



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA**

Pedro Ivo Rocchetti Pajolli

**EFEITO PROTETOR DO CHÁ DE HIBISCO NAS  
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA BEXIGA DE RATOS  
OBESOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutor em Cirurgia e  
Medicina Translacional.

Pedro Ivo Rocchetti Pajolli

**EFEITO PROTETOR DO CHÁ DE HIBISCO NAS  
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA BEXIGA DE RATOS  
OBESOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutor em Cirurgia e  
Medicina Translacional.

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

**Botucatu  
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pajolli, Pedro Ivo Rocchetti.

Efeito protetor do chá de hibisco na bexiga de ratos obesos  
/ Pedro Ivo Rocchetti Pajolli. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: João Luiz Amaro

Coorientador: Paulo Roberto Kawano

Capes: 40102092

1. Ratos. 2. Animais de laboratório. 3. Obesidade.  
4. *Hibiscus*. 5. Aparelho urinário. 6. Bexiga.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa*; Obesidade; Trato  
urinário.

# DEDICATÓRIA

À **Deus**, por ser bom o tempo todo, propiciar o dom da vida e ser fonte de toda energia que me motiva.

Aos meus pais, **José e Marcia**, alicerce de toda a minha formação e que sempre estiveram ao meu lado nas conquistas e nas adversidades. Obrigado por serem quem são.

À minha esposa, **Natália**, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Obrigado por aceitar caminhar comigo pelas “montanhas” da vida.

Ao meu filho, **Vinicius**, razão de nossa existência e fonte inabalável de força para seguirmos vibrantes.

Aos meus irmãos, **Ivan e Lauro**, pelo companheirismo e incentivo intenso para alcançar todos os objetivos e alegrias juntos.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador **Prof. Titular João Luiz Amaro**, que com paciência, experiência, destreza e dedicação me auxiliou incessantemente na elaboração de tal projeto. Saiba que as lições aqui aprendidas serão levadas e lembradas para sempre com imenso carinho. Serei sempre grato ao grande mestre e amigo.

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Kawano**, coorientador, conselheiro e entusiasta que atuou em todos os flancos da tese, de modo ativo e sempre pronto para elucidar os mais diversos desafios enfrentados na construção da tese.

# AGRADECIMENTOS

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

Ao Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - HC-FMB, particularmente aos patologistas **Professor Dr. Flávio de Oliveira Lima** e **Dr. Vinicius Cardoso Nóbrega** frente aquisição histológica.

Ao **Professor Carlos E. Alves Fonseca**, docente associado Universidade Paulista e do Departamento de Cirurgia Veterinária e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP, pela excelente análise histológica.

Ao **Prof. Carlos Roberto Padovani** (Departamento de Estatística do IBB), **Dr. Luis Gustavo Modelli de Andrade** (Nefrologista do HCFMB) e **Professor Dr. Gustavo Pompermaier Garlet** (Professor Associado do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia USP/Bauru), pelo grande auxílio estatístico.

À **Dra. Marjorie Golim**, do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - HC-FMB.

Ao Laboratório da Unipex, na pessoa da **Dra. Maria Regina Moretto**.

Às secretárias da Pós Graduação, aqui representadas pela Sra. **Marcia Fonseca Piagentini Cruz**, pela disponibilidade e atenção costumeira.

Às secretárias do Departamento de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia - Divisão Urologia, **Andréa Garcia Chiamente** e **Gabriela Manoel de Melo**.

Aos **colegas e os professores** do Depto. Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia - **Divisão Urologia**, pelo suporte e alegrias no convívio durante todos esses anos.

## **EPÍGRAFE**

**Como você sobe a montanha é tão importante quanto como você desce a montanha, e assim é com a vida, que para muitos de nós se torna um teste gigantesco seguido por uma grande lição. No final, tudo se resume a uma palavra: gratidão. É como você aceita ganhar e perder, ter sorte ou azar, estar na luz ou estar na escuridão.**



## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A obesidade é um problema de saúde pública mundial devido às altas taxas de acometimento na população em geral. A obesidade acarreta distúrbios como aumento de processos inflamatórios, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alterações renais. É um fator de risco para os sintomas do trato urinário inferior (LUTS), como bexiga hiperativa e incontinência urinária e tem alta prevalência na população diminuindo a qualidade de vida dos pacientes. Embora abordagens clínicas tenham sido adotadas para o tratamento da obesidade, sabe-se que a ingestão do extrato do *Hibiscus sabdariffa* (HB) apresenta diversos benefícios à saúde e têm efeitos anti-obesogênicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar, utilizando um modelo experimental de obesidade, os efeitos protetores do chá de Hibisco (HB) na bexiga de ratos. **MÉTODOS:** Foram divididos de forma randômica, em quatro grupos experimentais, 48 ratos machos da linhagem *Wistar*: G1 (n=12), grupo controle onde os animais receberam dieta padrão e água *ad libitum*; G2 (n=12), grupo controle + chá de HB; G3 (n=12), grupo obesidade, no qual os animais receberam dieta hiperlipídica palatável (DPH) e água *ad libitum* e G4 (n=12), grupo obesidade + chá HB conforme especificado no grupo 2. Todos os animais foram avaliados semanalmente quanto ao peso corpóreo, diariamente em relação à ingestão de ração, água e chá de HB, de acordo com o grupo alocado. Após 16 semanas, foi realizada a eutanásia dos animais para avaliar: níveis de creatinina, citocinas inflamatórias, colesterol, triglicérides e eletrólitos, além da coleta da bexiga dos animais para análise histopatológica. **RESULTADOS:** O chá de HB foi capaz de diminuir as taxas de LDL e triglicérides no grupo G2. A leptina mostrou-se elevada nos grupos que receberam DPH. O chá de HB foi capaz de diminuir os níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 $\alpha$  nos grupos G2 e G4. Notório que no G4 os animais apresentaram uma diminuição da espessura das fibras musculares da bexiga em comparação ao grupo controle (G1) e houve um aumento significativo da

espessura das mesmas nos animais do grupo G3 em relação ao G4. Houve ainda um aumento de fibras de colágenos no grupo G4 quando comparado ao grupo G1. **CONCLUSÃO:** Pode-se ressaltar que o HB apresentou papel anti-inflamatório, foi capaz de reverter a lipidemia e reduzir os efeitos deletérios da obesidade na musculatura vesical.

**Palavras-chave:** Obesidade, *Hibiscus sabdariffa*, LUTS, DPH

# ABSTRACT

Obesity has become a worldwide problem due to the high rates of involvement in the world population. In addition to excess adipose tissue, obesity causes disorders such as increased inflammatory processes, type 2 diabetes, cardiovascular disease and kidney disorders. It is a factor for lower urinary tract symptoms (LUTS), such as overactive bladder and urinary incontinence, and has a high prevalence in the population, decreasing the quality of life of patients. Thus, complementary treatments present in patients' daily lives could contribute to current clinical treatments. The ingestion of *Hibiscus sabdariffa* (HB) extract has several health benefits and has anti-obesogenic effects. Therefore, the aim of the present study was to assess whether the different medicinal properties attributable to *Hibiscus sabdariffa* would be able to prevent or mitigate any adverse effects induced by obesity in these animals. For this, male *Wistar* rats (n=12) were submitted to four experimental conditions: G1, the group of control animals that received standard diet and water; G2, animals with standard diet and HB tea; G3, animals received a palatable high-fat diet (DPH) and water; and G4 received DPH diet and HB tea. The animals were monitored for body weight and HB feed, water and tea intake, according to the allocated group. After 16 weeks, the animals were euthanized and the levels of creatinine, inflammatory cytokines, testosterone, cholesterol, triglycerides and electrolytes were evaluated, in addition, histopathological analysis of the animals' bladder was performed. HB tea was able to decreased LDL and triglyceride levels in the G2 group. Leptin was shown to be elevated in the groups that received DPH. HB tea was able to decrease the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\alpha$  in groups G2 and G4. It is notable that in G4 the animals showed a decrease in the thickness of the bladder muscle fibers compared to the control group (G1) and there was a significant increase in the thickness in the animals of the G3 group in relation

to the G4. Furthermore, there was an increase in collagen fiber count in the G4 group when compared to the G1 group. Thus, we can emphasize that HB had an anti-inflammatory role and was also able to reverse lipidemic in blood of obese animals and reduce the deleterious effects of obesity on the bladder.

