. O número de camadas epiteliais germinativas foi contado em 10 túbulos seminíferos como descrito por Miller e colaboradores [MILLER et al, 1990].

O *Score* de Johnsen foi aplicado pontuando-se de 1 a 10 de acordo com a presença ou ausência dos principais tipos de células dispostos na ordem de maturidade:

- 1: Ausência de células nos cortes tubulares;
- 2: Apenas células de Sertoli presentes;
- 3: Espermatogônias são as únicas células germinativas presentes;
- 4: Apenas poucos espermatócitos são encontrados (<5);
- 5: Ausência de espermatozoides/espermátides, muitos espermatócitos;
- 6: < 10 espermátides estão presentes;
- 7: Ausência de espermatozoides, muitas espermátides estão presentes;
- 8: Espermatogênese completa; < 15 espermatozoides estão presentes;
- 9: Espermatogênese completa; epitélio germinativo desorganizado;
- 10: Espermatogênese completa; epitélio germinativo bem organizado.

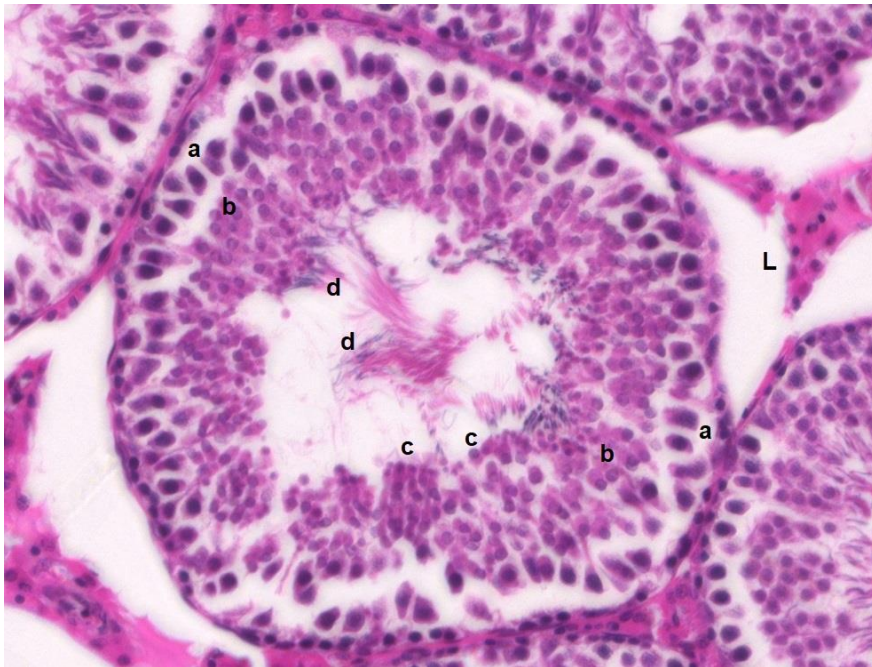


Figura 10A: Corte histológico do testículo de rato (G1) demonstrando túbulo seminífero. Visão geral da espermatogênese: (a) espermatogônias, (b) espermatócitos, (c) espermátides, (d) espermatozoides e (L) células de Leydig; hematoxilina-eosina, 30x.

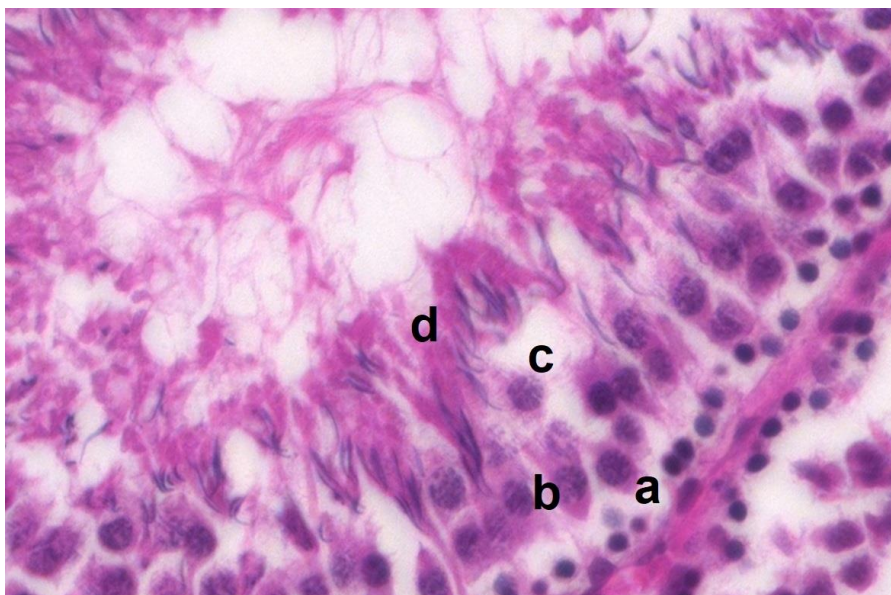


Figura 10B: Detalhe do túbulo seminífero: (a) espermatogônias, (b) espermatócitos, (c) espermátides e (d) espermatozoides; hematoxilina-eosina, 60x.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. O estudo de variáveis quantitativas como peso corporal, ureia sérica, creatinina e perfil lipídico, por exemplo, considerou o modelo de medidas repetidas em um esquema de dois fatores (dieta e hibisco) e foi complementado pela comparação múltipla de Bonferroni.

A comparação entre as medidas de peso corporal em cada grupo foi realizada utilizando-se medidas repetidas ANOVA, seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey. A análise estatística foi realizada no SigmaStat, versão 2.0 e os resultados foram considerados significativos com valores de $p < 0,05$.

O estudo estatístico das variáveis envolvendo as dosagens de interleucinas pró e anti-inflamatórias e testosterona foi realizado pela técnica da análise de variância não-paramétrica considerando o modelo de dois fatores independentes (oferta ou não do chá de hibisco/suplementação com DPH) complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn. Todas as conclusões foram discutidas no nível de 5% de significância [ZAR, 2009].

Os dados provenientes da análise histopatológica dos testículos (*Score* Johnsen e contagem das células de Leydig) apresentaram distribuição não normal e foram analisados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Para as comparações entre os grupos foi empregado o teste pareado de Wilcoxon ajustado com o método de Holm. As análises foram realizadas com o software R versão 3.4.2.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do ganho de peso dos animais

As medidas do peso corporal, realizada na primeira semana do experimento, não demonstrou diferença significativa do peso corporal entre os grupos, refletindo a homogeneidade dos mesmos e a efetividade do processo de randomização quanto a este parâmetro. De maneira geral, a análise do peso corporal revelou que todos os grupos ganharam peso progressivamente. Entretanto, a partir da décima segunda semana, esse aumento deixou de ser significativo, com exceção dos animais do G3, onde o ganho de peso foi estatisticamente significativo em todas as semanas avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão (DP) do peso corporal (em gramas) dos animais, segundo diferentes grupos de estudo, ao longo das 1^a, 4^a, 8^a, 12^a e 16^a semanas.

Semana	Grupos			
	G1 (Média e DP)	G2 (Média e DP)	G3 (Média e DP)	G4 (Média e DP)
1	200,5±13,4 ^{Aa}	211,5±18,7 ^{Aa}	215,9±22,0 ^{Aa}	212,2±22,0 ^{Aa}
4	359,0±35,0 ^{Ba}	371,2±27,1 ^{Ba}	412,7±61,8 ^{Bb}	420,5±48,7 ^{Bb}
8	422,6±43,3 ^{Ca}	410,6±38,4 ^{Ca}	496,4±83,0 ^{Cb}	494,9±67,5 ^{Cb}
12	464,8±54,1 ^{Da}	441,4±41,2 ^{Da}	562,2±93,5 ^{Db}	538,8±68,7 ^{Db}
16	493,2±52,7 ^{Da}	470,4±42,6 ^{Da}	616,2±98,9 ^{Eb*}	591,8±78,9 ^{Db**}

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); * $p < 0,01$:G3XG1; ** $p < 0,05$:G4XG1.

5.2. Monitorização das ingestas sólidas e líquidas

Avaliando-se a monitorização da ingesta de alimentos realizada diariamente, observou-se que os grupos controle e G2 apresentaram maior consumo de ração (preso bruto em gramas) do que os grupos suplementados G3 e G4 ($p < 0,05$). Em média, os animais do grupo controle consumiram diariamente $27,6 \pm 1,8$ g e $25,8 \pm 2,1$ g no G2. Entre os animais que receberam a DPH, a média diária de consumo de ração foi de $21,4 \pm 2,4$ g no G3 e $21,3 \pm 3,2$ g no G4, no mesmo período.

Com relação à avaliação da ingesta de líquidos, não houve diferenças estatísticas no volume de líquidos ingeridos (chá de HS ou água) entre os diferentes grupos.

5.3. Clearance de Creatinina (CCr) e urina de 24 horas

A taxa de depuração da creatinina obtida a partir da urina de 24 horas, avaliada no meio do período de observação do estudo (8^a semana), mostrou uma tendência de queda entre os animais do G3 quando comparado aos grupos controle e G2, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Entretanto, ao final do estudo (16^a semana), esta diferença foi mais expressiva, alcançando significância estatística ($p < 0,05$). Vale ressaltar que as análises do Ccr realizadas nos animais que receberam a DPH e que foram suplementados com chá de HS (G4) não demonstraram diferença significativa em relação ao controle em nenhum dos momentos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão (DP) da taxa de depuração da creatinina (mL/Kg/min) nos diferentes grupos de estudo, segundo momentos de avaliação (8^a e 16^a semanas).

Semana	Grupos			
	G1 (Média e DP)	G2 (Média e DP)	G3 (Média e DP)	G4 (Média e DP)
8	2,76±1,66	2,86±1,35	1,65±0,76	2,00±0,84
16	2,69±1,3	2,66±1,5	1,34±0,83*	1,89±0,89

* $p < 0,05$ XG1,G2

5.4. Avaliação dos parâmetros séricos bioquímicos e hormonais

a. Avaliação da função renal

Os valores da ureia sérica nos animais suplementados com DPH (G3 e G4) foram estatisticamente inferiores aos observados nos grupos controle e G2. Curiosamente, os animais que receberam dieta normal e chá de hibisco (G2) foram os que apresentaram maiores níveis de ureia em relação aos demais.

Entretanto, apesar do comportamento observado em relação à ureia, a creatinina sérica não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados (Tabela 3).

b. Avaliação dos eletrólitos séricos

Considerando-se os eletrólitos séricos, as sutis variações observadas nas dosagens de cálcio e potássio não apresentaram significância estatística entre grupos estudados.

Entretanto, os níveis séricos de sódio nos animais que receberam o chá de HS (G2 e G4) apresentaram uma elevação estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, comparando-se os animais suplementados com DPH foi possível observar que o grupo tratado com chá de hibisco (G4) apresentou maiores níveis de sódio sérico em relação ao G3 ($p < 0,05$).

Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos séricos avaliados nos diferentes grupos estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3: Valores médios e desvio padrão (DP) dos níveis de ureia/creatinina (mg/dL) e demais eletrólitos séricos (mEq/L), nos diferentes grupos de estudo, ao final do experimento (16^a semana).

Parâmetro sérico	Grupos			
	G1 (Média e DP)	G2 (Média e DP)	G3 (Média e DP)	G4 (Média e DP)
Ureia	44,00±6,03*	57,45±8,98**	31,55±6,33	33,81±3,75
Creatinina	0,40±0,08	0,40±0,11	0,42±0,11	0,42±0,07
Cálcio	8,35±0,71	8,38±0,73	8,42±0,37	8,32±0,33
Sódio	138,23±2,55 [#]	139,77±3,90	137,92±2,25 ^{##}	142,15±1,91
Potássio	5,22±1,82	4,35±0,63	4,65±0,95	4,45±0,40

* $p < 0,05$:G1XG3,G4; ** $p < 0,05$:G2XG1,G3,G4; # $p < 0,05$:G1XG2,G4; ## $p < 0,05$:G3XG4

c. Avaliação do perfil lipídico

A análise do perfil lipídico realizada ao final do experimento não revelou diferença estatisticamente significante nos níveis de colesterol total

entre os animais suplementados com DPH.