**Key-words:** obesity, *Hibiscus sabdariffa*, LUTS, DPH

# LISTA TABELA

<b>Tabela 1.</b> Classificação do estado nutricional de acordo com o IMC.....	10
<b>Tabela 2.</b> Valores do peso corporal (em gramas) dos animais, após exposição a diferentes condições experimentais, ao longo das 1 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup> , 8 <sup>a</sup> , 12 <sup>a</sup> e 16 <sup>a</sup> semanas.....	35
<b>Tabela 3.</b> Taxa de depuração da creatinina (mL/Kg/min) nos diferentes grupos experimentais após 16 semanas de experimento.....	36
<b>Tabela 4.</b> Valores dos eletrólitos séricos (mEq/L), nos diferentes grupos de estudo, ao final do experimento.....	37
<b>Tabela 5.</b> Análise do perfil lipídico sérico (mg/dL) nos animais, segundo diferentes grupos de estudo, ao final do experimento.....	38
<b>Tabela 6.</b> Mediana e valores mínimo e máximo das citocinas pró-inflamatórias (pg/mL) dosadas no plasma sanguíneo de ratos, segundo grupo de estudo.....	38
<b>Tabela 7.</b> Mediana de valores mínimo e máximo das citocinas anti-inflamatórias dosadas no plasma sanguíneo de ratos, segundo grupo de estudo.....	39
<b>Tabela 8.</b> Mediana e valores mínimo e máximo da fibra muscular ( $\mu\text{m}$ ) da bexiga dos animais.....	40
<b>Tabela 9.</b> Mediana de valores mínimo e máximo de presença de colágeno (%) na bexiga dos animais, segundo grupo de estudo.....	41
<b>Tabela 10.</b> Mediana e valores mínimo e máximo de presença de colágeno tipo I e tipo III (%) na bexiga dos animais.....	42

# LISTA DE ABREVIATURAS

CB	- Compostos bioativos
CCr	- <i>Clearence</i> de creatinina
Cr	- creatinina
DM	- Diabetes mellitus
DPH	- dieta palatável hiperlipídica
HB	- <i>Hibiscus sabdariffa</i>
HDL	- lipoproteína de alta densidade
HE	- Hematoxilina e eosina
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular-1
IFN- $\gamma$	- Interferon- $\gamma$
IL-10	- Interleucina-10
IL-12p70	- Interleucina-12p70
IL-6	- Interleucina-6
IM	- via intramuscular
IMC	- Índice de massa corpórea
IP	- via intraperitoneal
LDL	- lipoproteína de baixa densidade
LUTS:	- do inglês: <i>Lower urinary tract symptoms</i>
MCP-1	- Proteína quimioatraente de monócitos
MEC	- Matriz extracelular
PKC	- Proteína kinase C
PR	- pricossirius red
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
UNIPEX	- Unidade de Pesquisa Experimental
WHO	- <i>World Health Organization</i>

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama demonstrando os diferentes momentos e os parâmetros avaliados de acordo com grupo de estudo.....	24
<b>Figura 2.</b> Pellets da ração administradas aos animais. (A) Ração comercial Presence <sup>®</sup> (Purina) e (B) Pellet moldado da DPH após secagem.....	25
<b>Figura 3.</b> Detalhe do cálice desidratado de <i>Hibiscus sbdariffa</i> utilizado para preparação da infusão (chá).....	26
<b>Figura 4.</b> Gaiola metabólica para coleta de urina de 24 horas dos animais.....	28
<b>Figura 5.</b> Ilustração da punção cardíaca para coleta de sangue.....	29
<b>Figura 6.</b> Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-4 color <sup>®</sup> (BD).....	30
<b>Figura 7.</b> Scanner Aperio, da marca LEICA.....	31
<b>Figura 8.</b> Fibras colágenas coradas com Picrossirius. (A)Fibras coradas em vermelho e rosa indicam colágeno tipo I (maduro) e (B) fibras coradas em amarelo e verde indicam colágeno do tipo III (imaturo). Aumento 20x. *indica regiões da mucosa da bexiga.....	32
<b>Figura 9. A:</b> Medida de fibra muscular da bexiga de ratos que receberam DPH (G3). <b>B:</b> Medida de fibra muscular da bexiga de ratos que receberam DPH + chá de hibisco (G4). Ambas imagens apresentam coloração HE e aumento 20x. ....	40

# LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Distribuição comparativa em “box-whisker plots” das fibras musculares ( $\mu\text{M}$ ) corada pelo HE.....41

**Gráfico 2.** Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade, em porcentagem, de fibras de colágeno corada pelo Picrosirius.....42

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Obesidade e disfunções metabólicas: o mal do século XXI .....	11
1.1 O chá de <i>Hibiscus sabdariffa</i> como alternativa contra obesidade .	12
1.2 Efeito da obesidade no trato urinário inferior .....	14
2. HIPÓTESE .....	18
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo geral: .....	20
3.2 Objetivos específicos: .....	20
Estudar o efeito protetor do chá de Hibisco, em ratos obesos, avaliando:	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Local da pesquisa.....	22
4.2. Animais de experimentação.....	22
4.3. Grupos Experimentais.....	23
4.4. Delineamento do estudo e sequência experimental .....	23
4.5. Preparo da dieta palatável hiperlipídica (DPH) .....	24
4.6. Validação e preparo do chá de Hibisco ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ) .....	25
4.7. Anestesia geral .....	26
4.8. Eutanásia .....	27
4.9. Parâmetro avaliados.....	27
4.10 Análise estatística .....	32
5. Resultados.....	35

5.1.	Avaliação do ganho de peso dos animais .....	35
5.2.	Monitorização da ingestão de sólidos e líquidos .....	36
5.3.	<i>Clearance</i> de Creatinina (CCr) em urina de 24 horas.....	36
5.4.	Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos .....	36
5.5.	Avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias .....	38
5.6.	Avaliação histológica da Bexiga.....	40
6.	DISCUSSÃO .....	45
7.	CONCLUSÃO.....	51
8.	REFERÊNCIAS .....	53

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Obesidade e disfunções metabólicas: o mal do século XXI

Estudos recentes indicam que o sobrepeso e a obesidade continuam aumentando de maneira implacável, atingindo um número expressivo de pessoas podendo atingir mais de 2 bilhões da população mundial (CABALLERO, 2019b). Alguns autores consideram baixa a probabilidade de atingir a meta global na diminuição dos índices da obesidade (WHO, 2013; (MCGUIRE, 2016).

A obesidade é uma doença multifatorial influenciada por fatores ambientais, genéticos e comportamentais (HOWE et al., 2013), caracterizada pelo excesso de gordura corpórea, podendo ser desencadeada por erros no metabolismo e/ou na utilização dos nutrientes, ou ainda, por balanço energético positivo. Este pode ocorrer quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, resultando em aumento dos estoques de energia e do peso corporal (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

Em 1998, o relatório anual da WHO (*World Health Organization*) relatou a obesidade como uma “epidemia”, mostrando que o índice de massa corpórea (IMC) aumentou progressivamente nos últimos 300 anos. Como resultado da relação peso e altura, o IMC ajuda a classificar o excesso de peso, conforme demonstrado na tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação do estado nutricional de acordo com o IMC.

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	CLASSIFICAÇÃO
18,5-24,9	Eutrofia
25-29,9	Sobrepeso
>=30	Obesidade

Fonte: WHO, 1998.

Embora o aumento do IMC não possua relação linear com as comorbidades, a obesidade pode estar associada ao aumento na incidência de doenças secundárias como diabetes do tipo 2, hipertensão arterial, doenças cardíacas, hepáticas e renais (CABALLERO, 2019; SEGAL; RAYBURN; MARTIN, 2016). Os principais fatores estão relacionados com o estilo de vida (dieta e sedentarismo), alterações genéticas, e fatores psicológicos. O balanço entre energia consumida e gasta também pode causar um acúmulo de tecido adiposo (LEE et al., 2017)

Obesidade não está relacionada apenas à quantidade de tecido adiposo, mas também a alterações na função dos adipócitos, como a função endócrina com a produção de interleucinas pró inflamatórias, aumentando assim, o processo inflamatório tecidual (HOWE et al., 2013). Evidências sugerem que esta inflamação crônica caracteriza a síndrome metabólica causada pelo excesso de peso e que podem estar associadas com dislipidemias e doenças cardiovasculares (HSU; YEN, 2008; ZEYDA; STULNIG, 2009).