Por outro lado, quando consideramos especificamente a fração LDL do colesterol, foi possível identificar que os animais que receberam o chá de hibisco (G2 e G4) apresentaram uma redução deste parâmetro em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Analisando-se exclusivamente os grupos suplementados com DPH, observa-se uma redução significativa do LDL nos animais que receberam o HS em relação ao G3 ($G4 < G3$; $p < 0,05$).

Com relação à análise da fração HDL do colesterol, constatou-se que os animais suplementados com DPH (G3) apresentaram redução significativa do HDL quando comparados ao grupo controle ou mesmo ao G2. Entretanto, vale ressaltar que os animais suplementados com DPH e tratados com chá de HS (G4) mantiveram as dosagens de HDL em níveis semelhantes aos do grupo controle.

Finalmente, os animais que receberam o chá de HS associado à dieta normal (G2) apresentaram significativa redução dos níveis de triglicerídeos séricos, com valores que chegaram próximos a metade daqueles encontrados no grupo controle. Este mesmo comportamento não foi identificado entre os animais que receberam o chá de hibisco associado à DPH (G4).

Os dados referentes ao perfil lipídico dos animais nos diferentes grupos de estudo estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4: Valores médios e desvio padrão (DP) do perfil lipídico sérico (mg/dL) nos animais, segundo diferentes grupos de estudo, ao final do experimento (16^a semana).

Parâmetro sérico	Grupos			
	G1 (Média e DP)	G2 (Média e DP)	G3 (Média e DP)	G4 (Média e DP)
Colesterol	52,08±28,89	44,69±7,32	42,00±7,82	44,77±8,44
HDL	45,92±1,44	46,31±1,03	44,54±0,78**	45,46±0,88
LDL	7,54±5,14	5,00±1,23 [#]	7,31±2,29	5,62±1,19 ^{##}
Triglicérides	83,23±34,11	46,31±15,35*	86,77±36,55	84,08±32,44

*p<0,05: G2XG1,G3,G4 **p<0,05:G3XG1,G2 [#]p<0,05 G2XG1,G3 ^{##}p<0,05 G4XG3

d. Dosagem da Testosterona

Apesar dos valores da mediana da testosterona sérica terem sido maiores entre os animais que receberam a suplementação com DPH associada ao chá de HS (G4), a análise do perfil hormonal global não revelou diferença estatisticamente significativa nos diferentes grupos de estudo. Os dados estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5: Mediana de valores mínimo e máximo de Testosterona sérica (ng/dL) nos animais, segundo grupo de estudo.

	Grupos				Valor <i>p</i>
	G1	G2	G3	G4	
Testosterona	1,27 (0,40; 4,73)	1,78 (0,71; 21,12)	1,62 (0,54; 8,36)	2,94 (0,74; 5,82)	> 0,05

5.5. Avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias

Para facilitar a análise dos resultados, os comentários acerca das dosagens das citocinas pró e anti-inflamatórias foram realizados considerando-se as duas categorias principais: os animais que foram suplementados ou não com a DPH e aqueles que receberam ou não o chá de HS.

a. Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas pró inflamatórias avaliadas de acordo com a metodologia descrita foram a Leptina, a interleucina 1 α (IL-1 α) e a interleucina 8 (IL-8). Sendo assim, com relação à leptina (LP), observou-se que os animais que receberam a dieta normal concomitante do chá de HS (G2) não apresentaram variação desta citocina em relação ao grupo controle. Entretanto, considerando-se os grupos suplementados com DPH observou-se significativa elevação dos níveis da LP (G3 e G4), sem diferença estatisticamente significativa entre eles, independentemente do uso concomitante do chá de HS (Tabela 6).

Com relação à análise dos níveis séricos da IL-1 α foi observada uma redução significativa deste marcador de atividade inflamatória entre os animais que receberam o chá de HS (G2 e G4) em relação ao grupo controle. Entretanto, esta redução foi mais expressiva entre os animais suplementados e tratados com chá de HS (G4), cujos níveis séricos de IL-1 α foram significativamente reduzidos, não apenas em relação ao controle, mas a todos

os demais grupos de estudo (Tabela 6).

As dosagens séricas de IL-8 não apresentaram variações estatisticamente significativas entre os diferentes grupos, independentemente do tipo de dieta empregada ou da administração concomitante do chá de HS (Tabela 6).

Tabela 6: Mediana de valores mínimo e máximo das citocinas pró-inflamatórias (pg/mL) dosadas no plasma sanguíneo de ratos, segundo grupo de estudo.

Citocina	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Leptina	3157,54* (1731,8;8621,4)	2750,79# (704,4;5006,7)	8552,62 (2622,5;33347,1)	7537,30 (3434,2;16091,6)
IL-1 α	17,90 (1,03; 52,44)	6,74& (0,50; 220,80)	16,98 (4,76; 47,66)	0,91¥ (1,45; 56,57)
IL-8	30,62 (3,43; 107,07)	17,08 (0,73; 55,92)	25,70 (0,46; 96,25)	20,79 (0,38; 108,58)

*p<0,01:G1XG3,G4 #p<0,01:G2XG3,G4 &p<0,05:G2XG1,G3,G4 ¥p<0,05:G4XG1,G2,G3

b. Citocinas anti-inflamatórias

Considerando-se a análise das dosagens séricas da adiponectina e da interleucina 4 (IL-4), não foi possível detectar variações estatisticamente significativas nos diferentes grupos de estudo. Ambos os marcadores mostraram comportamento estável em todos os animais avaliados em relação ao grupo controle, independentemente do tipo de ração consumido ou da associação com o chá de HS. Os dados referentes às dosagens das citocina

anti-inflamatórias estão sumarizados na tabela 7.

Tabela 7: Mediana de valores mínimo e máximo das citocinas anti-inflamatórias dosadas no plasma sanguíneo de ratos, segundo grupo de estudo.

Citocina	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Adiponectina* (ng/mL)	4278,41 (3057,7;7048,7)	3758,30 (2726,2;7158,4)	5198,72 (3666,2;7695,6)	4431,357 (3480,9;6748,4)
IL-4* (pg/mL)	3,10 (1,47;33,28)	4,28 (0,32;189,61)	5,09 (2,35;29,34)	6,1220,79 (1,27;53,17)

*p>0,05

5.6. Análise histopatológica dos testículos

A análise das imagens obtidas a partir do escaneamento das lâminas não encontrou diferença estatisticamente significativa com relação à contagem das células de Leydig presentes no estroma testicular nos diferentes grupos estudados (Tabela 8).

A avaliação da espermatogênese nos túbulos seminíferos, categorizada a partir da pontuação de acordo com o *score* de Johnsen, demonstrou uma redução na pontuação final do escore nos animais suplementados com a DPH (G3), não apenas em relação ao grupo controle, mas também quando comprado aos demais grupos. Entretanto, o grupo suplementado que recebeu o chá de HS (G4) apresentou um escore final semelhante ao grupo controle. Da mesma forma, os animais que receberam o chá de HS associado à dieta

normal (G2) não apresentaram variação estaticamente significativa na avaliação da espermatogênese segundo o escore de Johnsen (Tabela 8).

Tabela 8: Média e desvio padrão do Escore de Johnsen e da contagem das células de Leydig por grpamento (valores absolutos) no estroma testicular de ratos, segundo grupo de estudo.

	GRUPOS				Valor de p
	G1	G2	G3	G4	
Score de Johnsen	9,49 (0,029)	9,45 (0,052)	9,29* (0,112)	9,44 (0,051)	<0,01
Células de Leydig	5,250 (0,754)	5,000 (0,707)	5,385 (1,193)	5,308 (0,480)	0,614

*G3≠G1,G2,G4.

6. DISCUSSÃO

Com intuito de auxiliar no melhor entendimento da fisiopatologia da obesidade, o uso de diferentes modelos experimentais busca induzir a obesidade, de forma semelhante à humana. Dentre os modelos disponíveis, o mais comumente utilizado é o induzido por dieta, particularmente em ratos [SOARES et al, 2012]. Como os lipídeos representam maior fonte energética em relação aos carboidratos e proteínas (9 Kcal/g *versus* 4 Kcal/g, respectivamente), as dietas hiperlipídicas são as mais utilizadas na tentativa de mimetizar a obesidade em modelos animais [BUETTNER et al, 2007].

Seguindo este raciocínio, nosso modelo utilizou a dieta palatável hiperlipídica (DPH) padronizada por Estadella e colaboradores, composta por mistura hipercalórica, normoproteica e hiperlipídica contendo 20% de proteínas, 20% de lipídios, 48% de carboidratos e 4% de fibras [ESTADELLA et al, 2004]. Apenas para efeito de comparação, a dieta comercial utilizada no grupo controle e G2 apresenta em sua composição apenas 4,0% de lipídios (proteína 23%, resíduos minerais 10%, carboidratos 55% e fibra 7%). Embora existam outros modelos de dieta hiperlipídica propostos na literatura, alcançando proporções de até 60% de lipídios [WAGNER et al, 2016], consideramos que estes modelos não seriam adequados por extrapolarem a composição da dieta usualmente consumida pela maioria da população.

Avaliando a ingesta dos animais estudados, observamos que os grupos suplementados G3 e G4 ($21,4 \pm 2,4$ g e $21,3 \pm 3,2$ g, respectivamente)

apresentaram menor consumo de ração em relação ao controle e G2 ($27,6 \pm 1,8g$ e $25,8 \pm 2,1g$, respectivamente, com $p < 0,05$). Tal achado se justifica uma vez que a densidade energética da dieta hiperlipídica é maior que a dieta padrão onde, apesar do consumo ter sido menor nos animais suplementados, observou-se um maior ganho de peso. Este mesmo padrão na relação entre consumo/ganho de peso foi relatado por Kretschmer e colaboradores em seu estudo com animais submetidos à suplementação com dieta rica em gordura [KRETSCHMER et al, 2005].

O ganho de peso foi progressivo em todos os grupos e consideravelmente maior nos animais suplementados com dieta rica em gordura. Entretanto, após a 12^o semana, observamos uma estabilização no peso dos animais. Este comportamento nos parece lógico onde, apesar da livre oferta de alimentos, uma vez atingido o equilíbrio entre ingesta e gasto de energia, existe uma tendência de estabilização da massa corpórea, pois se tratavam de animais adultos e fisiologicamente normais. Contrariando este raciocínio, os animais do G3 não seguiram este padrão e continuaram a ganhar peso até o final do experimento (16 semanas). Merece destaque o fato de que os animais suplementados com DPH associado ao *Hibiscus sabdariffa* (HS) (G4) não apresentaram ganho de peso nas quatro últimas semanas do experimento, apesar de terem consumido a mesma quantidade de ração que o G3 e, portanto, o mesmo aporte calórico. Este comportamento demonstra uma clara redução no ritmo de ganho associada à estabilização do peso destes animais, apesar da suplementação, reforçando assim o suposto papel auxiliar

do HS no controle da obesidade, à semelhança do que foi sugerido por Alarcon-Aguilar e colaboradores [ALARCON-AGUILAR et al, 2007].

Com relação à ingestão de líquidos, a ausência de diferença estatística na ingestão de chá ou água nos diferentes grupos, mostra que o HS teve boa aceitação entre os animais e que seu consumo foi estável ao longo do estudo, respeitando o volume de líquidos habitualmente ingerido por esta espécie animal.

Dentre suas inúmeras propriedades medicinais atribuíveis, HS é conhecido por sua capacidade de atenuar a progressão da lesão renal na nefropatia diabética em ratos [LEE et al, 2009]. Da mesma forma, conforme demonstrado por Anwar e colaboradores, a administração de HS na dose de 250 mg/Kg/peso foi capaz de prevenir a nefrotoxicidade induzida pela administração intraperitoneal de gentamicina em coelhos, onde os níveis de ureia e creatinina nos animais tratados se mantiveram próximos aos do grupo controle [ANWAR et al, 2014]. À semelhança desses achados, em nosso estudo, foi possível observar um efeito protetor do HS nos animais com obesidade induzida e tratados com o chá, os quais mantiveram suas taxas de depuração da creatinina (Ccr) iguais ao do grupo controle. Embora estatisticamente significativa ($1,34 \pm 0,83$ versus $2,69 \pm 1,3$ ml/Kg/min, $p < 0,05$), a diminuição da Ccr nos animais obesos suplementados não implicou em alteração dos níveis séricos de creatinina final nestes animais. Entretanto, é preciso considerar que a creatinina não é um bom marcador da função renal, uma vez que seus níveis só irão se alterar, para além dos valores de

normalidade, a partir de uma diminuição da ordem de 50 a 60% da taxa de filtração glomerular [PINTO et al, 2004]. Assim sendo, é possível supor que o seguimento destes animais em longo prazo, além das 16 semanas propostas neste protocolo de estudo, eventualmente viesse a demonstrar um agravamento da deterioração da função renal destes animais, a exemplo do observado em condições crônicas de obesidade em humanos [REIL et al, 2009; FOSTER et al, 2010; KRAMER et al, 2005].

O mecanismo exato de ação do HS sobre a função renal ainda não está completamente esclarecido. Algumas teorias sugerem que o extrato desta planta poderia diminuir o nível de peroxidação lipídica, o qual se encontra elevado em resposta a algumas situações de agressão crônica, como a obesidade por exemplo. Outras sugerem que ocorra uma interação entre as toxinas circulantes e os fitoquímicos presentes na planta, como os potentes agentes antioxidantes (incluindo vitamina C e tocoferol), além dos flavonoides, conhecidos como antocianinas, eficientes no combate a formação de radicais livres [SINI et al, 2011]. O HS seria capaz ainda de atuar sobre a fisiologia renal, exercendo um papel modulador na conversão do radical α -tocoferoxi em α -tocoferol ou na redução da permeabilização dependente de Ca^{+2} das mitocôndrias do córtex renal [OKOKO et al, 2008]. Embora os animais do G2 tenham apresentado uma elevação significativa dos níveis de ureia em relação ao controle, os valores médios estão próximos ao intervalo de normalidade para ratos *Wistar* (30-57mg/dL), segundo Melo e colaboradores [MELO et al, 2012].

Alguns estudos se propuseram a avaliar o comportamento dos eletrólitos séricos em modelos utilizando cronicamente o consumo de HS. Odigie e colaboradores, estudando um modelo de hipertensão induzido em ratos por clampeamento renal unilateral, observou melhora dos níveis pressóricos dos animais tratados com HS ao longo de 14 semanas. Entretanto, o padrão dos principais eletrólitos séricos permaneceu estável, apesar de uma tendência no aumento do potássio, que não se mostrou estatisticamente significativa [ODIGIE et al, 2003]. Em nosso estudo, a monitorização dos eletrólitos séricos não revelou variações significativas nos diferentes grupos, exceto nas análises do sódio. Os níveis séricos de sódio nos animais que receberam o HS (G2 e G4) apresentaram uma elevação estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle ($139,77 \pm 3,90$ e $142,15 \pm 1,91$ *versus* $138,23 \pm 2,55$ mmol/L, respectivamente; $p < 0,05$). Embora oscilando dentro do intervalo de normalidade para a espécie (132-146 mEq/L) [MELO et al, 2012], este efeito não era esperado, uma vez que o HS é conhecido por suas propriedades anti-hipertensivas [ODIGIE et al, 2003]. Infelizmente, não encontramos fatores que pudessem justificar os resultados observados.

Estudos sugerem que as dietas com alto teor de gordura são capazes ainda de promover outras alterações no perfil lipídico em modelos animais submetidos à suplementação alimentar. Conforme demonstrado por Estadella e colaboradores, a dieta hiperlipídica é capaz de induzir um pronunciado ganho de peso e adiposidade nos animais a partir de oito semanas de suplementação, sendo estes achados acompanhados pelo aumento de

triglicéridos (TG) séricos [ESTADELLA et al, 2004]. Embora em nosso estudo os animais suplementados (G3) tenham apresentado efetivo ganho de peso, os mesmos não apresentaram elevação dos níveis de TG como esperado. Entretanto, os animais que receberam o HS associado à dieta normal (G2) apresentaram uma redução significativa do TG, atingindo níveis próximos à metade daqueles encontrados no grupo controle. Tais resultados sugerem que além de auxiliar no controle das dislipidemias em pacientes obesos, o uso do chá de hibisco pode beneficiar também pacientes com quadros dislipidêmicos não associados a obesidade.

De acordo com Pereira e colaboradores, a utilização de dieta hiperlipídica em camundongos pelo período de 12 semanas, foi capaz de provocar uma elevação significativa do colesterol total e diminuição de sua fração HDL em relação ao controle embora, neste caso, a concentração de lipídios empregada na dieta utilizada tenha sido de 60,3% [PEREIRA et al, 2018]. Via de regra, o aumento da adiposidade visceral está associado à diminuição da fração HDL do colesterol, hipertrigliceridemia e níveis de LDL normais ou marginalmente alterados [BARROSO et al, 2002]. Embora em nosso estudo os animais suplementados com a DPH não tenham apresentado variações nos níveis de colesterol total, a redução da fração HDL foi evidente no G3 quando comparado ao grupo controle. Entretanto, vale a pena ressaltar que os animais suplementados tratados com o HS apresentaram níveis de HDL séricos normais, sugerindo um claro efeito protetor contra a diminuição da chamada “fração boa” do colesterol. Outro importante efeito observado

entre os animais que fizeram uso do HS (G2 e G4) foi a redução da fração “ruim” do colesterol (LDL) em relação ao controle. Tais achados foram semelhantes aos encontrados por Chen e colaboradores que observaram uma redução de concentrações de LDL e TG ao tratar coelhos alimentados com dieta hipercolesterolêmica com extrato aquoso de HS a 1% por 10 semanas [CHEN et al, 2003].

Sistemicamente, na obesidade, ocorre hipertrofia dos adipócitos. Esse processo, uma vez instalado e se perpetuando cronicamente, irá resultar no aumento da infiltração de macrófagos e na produção das citocinas pró-inflamatórias [SCARPELLINI et al, 2012]. Paralelamente, ocorre elevação da liberação de ácidos graxos livres e desregulação na secreção de adiponectina, resistina e leptina, onde a secreção desregulada destas adipocinas, poderá resultar no aumento da ingesta alimentar e redução do gasto energético, contribuindo ainda mais para o ganho de peso [GALIC et al, 2010]. Estas adipocinas são responsáveis por exacerbar o processo inflamatório no organismo estando envolvidas em uma série de comorbidades, inclusive, no desenvolvimento da resistência à insulina [GUTIERREZ et al, 2009]. Em nosso estudo, observamos que os animais suplementados com a DPH (G3 e G4) apresentaram uma importante elevação da leptina quando comparados ao controle, demonstrando que a dieta rica em gordura foi capaz de interferir na fisiologia do tecido adiposo, alterando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Embora não tenha sido capaz de diminuir os níveis de leptina nesses animais, a administração do HS resultou uma evidente redução dos

níveis séricos da IL-1 α , particularmente nos animais suplementados (G4). Considerando-se que esta interleucina se constitui uma importante citocina de atividade pró-inflamatória (estando relacionada com a indução de febre, síntese de proteínas da fase aguda hepática, liberação de neutrófilos, além de atuar com mediadora na resistência à insulina), a partir dos efeitos observados, é possível inferir que o HS possa auxiliar no combate aos efeitos da inflamação, reduzindo os níveis circulantes de citocinas inflamatórias não apenas em pacientes obesos, mas também em pacientes eutróficos portadores estados inflamatórios crônicos.

Embora existam poucos estudos avaliando o potencial anti-inflamatório do HS sob o ponto de vista da dosagens das citocinas sistêmicas, nossos dados estão de acordo com aqueles observados por Sogo e colaboradores que, utilizando modelos celulares em animais, conseguiram demonstrar *in vivo* e *in vitro* que o Dp3-Sam (Delphinidin 3-sambubioside - uma antocianidina presente no cálice do *H. sadariffa*), foi capaz de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios tais como a IL-6, TNF α e MCP-1 (ligantes da proteína de quimioatração de monócitos), entre outros [SOGO et al, 2015]. De acordo com nossos dados, é possível supor ainda que, nas condições apresentadas, uma eventual modulação do HS sobre o processo inflamatório destes animais se daria, de maneira mais significativa, a partir da redução dos níveis das citocinas inflamatórias do que pelo estímulo daquelas com atividade anti-inflamatória, uma vez que, conforme demonstrado, estas últimas não apresentaram alterações significativas entre os diferentes grupos

avaliados.

Tem sido demonstrado que a obesidade é capaz de interferir no eixo reprodutivo de animais e humanos desregulando as funções reprodutivas [GROMADZKA-OSTROWSKA et al, 2002; GLASS et al, 1981]. Olivares e colaboradores, utilizando uma dieta enriquecida em gordura saturada demonstraram que, após 6 meses de exposição, os níveis séricos de testosterona (T) e LH total de ratos machos foram mais baixos do que nos animais controle, revelando a presença de hipogonadismo hipogonadotrófico nos animais obesos [OLIVARES et al, 2010]. Em nosso estudo porém, a análise sérica da T não revelou diferença estatisticamente significativa nos diferentes grupos. Tomando como referência o estudo de Olivares, talvez o tempo de exposição à dieta hiperlipídica por nós utilizado tenha sido insuficiente para induzir alterações marcantes com relação à testosterona.

Entretanto, vários mecanismos podem estar envolvidos na maneira como a obesidade afeta a fertilidade. Assim sendo, múltiplos fatores podem atuar influenciando negativamente a esteroidogênese e a espermatogênese testicular [DAVIDSON et al, 2015], como por exemplo, o aumento da expressão da aromatase (CYP19) no tecido adiposo (atua na conversão da testosterona sérica em estradiol), responsável pela interferência nos processos dependentes de androgênio em indivíduos obesos [HAJSHAFIHA et al., 2013]. Além disso, a inflamação crônica associada à obesidade pode, indiretamente, contribuir para o desenvolvimento do hipogonadismo através de uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos,

inibindo diretamente a capacidade das células de Leydig em produzir testosterona [HONG et al., 2004]. Em nosso estudo, não avaliamos a integridade do eixo hipofisário-testicular, porém, a contagem global das células de Leydig preservada no estroma testicular, associada à manutenção dos níveis séricos de testosterona, nos permite inferir que, aparentemente, o status hormonal desses animais não foi afetado. Embora Wagner e colaboradores tenham observado uma diminuição dos níveis de testosterona intratesticular, associada à redução do número global de células de Leydig em ratos suplementados com dieta rica em gordura, em seu modelo, os autores empregaram uma dieta com uma alta concentração de lipídios (60%). Ainda assim, as alterações descritas só foram observadas no grupo suplementado por longo período (9 meses), não sendo constatadas variações significativas com três meses de seguimento [WAGNER et al, 2016].

O efeito da obesidade masculina nos parâmetros espermáticos já foi bem documentado em modelos humanos e animais. Estudos pregressos mostraram que alterações como diminuição da concentração, motilidade e aumento da morfologia anormal dos espermatozoides estão diretamente relacionadas à obesidade [SHUKLA et al. 2014, GUO et al. 2017]. Da mesma forma, diminuição da contagem e aumento da deformidade espermática também foram observados em modelos animais com obesidade induzida por dieta, resultando em subfertilidade masculina [BAKOS et al. 2011, FERNANDEZ et al. 2011, FAN et al. 2015]. Embora não tenhamos avaliado os parâmetros seminais em nosso modelo, a análise histopatológica dos

túbulos seminíferos mostrou um claro comprometimento da espermatogênese nos ratos obesos (G3), traduzido por uma redução global no escore de Johnsen nesses animais. Entretanto, nos animais suplementados com dieta hiperlipídica que receberam o chá de hibisco (G4), a pontuação obtida foi igual ao grupo controle, sugerindo que o HS foi capaz de atenuar os efeitos deletérios da obesidade sobre a espermatogênese destes animais. Nossos dados estão em consonância com os achados de Amin e colaboradores, os quais relataram um efeito protetor do HS contra a toxicidade reprodutiva induzida pela cisplatina em ratos [AMIN & HAMZA, 2006; AMIN et al, 2008]. Infelizmente, uma comparação mais aprofundada dos resultados histológicos por nós obtidos com estudos prévios é difícil de ser realizada, uma vez que são praticamente inexistentes dados disponíveis na literatura que avaliam os efeitos do HS na arquitetura testicular sob o ponto de vista abordado em nosso estudo. De fato, em seu artigo de revisão, Guardiola e colaboradores, avaliando as evidências científicas do potencial terapêutico desta planta em diversos modelos de estudo, não encontraram nenhum trabalho enfocando este aspecto entre os cerca de 104 artigos avaliados [GUARDIOLA et al, 2014].

Finalmente, embora a maioria dos estudos disponíveis sugiram uma série de efeitos benéficos relacionados ao uso do HS nas mais diferentes aplicações terapêuticas, alguns autores tem manifestado preocupação com seu uso irrestrito. De acordo com alguns estudos, o extrato de *H. sabdariffa* pode exibir um baixo grau de toxicidade aguda, com uma dose letal média (DL50),

variando de 2.000 a mais de 5.000 mg/kg/dia [HOPKINS et al, 2013]. Neste sentido, efeitos adversos relacionados à toxicidade hepática foram descritos por Akindahunsi diante da ingestão crônica de doses superiores a 3.000 mg/kg [AKINDAHUNSI et al, 2003]. Da mesma forma, Fakeye e colaboradores demonstraram que o consumo prolongado de altas doses de extrato de HS pode levar a reações hepatotóxicas, que podem até serem confundidas com hepatite crônica. Conforme demonstrado por estes autores, doses de 2.000 mg/kg/dia administradas por um período de 90 dias causaram severa perda de peso e diarreia em ratos albinos [FAKEYE et al, 2009]. Entretanto, vale a pena ressaltar que os efeitos colaterais obtidos nesses estudos estiveram diretamente relacionados ao consumo de doses extremamente elevadas do extrato de HS. Ao contrário destes modelos, a grande maioria dos estudos aqui apresentados utilizou o extrato de HS obtido a partir da extração alcoólica ou infusões aquosas, diretamente do cálice da planta. O consumo diário de cerca 50-100 mg/kg, via de regra, parece exercer propriedades farmacológicas capazes de induzir uma série de efeitos benéficos ao organismo, inclusive estimulando a resposta imune, sem efeitos colaterais significativos [FAKEYE et al, 2008].

7. CONCLUSÃO

O modelo de experimental de indução de obesidade em ratos, proposto por Estadella e colaboradores, mostrou-se reprodutível e eficaz, uma vez que os animais suplementados com dieta palatável hiperlipídica (DPH) a 20% apresentaram ganho significativo de peso em relação ao grupo controle.

Com relação às alterações induzidas pela dieta, foi possível demonstrar que a suplementação por 16 semanas com a dieta rica em gordura resultou em alterações na fisiologia renal (traduzidas por uma diminuição da taxa de depuração da creatinina) e no perfil lipídico, provocando uma redução significativa da fração HDL do colesterol nestes animais. Da mesma forma, observamos que os grupos suplementados com a DPH apresentaram elevação significativa da leptina, sugerindo um estado de inflamação crônica nesses animais. Conforme era esperado, os animais obesos apresentaram ainda alterações na histopatologia testicular, traduzidas por uma redução significativa do escore de Johnsen.

Paralelamente, nosso estudo permitiu demonstrar ainda que a utilização do chá de *Hibisco sabdariffa* (HS) foi capaz de exercer um claro efeito modulador sobre as alterações observadas, minimizando os efeitos produzidos pela suplementação com dieta rica em gordura nestes animais. Dentre os efeitos observados, o HS se mostrou eficaz no auxílio do controle da obesidade, evitando o ganho de peso nos animais suplementados que receberam o chá, concomitantemente. Da mesma forma, nesses animais, foi possível constatar um efeito modulador do HS sobre a fisiologia renal,

traduzido por uma manutenção da taxa de depuração de creatinina; bem como no auxílio da estabilização do perfil lipídico, evidenciado pela manutenção dos níveis de HDL e redução das taxas de LDL séricos.

Com relação às propriedades anti-inflamatórias atribuídas ao HS, as dosagens das citocinas inflamatórias permitiram demonstrar que, embora o não tenha sido capaz de reduzir os níveis elevados de leptina nos animais suplementados, o chá de HS foi capaz de reduzir efetivamente os níveis de IL-1 α , mesmo nos animais com dieta regular.

Finalmente, considerando-se os possíveis efeitos do HS sobre a fertilidade, nosso estudo permitiu demonstrar que, a partir da manutenção do escore de Johnsen, o hibisco foi capaz de evitar os efeitos deletérios observados sobre a diferenciação celular nos túbulos seminíferos dos animais expostos a uma dieta rica em gordura.

Os atuais resultados disponíveis na literatura não nos permitem afirmar ainda com exatidão qual seria a dose ideal do *H. sabdariffa* associada à uma eficácia terapêutica máxima. A falta de homogeneidade no delineamento experimental, bem como o baixo número de indivíduos - associado à inerente heterogeneidade interindividual, são, em parte, responsáveis pela falta de consistência dos resultados obtidos em estudos envolvendo seres humanos. Ainda assim, os resultados atualmente disponíveis sugerem interessantes propriedades terapêuticas relacionadas à esta planta, as quais merecem ser melhor estudadas, afim de que o HS possa ser efetivamente utilizado como

uma terapia alternativa ou mesmo complementar no combate às mais diferentes enfermidades.

Até o momento, um número limitado de extratos de HS foi estudado e, como os efeitos de diferentes componentes não são equivalentes, os resultados não podem ser generalizados [GUARDIOLA et al, 2014]. Sendo assim, futuros estudos envolvendo uma maior casuística, utilizando doses controladas e componentes ativos com biodisponibilidade conhecidas são cruciais para fornecer as evidências científicas necessárias para determinar a eficácia da estratégia terapêutica do *H. sabdariffa*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>. Acessado em novembro de 2019.

Ahren B, Havel PJ. Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol*. 1999; 277: 959-66.

Akindahunsi AA, Olaleye MT. Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *J Ethnopharmacol*. 2003; 89(1):161-4.

Alarcon-Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, Almanza-Perez JC, Romero-Núñez E, Campos-Sepulveda EA, et al. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J Ethnopharmacol*. 2007; 114(1): 66-71.

Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabete Med*. 1998; 15: 539-53.

Allan CA, McLachlan RI. Androgen and Obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 224-32.

Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl*. 2008;10: 291-97.

Amin AA, Hamza AA. Effects of Roselle and Ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian J Androl*. 2006; 8:607-612.

Anwar ID, Noman AR. Evaluation of the Potential Nephroprotective and Antimicrobial Effect of *Camellia sinensis* Leaves versus *Hibiscus sabdariffa* (In Vivo and In Vitro Studies). *Adv Pharmacol Sci*. 2014; 2014:389834.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest*. 1989; 84: 1045–1049.

Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *J Andrology*. 2011; 34:402–10.

Barbosa PJB, Lessa I, Almeida-Filho N, Magalhães LBNC, Araújo J. Critério de obesidade central em população brasileira: impacto sobre a síndrome

metabólica. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 87: 407-14.

Barroso SG, de Abreu VG, Francischetti EA. A Participação do tecido adiposo visceral na gênese da hipertensão e doença cardiovascular aterogênica. *Arq Bras Cardiol.* 2002;78(6):618-30.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med.* 1984; 160(2): 618–23.

Blüher M, Fasshauer M, Tönjes A, Kratzsch J, Schön MR, Paschke R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005; 113: 534–37.

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol.* 2005; 174: 5789–5795.

Brakenhielm, Ebba, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004; 101(8): 2476-2481.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007;15(4):798–808.

Carvajal-Zarrabal O, Waliszewski SM, Barradas-Dermitz DM, Orta-Flores Z, Hayward-Jones PM, Nolasco-Hipólito C, et al. The consumption of Hibiscus sabdariffa dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2005; 60(4): 153-59.

Chang, Hong-Chou, et al. Hibiscus sabdariffa extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food & function.* 2014; 5(4): 734-739.

Chen CC, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, et al: Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(18): 5472-77.

Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, et al. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med.* 1996; 2(5): 585-89.

Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*. 2014; 16(5): 424-443.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 2005; 111: 1448-54.

Davidson LM, Millar K, Jones C, Fatum M, Coward K. Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Hum. Fertil*. 2015; 18:184-93.

Dhindsa S, Miller MG, McWhirter CL, Mager DE, Ghanim H, et al. Testosterone concentrations in diabetic and nondiabetic obese men. *Diabetes Care*. 2010; 33: 1186-92.

Di Renzo L, Bigioni M, Del Gobbo V, Premrov MG, Barbini U, et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist gene polymorphism in normal weight obese syndrome: relationship to body composition and IL-1 alpha and beta plasma levels. *Pharmacol Res*. 2007; 55(2): 131–38.

Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 1998; 16:457–99.

Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. *Chest*. 2000; 118(2):503-08.

Dominguez-Lopes A, Remondetto GE, Navarro-Galindo S. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. “Criollo”) Infusion. *Journal of Food Science and Technology*. 2008; 43:322-25.

Engin, A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Obesity and Lipotoxicity*. Springer, Cham. 2017; 1-17.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20(2):218-24.

Fakeye T. Toxicity and immunomodulatory activity of fractions of *Hibiscus sabdariffa* Linn (family Malvaceae) in animal models. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2008; 5:394-98.

Fakeye TO, Pal A, Bawankule DU, Yadav NP, Khanuja SP. Toxic effects of oral administration of extracts of dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae). *Phytother Res*. 2009; 23(3):412-6.

Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y, et al. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *Plos One*. 2015; 10(4):e 0120775.

Farombi EO, Ige OO: Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; 21(6): 601-09.

Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2011; 9:1-10.

Fernández RP, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol*. 2002; 55(7): 738-50.

Fernández-Arroyo S, Herranz-López M, Beltran-Débon R, Borrás-Linares I, Barrajón-Catalán E, Joven J, et al: Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from *Hibiscus sabdariffa* in rats and associated antioxidant status. *Mol Nutr Food Res*. 2012; 56(10): 1590-95.

Ford ES. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis*. 2004; 173: 309-14.

Foster MC, et al. Association of subcutaneous and visceral adiposity with albuminuria: the Framingham Heart Study. *Obesity*. 2011; 19(6): 1284-1289.

Francisqueti FV, Nascimento AF, Corrêa CR. Obesity, inflammation and metabolic complications. *Nutrire*. 2015; 40(1): 81-89.

Fried M, Hainer V, Basdevant A, Buchwald H, Deitel M, Finer N, et al. Interdisciplinary European guidelines on surgery of severe obesity. *Obes Surg*. 2007; 17:260 –70.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(3): 847-50.

Friedman J, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395: 763–770.

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280(6): E827-47.

Fui MN, Dupuis P, Grossmann M: Lowered testosterone in male obesity: mechanisms, morbidity and management. *Asian J Androl.* 2014; 16(2): 223-31.

Funahashi T, Matsuzawa Y, Kihara S. Adiponectin as a potential key player in metabolic syndrome Insights into atherosclerosis, diabetes and cancer. *Int Congress Series.* 2004; 1262: 368-71.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316(2):129-39.

Giugliano F, et al. Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *Journal of endocrinological investigation.* 2004; 27(7): 665-69.

Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, Dahms WT, Atkinson RL. Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 1211–19.

Gromadzka-Ostrowska J, Przepiorka M, RomanowiczK. Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. *Reproductive Biology.*2002; 2:277-93.

Guardiola S, Mach N. Potencial terapéutico del Hibiscus sabdariffa: una revisión de las evidencias científicas. *Endocrinol. Nutr.* 2014; 61:274-95.

Guo D, Wu W, Tang Q, Qiao S, Chen Y, Chen M, et al. The impact of BMI on sperm parameters and the metabolite changes of seminal plasma concomitantly. *Oncotarget.* 2017; 8:48619–34.

Gurrola-Díaz CM, García-López PM, Sánchez-Enríquez S, Troyo-Sanromán R, Andrade-González I, Gómez-Leyva JF. Effects of Hibiscus sabdariffa extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine.* 2010; 17(7): 500-05.

Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep.* 2009; 9(1):26-32.

Hainer V, Finer N, Tsigos C, Basdevant A, Carruba M, Hancu N, Mathus-Vliegen L, Schutz Y, Zahorska-Markiewicz B: Management of obesity in adults: project for European primary care. *Int J Obes.* 2004; 28:226 –31.

Hainer V, Toplak H, Mitrakou A. Treatment modalities of obesity: what fits

whom? *Diabetes Care*. 2008; 31(2):269-77.

Hajshafiha M, Ghareaghaji R, Salemi S, Sadegh-Asadi N, Sadeghi-Bazargani H. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples. *Int. J. Gen. Med*. 2013; 6:447-51.

Hammound AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell TD, Meikle W. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril*. 2008; 90: 2222-25.

He J, Usui I, Ishizuka K, Kanatani Y, Hiratani K, et al. Interleukin 1 alpha inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2006; 20(1):114–24.

Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi HS, Soh J, Mellon SH, Lee K. Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell Biol*. 2004; 24: 2593-604.

Hopkins AL, Lamm MG, Funk JL, Ritenbaugh C. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*. 2013;85:84-94.

Ishikawa, Makoto, et al. Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11(2):466-72.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001; 24:683-89.

Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertility and sterility*. 2004; 82(4): 863-70.

Johnsen SG. Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1(1):2-25.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005; 26(3): 439-51.

Kalra SP. Circumventing leptin resistance for weight control. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(8): 4279-81.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem*

Pharmacol. 2003; 149:1-38.

Kanashiro GP, Cassu RN: Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade SF. Manual de Terapêutica Veterinária. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008. cap.25, p. 727-746.

Karastergiou K, Mohamed-Ali V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; 318(1-2):69-78.

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl*. 2008; 29:251-59.

Keaver L, Xu B, Jaccard A, Webber L. Morbid obesity in the UK: A modelling projection study to 2035. 2018 Aug 30:1403494818794814. doi: 10.1177/1403494818794814. [Epub ahead of print].

Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes*. 2006; 30(9): 1347-55.

Kort HI, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of andrology*. 2006; 27(3): 450-52.

Kramer H, Luke A, Bidani A, Cao G, Cooper R, McGee D. Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *American Journal of Kidney Diseases*. 2005; 46(4):587-94.

Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Krüger N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Science*. 2005; 76(14):1553-73.

Kukkonen-Harjula KT, Borg PT, Nenonen AM, Fogelholm MG: Effects of a weight maintenance program with or without exercise on the metabolic syndrome: a randomized trial in obese men. *Prev Med*. 2005; 41:784-90.

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002; 288: 2709-16.

Lee SG, Lee YJ, Jang MH, Kwon TR, Nam JO. Panax ginseng leaf extracts exert anti-obesity effects in high-fat diet-induced obese rats. *Nutrients*. 2017; 9(9): 999.

Lee WC, Wang CJ, Chen YH. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. *J Agric Food*

Chem. 2009; 57:2206–10.

Lee, David M, et al. The European male ageing study (EMAS): design, methods and recruitment. *International journal of andrology*. 2009; 32(1):11-24.

Lima N, Cavaliere H, Halpern A, Mediros-Neto G. A Função Gonadal do Homem Obeso. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000; 44(1):31-37.

Lin TL, Lin HH, Chen CC, Lin MC, Chou MC, Wang CL. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*. 2007; 27:140-45.

McKay DL, Chen CY, Saltzman E, Blumberg JB: Hibiscus sabdariffa L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J Nutr*. 2010 140(2):298-303.

Mahadevan N, Kamboj P. Hibiscus sabdariffa Linn - an overview. *Natural Product Radiance*. 2009; 8(1):77-83.

Manna P, Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2015; 13(10): 423-44.

Meldrum DR, Marge AM, Joseph CG. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions - but do we have the will? *Fertility and sterility*. 2017; 107(4): 833-39.

Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*. 2012; 8(9):1-6.

Miller DC, Peron SE, Keck RW, Kropp KA: Effects of hypothermia on testicular ischemia. *J of Urol*. 1990;143:1046–48.

Mozaffari-Khosravi H, Jalali-Khanabadi BA, Afkhami-Ardekani M, Fatehi F. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type ii diabetes. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2009; 15(8):899-903.

Nejatbakhsh F, Shirbeigi L, Rahimi R, Abolhassani H. Review of local herbal compounds found in the Iranian traditional medicine known to optimize male fertility. *Andrology*. 2016; 48(8):850-59.

Ochani PC, D'Mello P. Antioxidant and antihyperlipidemic activity of

Hibiscus sabdariffa Linn. leaves and calyces extract in rats. *Indian J Exp Biol.* 2009; 47(4):276-82.

Odigie IP, Ettarh RR, Adigun SA. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *J Ethnopharmacology.* 2003; 85: 181-18.

Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem.* 2010; 285: 6153-60.

Okoko T, Oruambo IF. The effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on cisplatin-induced tissue damage in rats. *Biokemistri.* 2008; 20(2):47-52.

Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cárdenas M, Tovar A, Perera-Marín G, et al. Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol.* 2010;166(2):356-64.

Oliveira CL, Mello MT, Cintra IP, Fisberg M: Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. *Rev. Nutr.* 2004; 17(2): 237-45.

Oliveira EP, Souza MLA, Lima MDA. Prevalência de síndrome metabólica em uma área rural do semi-árido baiano. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50: 456-65.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia,* 2011; 61(2):255-65.

Opal SM, De Paolo VA: Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 117(4): 1162-72.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14: 561-6.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:85-97.

Pasquali R, Gambineri A. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reproductive biomedicine online.* 2006; 12(5):542-51.

Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertility and sterility.* 2008; 90(2):346-51.

Pereira JL, Sampaio e Souza PC, Shinzato VI, Sassob S, Spontoni do Espirito Santo BL, Santana LF, et al. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. *Weight gain and metabolic changes in mice submitted to high fat diet. Ciência & Saúde.* 2018;11(1):51-57.

Phalan S, Wyatt HR, Hill JO, Wing RR: Are the eating and exercise habits of successful weight losers changing? *Obesity.* 2006; 14:710-16.

Pinto PA, Silva, FJ, Munch, ECSM, Chaoubah A, Bastos RV, Andrade LCF, et al. Inadequabilidade da creatinina sérica na identificação precoce da disfunção renal. *J Bras Nefrol.* 2004; 26:196-201.

Plymate SR, Coop SM, Hoop RC, et al. Effects of sex hormone binding globulin (SHBG) on human prostatic carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 40:833-9.

Pozzan, R, Magalhães, MEC, Brandão, AA, Brandão, AP. Dislipidemia, síndrome metabólica e risco cardiovascular. *Revista da SOCERJ.* 2004; 17(2):97-104.

Prado CN, de Jesus Neves DR, de Souza HD, Navarro F. O uso de fitoterápicos no tratamento da obesidade. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento.* 2010; 4(9):14-21.

Proietto J, Baur LA. Management of Obesity. *Med J Aust.* 2004; 180(9):474-80.

Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007; 21(12):1443-55.

Rahnema CD, Crosnoe LE, Kim ED. Designer steroids-over-the-counter supplements and their androgenic component: review of an increasing problem. *Andrology.* 2015; 3(2):150-55.

Reil JC, Thoenes M, Khan BV, Bramlage P, Volpe M, Kirch, W, Böhm M. Abdominal obesity is associated with microalbuminuria and an elevated cardiovascular risk profile in patients with hypertension. *Vascular health and risk management.* 2009; 5:577-85.

Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation.* 2005; 111(7):932-39.

Riaz G, Rajni C. A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus

sabdariffa L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 10(2):575-86.

Ronti T, Lupattelli G, Mannariano E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol*. 2006; 64:355-65.

Sachdewa A, Khemani LD: Effect of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol*. 2003; 89(1):61-66.

Saely C, Geiger K, Drexel H. Browns versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontol*. 2012; 58(1):15-23.

Salamada AD: Obesity and Kidney Disease: A Call to Action. *Nephrology Times*. 2011; 4:8-9.

Samaras K, Botelho N, Chisholm D, Lord R: Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity*. 2010; 18: 884-89.

Scarpellini E, Tack J. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. *Digestive Diseases*. 2012; 30(2):148-53.

Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, et al. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84(2):670-76.

Shukla KK, Chambial S, Dwivedi S, Misra S, Sharma P. Recent scenario of obesity and male fertility. *Andrology*. 2014; 2:809-18.

Sini JM, Umar IA, Inuwa HM. The beneficial effects of extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces in alloxan-diabetic rats: reduction of free-radical load and enhancement of antioxidant status. *J Pharmacognosy and Phytother*. 2011; 3(10), 141-49.

Soares FLP. Efeitos e mecanismos de ação da exclusão dietética de glúten de trigo na obesidade e resistência à insulina experimentais [tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas; 2012.

Sogo T, Terahara N, Hisanaga A, Kumamoto T, Yamashiro T, Wu S, et al. Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin. *Biofactors*. 2015; 41(1):58-65.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409: 307-12.

Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjostrom L: Xenical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XENDOS) study: randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*. 2004; 27:155–161.

Vermeulen A. Testosterone in plasma. In: *Advances in Biosciences* 2nd ed. Berlin, New York: W De Gruyter Raspe. 1968; 105-22.

Wagner IV, Klötting N, Atanassova N, Savchuk I, Spröte C, Kiess W, et al. Prepubertal onset of obesity negatively impacts on testicular steroidogenesis in rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 5:154-162.

Wang SC, Lee SF, Wang CJ, Lee CH, Lee WC; Lee HJ. Aqueous Extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 γ in an Experimental Animal Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 1-9.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112:1785-88.

Wong PK, Yusof S, Ghazali HM, Che-Man YB: Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and Food Science*. 2002; 32:68-73.

World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva: WHO. 1998.

Zafar U, et al. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones*. 2018; 17(3): 299-313.

Zar, J. H. *Biostatistical analysis*, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009. 994p.

9. ANEXOS



UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



FACULDADE DE MEDICINA
FMB



CEUA
Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais
Cred. Anvisa da Portaria DNU nº 011 de 13/10/2012

CERTIFICADO Nº 1232/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos do chá de hibisco nos parâmetros hormonais e testiculares de ratos obesos", registrada com o nº 1232/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano – que envolve a utilização de material estocado de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 31 de agosto de 2017, e certificado CEUA-FMVZ 235/2012.

Finalidade () Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	29/09/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	250 gramas/adulto
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP - FMG



Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da CEUA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Dênio Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail: secretaria_oua@fmb.unesp.br

10. ARTIGO CIENTÍFICO

Title: “EVALUATION OF THE EFFECTS OF HIBISCUS SABDARIFFA IN HORMONAL AND TESTICULAR PARAMETERS IN OBESE RATS”.

Authors: Arnaldo Luiz Flavio Schaefer^I, Alessandra Melchert^{II}, João Luiz Amaro^{III}, Vinicius Cardoso Nobrega^{IV}, Marjorie de Assis Golim^V, Paulo Roberto Kawano^{VI}.

^I Postgraduate student, Program in Surgery and Translational Medicine, São Paulo State University Medical School – Univ. Estadual Paulista - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Authors’ contribution: Acquisition, analysis and interpretation of data; technical procedures; manuscript preparation. ORCID:

^{II} Assistant Professor, Department of Veterinary Clinic, São State University School of Veterinary Medicine and Animal Science – Univ. Estadual Paulista - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Authors’ contribution: Design, intellectual and scientific content of the study, supervision, technical procedures, critical revision. ORCID:

^{III} Full professor; Department of Urology; Medical School of São Paulo State University – Univ. Estadual Paulista - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Authors’ contribution: Conception and design; critical revision; final approval. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3745-0761>.

^{IV} PhD, pathologist; Department of Pathology, São Paulo State University Medical School – Univ. Estadual Paulista - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Authors’ contribution: critical revision; analysis and interpretation of histopathological data. ORCID:

^V Biomedical engineering, Hemocenter Division; São Paulo State University Medical School – Univ. Estadual Paulista - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Authors’ contribution: analysis and interpretation of data; technical procedures. ORCID:

^{VI} Associated Professor, Department of Urology; São Paulo State University Medical School – Univ. Estadual Paulista - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Authors’ contribution: Design, intellectual and scientific content of the study, manuscript writing, critical revision, final approval. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8411-5822>.

ABSTRACT

Purpose: The prevalence of obesity is increasing worldwide and may cause complex metabolic and endocrine changes with adverse outcomes. This study aimed to evaluate the effects of *Hibiscus sabdariffa* (HS) in clinical and testicular parameters in rats with obesity induced by high fat diet (HFD).

Methods: Forty-eight Wistar male rats were randomly divided into four groups (n=12): G1 (control): fed with commercial rat chow (CRC) and water intake; G2: CRC and HS in aqueous solution (HAS); G3: HFD and water and G4: HFD and HAS, *ad libitum*, for 16 weeks. Weight gain and food/liquid intake were monitored and creatinine clearance (CrC) was measured at the 8th and 16th weeks. At the end, blood samples were collected to determine serum levels of testosterone and electrolytes, renal function, lipid profile and pro/anti-inflammatory cytokines. After euthanasia, testes were removed for histopathological analysis.

Results: The supplemented groups showed significantly more weight gain than control (616.2 ± 98.9 and 591.8 ± 78.9 vs 493.2 ± 52 g, respectively; $p < 0.05$), but with weight stabilization in G4 from the 12th week. A significant reduction in CrC in G3 was observed when compared to control (1.34 ± 0.83 vs 2.69 ± 1.3 mL/kg/ min, $p < 0.05$), but not in G4 (1.89 ± 0.89 vs 2.69 ± 1.3 mL / Kg / min, $p > 0.05$), with no change in creatinine serum levels. Electrolytes remained within normal limits and the lipid profile analysis showed a reduction in HDL fractions in G3, as well as LDL in G2 and G4 in relation to control (5.0 ± 1.23 and 5.62 ± 1.19 vs 7.54 ± 5.14 mg/dL, respectively; $p < 0.05$). G2 also showed a marked reduction in triglycerides when compared to G1 (46.31 ± 15.35 vs 83.2 ± 34.11 mg/dL, respectively; $p < 0.05$). Analysis of proinflammatory cytokines showed an increase in leptin in G3 and G4 compared to control (8552.62 and 7537.30 vs 3157.54, respectively; $p < 0.01$), and IL-1 α decreased in G2 and G4, being more expressive in G4 when compared to the control (6.74 and 0.91 vs 17.9, respectively; $p < 0.05$). Although variations in testosterone serum levels were not observed in

different groups, histopathological analysis revealed a reduction in Johnsen score in G3 when compared to control, but not in G4 (9.29 vs 9.49 and 9.44, respectively, $p < 0.01$).

Conclusion: HS prevented weight gain in supplemented animals with HFD, exerting a favorable modulation on the renal filtration rates and lipid profile of these animals. In addition, it was able to reduce the expression of proinflammatory cytokines and minimize the damage caused in spermatogenesis of rats exposed to HFD, thus reinforcing the medicinal properties previously attributed to this plant.

Key words: Rat, obesity, *Hibiscus sabdariffa*, testicle.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), obesity is one of the largest public health problems in the world. According to WHO estimates, in 2025, about 2.3 billion adults will be overweight and over 700 million will be obese [ABESO, 2019]. Consequently, a significant increase in chronic diseases directly related to obesity is expected, with emphasis on cardiovascular diseases, numerous types of cancers, osteoarthritis, renal dysfunction, infertility and metabolic syndrome (MS) [KEAVER et al, 2018; ENGIN et al, 2017; ZAFAR et al, 2018], resulting in worsening quality and decreased life expectancy in obese people [MELDRUM et al, 2017; MANNA et al, 2015].

Contrary to what was formerly believed, adipose tissue is not only an energy reservoir, but an endocrine tissue / organ that secretes different bioactive substances, known as adipokines, which directly participate in the secretion of pro and anti-inflammatory factors, which act systemically [SCARPELLINI et al, 2012]. Thus, obesity represents a chronic inflammatory state that contributes to the development of metabolic disorders and, consequently, with the occurrence of MS and other morbidities [OUCHI et al, 2011; SCARPELLINI et al, 2012].

Phytotherapy, as an alternative medicine or complementary therapy, is a social phenomenon in the current world, having been present in the treatment of obesity for a long time [PRADO et al, 2010]. *Hibiscus sabdariffa* (HS) is a plant rich in different bioactive substances such as vitamin C, beta-

carotene, lycopene, polyphenols, anthocyanins and other water-soluble antioxidants [WONG et al, 2002; WANG et al, 2011]. These compounds are responsible for several of the therapeutic properties attributed to HS, such as antioxidant, anti-lipid, anti-hypertensive, antimicrobial, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-cancer actions [ALARCON-AGUILAR et al, 2007, RIAZ et al, 2018]. Although many of these effects have been extensively documented in the literature, some results are still controversial [GUARDIOLA et al, 2014].

Thus, the present study aimed to assess the damage-mitigating properties attributed to HS such as anti-inflammatory, hypolipidemic and general effects on obesity, in an experimental model of obesity in rats supplemented with a hyperlipid diet.

MATERIAL AND METHODS

A total of forty-eight Wistar male rats, weighing from 180 to 220 g, were randomly divided into four groups: G1 (control group, n=12): rats fed with commercial rat chow (CRC) and water intake; G2 (n=12): rats fed with CRC and HS in aqueous solution (HSAS), in a dose of approximately 60 mg/kg/day; G3 (n=12): rats fed with high fat diet (HFD) and water and G4 (n= 12): HFD and HSAS. Both intakes, solid (HFD and CRC) and liquids (HSAS and water) were offered *ad libitum* to the animals for a period of 16 weeks.

The rats were allocated in individual cages and maintained under controlled lighting and temperature. All animals were fed according to described in the respective groups, and food (g)/fluid intakes (mL) were individually measured every day.

This study was previously approved by the Ethical Committee of São Paulo State University Medical School – UNESP, Brazil. (Protocol number 1232/2017 – CEUA).

Preparation of HS in an Aqueous Solution (HSAS) and High Fat Diet (HFD)

The HAS was prepared by adding 240 milliliters of hot water at 60°C in 1.25 grams of soluble hibiscus from suitable commercial laboratory with 2.68% of polyphenol content and remained under infusion for six minutes. The infusion was strained and offered to the animals of G2 and G4 as the only source of liquid. A new infusion was prepared every 24 hours, following the same routine previously described.

High fat diet was prepared in our laboratory and contained commercial rat chow (Presence®) plus peanuts, milk chocolate, and sweet biscuit in a proportion of 3:2:2:1. All components of the hyperlipidic diet were ground and blended, and consisted of lipids 20%, protein 20%, carbohydrates 48%, and fiber 4% [ESTADELLA et al 2004]. Commercial rat chow (Presence®) consisted of lipids 4.0%, protein 23.0%, mineral residues 10.0%, carbohydrates 55%, and fiber 7.0%.

Procedures

All animals were weighed on the 1st, 4th, 8th, 12th and 16th weeks. On the 8th and 16th weeks, they were individually placed in metabolic cages to collect the 24hs diuresis volume. The animals were fasted overnight, and a blood sample was collected from the dorsal tail vein of all rats to measure serum creatinine (Cr) levels. Urine volume was measured for the Cr clearance calculi.

After 16 weeks, the animals were submitted to general anesthesia with tiletamine/zolazepan (Zoletil®), 30 mg/kg intramuscularly and sodium thiopental (thiopentax®), 60 mg/kg intraperitoneally [KANASHIRO et al, 2008]. Euthanasia was performed by overdose of thiopental after blood collection and the testis were removed for histopathological analysis.

About 5-7 milliliters of blood were collected by cardiac puncture in vacuum tubes without anticoagulant and centrifuged to obtain serum. Therefore, the samples were identified and kept frozen at -80°C. Serum biochemical (urea, creatinine, triglyceride, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, cytokines and testosterone), and urinary tests (creatinine) were evaluated. The assays were performed using commercially available kits (Labtest®, Lagoa Santa, Brazil) in a Labmax progress automatic analyzer (Labtest®, Lagoa Santa, Brazil).

The creatinine clearance (Ccr) was calculated from the urinary Cr,

serum Cr, 24-hour urine volume, and body weight, using the following equation: $Ccr \text{ (mL/min/kg)} = [\text{Urine Cr (mg/dL)} \times \text{urine volume (mL)}] / [\text{serum Cr (mg/dL)} \times \{1000/\text{body weight (g)}\} \times 1440 \text{ (min)}]$ [KEENAN et al, 2000].

Leptin, adiponectin and interleukin 8 (IL-8) concentrations were measured using commercially available immunosorbent assay kits (ELISA), special for rats (Millipore, St. Charles, MO, USA). Values were reported in nanograms per deciliter of serum (ng/dL). Interleukin 4 (IL-4) and 1-alfa (IL-1 α) measurements were performed using the CBA method (Cytometric Bead Array®) in CBA Rat Soluble Protein - Flex Set kits, according to the manufacturer's instructions. About 50 microliters (μ L) of plasma from each animal were used for simultaneous detection of soluble proteins.

Histopathological analysis

After inclusion in paraffin blocks, the testicles were sectioned longitudinally with 5 μ m thickness and stained using the Hematoxylin and Eosin (HE) technique. The slides were scanned using the DAKO® Autostainer Link 48 scanner and the images were blindly evaluated by a single pathologist, using an optical microscopy under 40xx magnification. The Leydig cell groups present in the stroma of each slide were counted expressed in absolute value per slide, per animal. Spermatogenesis was categorized by counting the number of layers of germ cells in the testicles and the score performed according to the Johnsen Score, ranging from 1 to 10 [JOHNSEN,

1970]. The number of germinal epithelial layers were counted in 10 seminiferous tubules as described by Miller and collaborators [MILLER et al, 1990].

Statistical analysis

The data was expressed as mean \pm standard deviation. The study of quantitative variables such as body weight, serum urea, creatinine and lipid profile, for example, considered the model of repeated measures in a two-factor scheme (diet and hibiscus) and was complemented by Bonferroni's multiple comparison.

The comparison between body weight measurements in each group was performed using repeated ANOVA measurements, followed by Tukey's post hoc test. Statistical analysis was performed on SigmaStat, version 2.0 and the results were considered significant having p values <0.05 .

The statistical study of the variables involving the dosages of pro and anti-inflammatory interleukins and testosterone was performed by the non-parametric analysis of variance technique considering the model of two independent factors (offer or not of hibiscus tea/DPH supplementation) complemented with Dunn's multiple comparison test. All conclusions were discussed at the 5% significance level [ZAR, 2009].

The data from the histopathological analysis of the testicles (Johnsen Score and Leydig cell count) showed non-normal distribution and were analyzed using the Kruskal-Wallis test. For comparisons between groups, the

Wilcoxon paired test adjusted with the Holm method was used. The analyzes were performed with software R version 3.4.2.

RESULTS

Weight changes, food and fluid intake

In the 1st week, there was no significant difference in body weight evaluation among groups, demonstrating experimental homogeneity. All animals showed a cumulative weight gain, being significantly higher in G3 and G4 when compared to other groups. However, at 12th week, their body weight stabilized, excepting G3, which gain weight until the end of the study (Table 1).

About food intake, G1 and G2 showed higher intake than G3 and G4 (27.6 ± 1.8 e 25.8 ± 2.1 versus 21.4 ± 2.4 e 21.3 ± 3.2 g, respectively, $p<0.05$).

The evaluation of fluid intake (HSAS or water), didn't show statistical differences between studied groups.

Serum dosages

Renal function evaluations at 16th week showed that creatinine clearance (CCr) was statistically lower in G4 than control and G2/G3 at the end of study (Table 2). At 8th week, CCr in G3 tended to be lower than control, but there was no statistically significant difference (1.65 ± 0.76 vs 2.76 ± 1.66 mL/kg/min; $p>0.05$).

Urea values of G3 and G4 were statistically lower than those of control. In addition, G2 showed higher values than control (Table 2). Despite the results of CCr and urea, serum creatinine measurements of the four groups showed no statistically significant difference (Table 2).

Regarding the serum electrolytes, calcium and potassium dosages did not show any statistically significant among the four groups. However, G2 and G4 showed significantly higher sodium levels than control (Table 2).

The lipid profile analysis did not show statistically significant differences in total cholesterol levels among the four groups. On the other hand, LDL cholesterol measurements were lower in G2 and G4 when compared to control. Considering HDL fraction, G3 showed significantly lower dosage than G1, but not in G4. The dosages of triglycerides were statistically lower in G2 than those of control, with values close to half of G1 (Table 3).

The analysis of serum testosterone showed no statistically significant difference in the different study groups (Table 4).

Considering the analysis of proinflammatory cytokines, there was an increase in leptin in G3 and G4 in relation to the control ($p < 0.01$) whereas IL-1 α showed a reduction in G2 and G4, being markedly more expressive in the latter, when compared to control. Serum IL-8 measurements did not show statistically significant variations between the different groups (Table 4).

The analysis of anti-inflammatory cytokines (adiponectin and interleukin 4) did not reveal statistically significant variations in the different

study groups (Table 4).

Histopathological analysis

Histopathological analysis did not find any statistically significant difference regarding the count of Leydig cells present in the testicular stroma in the different groups studied (Table 5).

However, the evaluation of spermatogenesis in seminiferous tubules, categorized based on the Johnsen score, demonstrated a reduction in the final score of the G3 score, not only in relation to the control group, but also when compared to the other groups. It is noteworthy that G4 had a final score similar to the control group (Table 5).

DISCUSSION

In order to better understand of the pathophysiology of obesity, the use of different experimental models seeks to induce obesity, in a manner similar to that of humans. Among the options currently available, the most commonly used model of obesity is that induced by diet, particularly in rats [SOARES et al, 2012].

Following this reasoning, our model used the standardized diet by Estadella and collaborators, composed of a hypercaloric, normoproteic and hyperlipidic mixture containing 20% of proteins, 20% of lipids, 48% of carbohydrates and 4% of fibers [ESTADELLA et al, 2004]. As lipids represent a greater energy source in relation to carbohydrates and proteins

(9Kcal/g versus 4Kcal/g, respectively), high fat diets (HFD) are the most used in an attempt to mimic obesity in animal models [BUETTNER et al, 2007]. Although there are other models of high-fat diet proposed in the literature, reaching proportions of up to 60% of lipids [WAGNER et al, 2016], we consider that these models would not be adequate because they extrapolate the composition of the diet usually consumed by the majority of the population.

Thus, evaluating the intake of the animals studied, we observed that the supplemented groups G3 and G4 ($21.4 \pm 2.4\text{g}$ and $21.3 \pm 3.2\text{g}$, respectively) had lower feed intake compared to the control and G2 ($27.6 \pm 1.8\text{g}$ and $25.8 \pm 2.1\text{g}$, respectively; $p < 0.05$). Such a finding is justified since the energy density of HFD is higher than the standard diet where, despite the lower consumption in supplemented animals, greater weight gain was observed. This same pattern in the relationship between consumption/weight gain was reported by Kretschmer and collaborators in their study with animals submitted to supplementation with HFD [KRETSCHMER et al, 2005].

Weight gain was progressive in all study groups and, considerably higher, in animals supplemented with HFD. However, after the 12th week, we observed a stabilization in the weight of the animals. This behavior seems logical to us where, despite the free supply of food, once the balance between energy intake and expenditure is reached, there is a tendency for body mass to stabilize, as they were adult and physiologically normal animals. Contrary to this reasoning, the G3 animals were the only ones that did not follow this

pattern and continued to gain weight until the end of the experiment (16 weeks). It is noteworthy that the animals supplemented with HFD associated with Hibiscus sabdariffa (HS) in aqueous solution (HAS) did not present weight gain in the last four weeks of the experiment, despite having consumed the same amount of feed as G3 and, therefore, they received the same caloric intake. This behavior demonstrates a clear reduction in the gain rate associated with the stabilization of the weight of these animals, despite the supplementation, thus reinforcing the supposed auxiliary role of HS in the control of obesity, similarly to what was suggested by Alarcon-Aguilar and collaborators [ALARCON- AGUILAR et al, 2007].

Regarding fluid intake, the absence of statistical difference between HSAS or water in the different groups, shows that HSAS was well accepted among animals and that its consumption was stable throughout the procedure, respecting the volume of fluids usually ingested. by this animal species.

Among its numerous attributable medicinal properties, HS is known for its ability to mitigate the progression of kidney injury in diabetic nephropathy in rats [LEE et al, 2009]. Similar to these findings, in our study, it was possible to observe a protective effect of HS in animals with induced obesity and treated with HSAS, which kept their creatinine clearance (CrC) rates preserved in relation to the control group. Although statistically significant (1.34 ± 0.83 versus 2.69 ± 1.3 ml / Kg / min, $p < 0.05$), the decrease in CrC in G3 did not change the serum levels of final creatinine in these animals. However, it is necessary to consider that creatinine is not a good marker for

kidney function, since its levels will only change beyond normal values, from a decrease in the order of 50% to 60% of the glomerular filtration rate [PINTO et al, 2004]. Therefore, it is possible to suppose that the long-term follow-up of these animals, in addition to the 16 weeks proposed in this study, would demonstrate a worsening of renal function deterioration in these animals, as observed in chronic conditions of obesity in humans [REIL et al, 2009; FOSTER et al, 2010; KRAMER et al, 2005]. Although the animals in G2 have shown a significant increase in urea levels in relation to the control, the mean values are close to the normal range for Wistar rats (30-57mg / dL), according to Melo et al. [MELO et al, 2012].

Some studies have proposed to evaluate the behavior of serum electrolytes in models by chronically using the consumption of HS. Odigie et al., studying a model of hypertension induced in rats by unilateral renal clamping, observed an improvement in blood pressure levels in animals treated with HS over 14 weeks. However, the pattern of the main serum electrolytes remained stable, despite a trend in potassium increase, which was not statistically significant [ODIGIE et al, 2003]. In our study, the monitoring of serum electrolytes did not reveal significant variations in the different groups, except in the analysis of sodium. Serum sodium levels in animals receiving HSAS (G2 and G4) showed a statistically significant increase compared to the control group (139.77 ± 3.90 and 142.15 ± 1.91 versus 138.23 ± 2.55 mmol / L, respectively; $p < 0.05$). Although oscillating within the normal range for the species (132-146 mEq / L) [MELO et al, 2012], this

effect was not expected, since HS is known for its antihypertensive properties [ODIGIE et al, 2003]. Unfortunately, we found no factors that could justify the observed results.

As demonstrated by Estadella et al., the high-fat diet is able to induce a pronounced weight gain and adiposity in animals after eight weeks of supplementation, these findings being accompanied by an increase in serum triglycerides (TG) [ESTADELLA et al, 2004]. Although in our study the animals supplemented with HFD showed effective weight gain, they did not show elevated TG levels as expected. However, animals that received HS associated with the normal diet (G2) showed a significant reduction in TG, reaching levels close to half of those found in the control group. These results suggest that in addition to helping to control dyslipidemia in obese patients, the use of HS can also benefit patients with dyslipidemic conditions not associated with obesity.

As a general rule, the increase in visceral adiposity is associated with a decrease in HDL cholesterol fraction, hypertriglyceridemia and normal or marginally altered LDL levels [BARROSO et al, 2002]. Although in our study the animals supplemented with HFD did not show variations in total cholesterol levels, the reduction in the HDL fraction was evident in G3 when compared to the control group. However, it is worth noting that the supplemented animals treated with HS had normal serum HDL levels, suggesting a clear protective effect against the decrease in the so-called “good fraction” of cholesterol. Another important effect observed among animals

that used HS (G2 and G4) was the reduction of the “bad” cholesterol fraction (LDL) in relation to the control. Such findings were similar to those found by Chen and collaborators who observed a reduction in LDL and TG concentrations when treating rabbits fed with HFD with 1% aqueous HS extract for 10 weeks [CHEN et al, 2003].

Systemically, in obesity, adipocyte hypertrophy associated with macrophage infiltration and production of proinflammatory cytokines occurs [SCARPELLINI et al, 2012]. At the same time, there is an increase in the release of free fatty acids and dysregulation in the secretion of adiponectin, resistin and leptin, where the unregulated secretion of these adipokines may result in increased food intake and reduced energy expenditure, contributing even more to weight gain [GALIC et al, 2010]. These adipokines are responsible for exacerbating the inflammatory process in the body and are involved in a series of comorbidities, including the development of insulin resistance [GUTIERREZ et al, 2009]. In our study, we observed that the animals supplemented with HFD (G3 and G4) showed an important increase in leptin when compared to the control, demonstrating that the fat rich diet was able to interfere in the physiology of adipose tissue, altering the production of proinflammatory cytokines. Although it was not able to decrease leptin levels in these animals, the administration of HS resulted in an evident reduction in serum levels of IL-1 α , particularly in G4. Considering that this interleukin constitutes an important cytokine of proinflammatory activity (being related to the induction of fever, synthesis of proteins of the

acute liver phase, release of neutrophils, in addition to acting as a mediator in insulin resistance), from the observed effects, it is possible to infer that HS can help in combating the effects of inflammation, reducing circulating levels of inflammatory cytokines not only in obese patients, but also in eutrophic patients with chronic inflammatory states.

According to our data, it is possible to suppose that, under the conditions presented, an eventual modulation of HS on the inflammatory process of these animals would occur, more significantly, from the reduction of the levels of inflammatory cytokines than from the stimulation of those with anti-inflammatory activity, since, as demonstrated, the latter did not show significant changes between the different groups evaluated.

It has been shown that obesity is able to interfere in the reproductive axis of animals and humans by deregulating reproductive functions [GROMADZKA-OSTROWSKA et al, 2002; GLASS et al, 1981]. Olivares and collaborators, using a diet enriched with saturated fat, demonstrated that, after 6 months of exposure, the serum levels of testosterone (T) and total LH of male rats were lower than in the control animals, revealing the presence of hypogonadotropic hypogonadism in obese animals [OLIVARES et al, 2010]. In our study, however, serum T analysis did not reveal any statistically significant difference in the different groups. Considering the study by Olivares, perhaps the time of exposure to the high-fat diet we used was insufficient to induce marked changes in relation to testosterone.

However, several mechanisms may be involved in the way that obesity

affects fertility. In addition, chronic inflammation associated with obesity can indirectly contribute to the development of hypogonadism through a high production of proinflammatory cytokines by adipocytes, directly inhibiting the ability of Leydig cells to produce testosterone [HONG et al., 2004]. In our study, we did not evaluate the integrity of the pituitary-testicular axis, however, the global count of Leydig cells preserved in the testicular stroma associated with the maintenance of serum testosterone levels, allows us to infer that, apparently, the hormonal status of these animals was not affected. Although Wagner and colleagues observed a decrease in intratesticular testosterone levels associated with a reduction in the overall number of Leydig cells in rats supplemented with a high-fat diet, in their model, the authors employed a diet with a high concentration of lipids (60%) and for a long period (9 months), with no significant variations found with three months of follow-up [WAGNER et al, 2016].

The effect of male obesity on sperm parameters has been well documented in human and animal models. Previous studies have shown that changes such as decreased concentration, motility and increased abnormal sperm morphology are directly related to obesity [SHUKLA et al. 2014, GUO et al. 2017]. Although we did not evaluate the seminal parameters in our model, the histopathological analysis of seminiferous tubules showed a clear impairment of spermatogenesis in G3, translated by an overall reduction in the Johnsen score in these animals. However, in animals supplemented with HFD that received HS (G4), the score obtained was the same as in the control

group, suggesting that HS was able to mitigate the deleterious effects of obesity on the spermatogenesis of these animals. Our data are in line with the findings of Amin et al., who reported a protective effect of HS against cisplatin-induced reproductive toxicity in rats [AMIN & HAMZA, 2006; AMIN et al, 2008]. Unfortunately, a more in-depth comparison of the histological results obtained by us with previous studies is difficult to be performed, since there are practically no data available in the literature that evaluate the effects of HS on testicular architecture from the point of view addressed in our study.

Finally, although most of the available studies suggest a number of beneficial effects related to the use of HS in the most different therapeutic applications, some authors have expressed concern about its unrestricted use. According to some studies, *H. sabdariffa* extract may exhibit a low degree of acute toxicity, with an average lethal dose (LD50), ranging from 2,000 to more than 5,000mg/kg/day [HOPKINS et al, 2013]. However, it is worth mentioning that the side effects obtained in these studies were directly related to the consumption of extremely high doses of *H. sabdariffa* extract. In contrast to these models, the vast majority of studies suggest that, like the dose used by us, daily consumption of around 50-100 mg/kg, as a rule, seems to have pharmacological properties capable of inducing a series of beneficial effects to the organism, including stimulating the immune response, without significant side effects [FAKEYE et al, 2008].

In conclusion, using an experimental model in rats, it was possible to demonstrate that HS was effective in helping to control obesity, avoiding weight gain in animals supplemented with HFD. Likewise, it was possible to verify a modulating effect of HS on renal physiology, translated by a maintenance of the creatinine clearance rate; as well as helping to stabilize the lipid profile, as evidenced by maintaining HDL levels and reducing serum LDL rates.

Regarding the anti-inflammatory properties attributed to HS, the dosages of inflammatory cytokines allowed to demonstrate that, although HS was not able to reduce the high levels of leptin in supplemented animals, it was able to effectively reduce the levels of IL-1 α , even in animals with a regular diet.

Finally, considering the possible effects of HS on fertility, our study showed that, by maintaining the Johnsen score, hibiscus was able to avoid the deleterious effects observed on cell differentiation in the seminiferous tubules of animals exposed to a high fat diet.

The current results available in the literature do not yet allow us to state exactly what the ideal dose of *H. sabdariffa* would be associated with maximum therapeutic efficacy. The lack of homogeneity in the experimental design, as well as the low number of individuals - associated with the inherent inter-individual heterogeneity, are partly responsible for the lack of consistency in the results obtained in studies involving human beings. Even so, the results currently available suggest interesting therapeutic properties

related to this plant, which deserve to be better studied, in order that HS can be effectively used as an alternative or even complementary therapy to combat the most different diseases.

REFERENCES

1. ABESO: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>. Acessado em novembro de 2019.
2. Keaver L, Xu B, Jaccard A, Webber L. Morbid obesity in the UK: A modelling projection study to 2035. 2018 Aug 30;1403494818794814. doi: 10.1177/1403494818794814. [Epub ahead of print].
3. Engin, A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Obesity and Lipotoxicity*. Springer, Cham. 2017; 1-17.
4. Zafar U, et al. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones*. 2018; 17(3): 299-313.
5. Meldrum DR, Marge AM, Joseph CG. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions - but do we have the will? *Fertility and sterility*. 2017; 107(4): 833-39.
6. Manna P, Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2015; 13(10): 423-44.
7. Scarpellini E, Tack J. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. *Digestive Diseases*. 2012; 30(2):148-53.
8. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11:85-97.
9. Prado CN, de Jesus Neves DR, de Souza HD, Navarro F. O uso de fitoterápicos no tratamento da obesidade. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*. 2010; 4(9):14-21.

10. Wong PK, Yusof S, Ghazali HM, Che-Man YB: Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and Food Science*. 2002; 32:68-73.
11. Wang SC, Lee SF, Wang CJ, Lee CH, Lee WC; Lee HJ. Aqueous Extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 γ in an Experimental Animal Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 1-9.
12. Alarcon Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, Almanza-Perez JC, Romero-Nuñez E, Campos-Sepulveda EA, et al. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J Ethnopharmacol*. 2007; 114(1): 66-71.
13. Riaz G, Rajni C. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 10(2):575-86.
14. Guardiola S, Mach N. Potencial terapéutico del *Hibiscus sabdariffa*: una revisión de las evidencias científicas. *Endocrinol. Nutr*. 2014; 61:274-95.
15. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20(2):218-24.
16. Kanashiro, G.P. and R.N. Cassu, 2008. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: *Manual de Terapêutica Veterinária*, Andrade, S.F. (Ed.). Roca, São Paulo, pp: 727-746.
17. Keenan, K.P., J.B. Coleman, C.L. McCoy, C.M. Hoe, K.A. Soper and P. Laroque, 2000. Chronic nephropathy in ad libitum overfed Sprague–Dawley rats and its early attenuation by increasing degrees of dietary (caloric) restriction to control growth. *Toxicol. Pathol.*, 28: 788–798.
18. Johnsen SG. Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1(1):2-25.
19. Miller DC, Peron SE, Keck RW, Kropp KA. Effects of hypothermia on testicular ischemia. *J Urol*. 1990; 143(5): 1046-1048.
20. Zar, J. H. *Biostatistical analysis*, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall,2009. 994p.

21. Soares FLP. Efeitos e mecanismos de ação da exclusão dietética de glúten de trigo na obesidade e resistência à insulina experimentais [tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas; 2012.
22. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007;15(4):798–808.
23. Wagner IV, Klötting N, Atanassova N, Savchuk I, Spröte C, Kiess W, et al. Prepubertal onset of obesity negatively impacts on testicular steroidogenesis in rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 5:154-162.
24. Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Krüger N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Science*. 2005; 76(14):1553-73.
25. Lee WC, Wang CJ, Chen YH. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. *J Agric Food Chem*. 2009; 57:2206–10.
26. Pinto PA, Silva, FJ, Munch, ECSM, Chaoubah A, Bastos RV, Andrade LCF, et al. Inadequabilidade da creatinina sérica na identificação precoce da disfunção renal. *J Bras Nefrol*. 2004; 26:196-201.
27. Reil JC, Thoenes M, Khan BV, Bramlage P, Volpe M, Kirch, W, Böhm M. Abdominal obesity is associated with microalbuminuria and an elevated cardiovascular risk profile in patients with hypertension. *Vascular health and risk management*. 2009; 5:577-85.
28. Foster MC, et al. Association of subcutaneous and visceral adiposity with albuminuria: the Framingham Heart Study. *Obesity*. 2011; 19(6): 1284-1289.
29. Kramer H, Luke A, Bidani A, Cao G, Cooper R, McGee D. Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *American Journal of Kidney Diseases*. 2005; 46(4):587-94.
30. Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*. 2012; 8(9):1-6.

31. Odigie IP, Ettarh RR, Adigun SA. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *J Ethnopharmacology*. 2003; 85: 181–18.
32. Barroso SG, de Abreu VG, Francischetti EA. A Participação do tecido adiposo visceral na gênese da hipertensão e doença cardiovascular aterogênica. *Arq Bras Cardiol*. 2002;78(6):618-30.
33. Chen CC, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, et al: *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(18): 5472-77.
34. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 316(2):129-39.
35. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep*. 2009; 9(1):26-32.
36. Gromadzka-Ostrowska J, Przepiorka M, Romanowicz K. Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. *Reproductive Biology*. 2002; 2:277-93.
37. Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, Dahms WT, Atkinson RL. Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 1211–19.
38. Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cárdenas M, Tovar A, Perera-Marín G, et al. Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol*. 2010;166(2):356-64.
39. Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi HS, Soh J, Mellon SH, Lee K. Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell Biol*. 2004; 24: 2593-604.
40. Shukla KK, Chambial S, Dwivedi S, Misra S, Sharma P. Recent scenario of obesity and male fertility. *Andrology*. 2014; 2:809-18.
41. Guo D, Wu W, Tang Q, Qiao S, Chen Y, Chen M, et al. The impact of BMI on sperm parameters and the metabolite changes of seminal plasma concomitantly. *Oncotarget*. 2017; 8:48619–34.

42. Amin AA, Hamza AA. Effects of Roselle and Ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian J Androl.* 2006; 8:607-612.
43. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl.* 2008;10: 291-97.
44. Hopkins AL, Lamm MG, Funk JL, Ritenbaugh C. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia.* 2013;85:84-94.
45. Fakeye T. Toxicity and immunomodulatory activity of fractions of *Hibiscus sabdariffa* Linn (family Malvaceae) in animal models. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2008; 5:394-98.

TABLES

Table 1: Mean values and standard deviation (SD) of body weight (in grams) of the animals, according to different study groups, over the 1st, 4th, 8th, 12th and 16th weeks.

Week	Groups			
	G1 (Mean and SD)	G2 (Mean and SD)	G3 (Mean and SD)	G4 (Mean and SD)
1	200.5±13.4 ^{Aa}	211.5±18.7 ^{Aa}	215.9±22.0 ^{Aa}	212.2±22.0 ^{Aa}
4	359.0±35.0 ^{Ba}	371.2±27.1 ^{Ba}	412.7±61.8 ^{Bb}	420.5±48.7 ^{Bb}
8	422.6±43.3 ^{Ca}	410.6±38.4 ^{Ca}	496.4±83.0 ^{Cb}	494.9±67.5 ^{Cb}
12	464.8±54.1 ^{Da}	441.4±41.2 ^{Da}	562.2±93.5 ^{Db}	538.8±68.7 ^{Db}
16	493.2±52.7 ^{Da}	470.4±42.6 ^{Da}	616.2±98.9 ^{Eb*}	591.8±78.9 ^{Db**}

Different capital letters in the columns indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). Different lower case letters on the same line indicate statistically significant differences ($p < 0.05$); * $p < 0.01$: G3XG1; ** $p < 0.05$: G4XG1.

Table 2: Mean values and standard deviation (SD) of the creatinine clearance (CCr in mL/Kg/min), urea/creatinine levels (mg/dL) and other serum electrolytes (mEq/L), in the different study groups, at the end of the experiment (16th week).

Serum parameter	Groups			
	G1 (Mean and SD)	G2 (Mean and SD)	G3 (Mean and SD)	G4 (Mean and SD)
CCr 16 th	2.69±1.3	2.66±1.5	1.34±0.83 ^ε	1.89±0.89
Urea	44.00±6.03 [*]	57.45±8.98 ^{**}	31.55±6.33	33.81±3.75
Creatinine	0.40±0.08	0.40±0.11	0.42±0.11	0.42±0.07
Calcium	8.35±0.71	8.38±0.73	8.42±0.37	8.32±0.33
Sodium	138.23±2.55 [#]	139.77±3.90	137.92±2.25 ^{##}	142.15±1.91
Potassium	5.22±1.82	4.35±0.63	4.65±0.95	4.45±0.40

^εp<0.05:G3xG1,G2 ^{*}p<0.05:G1xG3,G4; ^{**}p<0.05:G2xG1,G3,G4; # p<0.05:G1xG2,G4; ## p<0.05:G3xG4

Table 3: Mean values and standard deviation (SD) of the serum lipid profile (mg / dL) in the animals, according to different study groups, at the end of the experiment (16th week).

Serum parameter	Groups			
	G1 (Mean and SD)	G2 (Mean and SD)	G3 (Mean and SD)	G4 (Mean and SD)
Colesterol	52.08±28.89	44.69±7.32	42.00±7.82	44.77±8.44
Triglycerides	83.23±34.11	46.31±15.35 [*]	86.77±36.55	84.08±32.44
HDL	45.92±1.44	46.31±1.03	44.54±0.78 ^{**}	45.46±0.88
LDL	7.54±5.14	5.00±1.23 [#]	7.31±2.29	5.62±1.19 ^{##}

^{*}p<0.05: G2xG1,G3,G4 ^{**}p<0.05:G3xG1,G2 #p<0.05 G2xG1,G3 ##p<0.05 G4xG3

Table 4: Median of minimum and maximum values of the parameters measured in the blood plasma of rats, according to the study group.

Serum parameter	Groups			
	G1	G2	G3	G4
Leptin	3157.54* (1731.8;8621.4)	2750.79# (704.4;5006.7)	8552.62 (2622.5;33347.1)	7537.30 (3434.2;16091.6)
IL-1 α	17.90 (1.03; 52.44)	6.74& (0.50; 220.80)	16.98 (4.76; 47.66)	0.91¥ (1.45; 56.57)
IL-8	30.62 (3.43; 107.07)	17.08 (0.73; 55.92)	25.70 (0.46; 96.25)	20.79 (0.38; 108.58)
Adiponectin**	4278.41 (3057.7;7048.7)	3758.30 (2726.2;7158.4)	5198.72 (3666.2;7695.6)	4431.357 (3480.9;6748.4)
IL-4**	3.10 (1.47;33.28)	4.28 (0.32;189.61)	5.09 (2.35;29.34)	6.1220,79 (1.27;53.17)
Testosterone**	1.27 (0.40; 4.73)	1.78 (0.71; 21.12)	1.62 (0.54; 8.36)	2.94 (0.74; 5.82)

*p<0.01:G1XG3,G4 #p<0.01:G2XG3,G4 &p<0.05:G2XG1,G3,G4 ¥p<0.05:G4XG1,G2,G3
 ** p>0.05

Table 5: Mean and standard deviation of the Johnsen score and Leydig cell count (absolute values) in the testicular stroma of rats, according to the study group.

	Groups				P value
	G1	G2	G3	G4	
Johnsen score	9.49 (0.029)	9.45 (0.052)	9.29* (0.112)	9.44 (0.051)	<0.01
Leydig cell count	5.250 (0.754)	5.000 (0.707)	5.385 (1.193)	5.308 (0.480)	0.614

*G3≠G1,G2,G4.