Várias abordagens podem ser utilizadas para o tratamento da obesidade, dentre elas terapias clínicas que incluam mudanças nos hábitos de vida como exercícios rotineiros, restrição calórica e alimentação saudável. A abordagem farmacológica, com uso de drogas que auxiliam na perda de peso, também podem ser utilizadas quando as intervenções anteriores não forem suficientes. Entretanto, muitas das abordagens empregadas acabam não tendo resultados duradouros, fazendo com que o paciente apresente recidiva no aumento do peso e no quadro de obesidade (ANNAMALAI et al., 2016).

### **1.1 O chá de *Hibiscus sabdariffa* como alternativa contra obesidade**

Neste cenário, a descoberta e o estudo de compostos naturais, principalmente os originários de plantas, parecem ser uma opção atraente. Uma variedade de fitoterápicos foram estudados e são descritos como capazes de prevenir e induzir a perda de peso corporal, fazendo que seu uso informal

seja amplamente divulgado (RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008).

Compostos bioativos (CB) naturais, como fenóis e flavonoides, tem sido reportados na literatura como sendo efetivos para o tratamento contra obesidade (BANU; PANDIAN, 2007; PAN et al., 2016; RAHMAN et al., 2017; TORRES-FUENTES et al., 2015). CB extraídos de plantas comestíveis, como as antocianinas do *Hibiscus sabdariffa* (HB), apresentam potencial anti-obesidade tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (ALARCON-AGUILAR et al., 2007; CARVAJAL-ZARRABAL et al., 2009; HUANG et al., 2015; KAO et al., 2016; KIM et al., 2007). O HB, planta da família *Malvaceae*, proveniente da Índia, Malásia e África, que apresenta amplo crescimento em trópicos (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009) é conhecido popularmente em muitos países, e podem ser utilizado com fins decorativos ou ter suas sementes e cálices utilizados no consumo humano, na maioria das vezes como infusões, consumido como chás (RIAZ; CHOPRA, 2018b). Tem uma longa história na medicina popular destes países (ALI et al., 2017; DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; TZU LI et al., 2007).

Estudos das propriedades fotoquímicas do HB mostraram vários benefícios, podendo ser usado como uma potencial terapia de várias doenças (MOYANO et al., 2016; RIAZ; CHOPRA, 2018a). Os principais CB presentes no extrato aquoso do hibiscos são flavonoides, ácido clorogênico, glossupetina, hibiscetina, fenóis e ácidos fenólicos e antocianinas (HE; GIUSTI, 2010); além de vitamina C, beta-caroteno, licopeno e outros antioxidantes solúveis em água (WANG et al., 2011; WONG et al., 2002), cujo método mais eficaz para sua extração é o uso de água quente.

As antocianinas são compostos polifenólicos que apresentam atividade antioxidante e conferem proteção contra o estresse oxidativo, além de ser anti-inflamatório e anti-carcinogênico, podendo controlar a diabetes, a obesidade e prevenir doenças cardiovasculares (AMOS et al., 2008; DARWISH et al., 2002; HERRERA-ARELLANO et al., 2007; HIRUNPANICH et al., 2006; ODIGIE; ETTARH; ADIGUN, 2003; PÉREZ-TORRES et al., 2013; TSENG et al., 2000; WANG et al., 2011). Diversos

estudos demonstram atividade hipolipemiante do hibisco seja no homem (GURROLA-DÍAZ et al., 2010; LIN et al., 2007; MOZAFFARI-KHOSRAVI et al., 2009), em ratos (FAROMBI; IGE, 2007; OCHANI; D’MELLO, 2009) ou coelhos (CHEN et al., 2003).

Assim, vários são os benefícios do chá de Hibiscus, seja promovendo perda de peso, seja na proteção contra as comorbidades advindas da obesidade (OCHANI; D’MELLO, 2009).

## **1.2 Efeito da obesidade no trato urinário inferior**

Associado ao aumento dramático na incidência da obesidade e da síndrome metabólica, houve também um aumento paralelo nas complicações urológicas (MOUL; MCVARY, 2010). Tais condições são fatores de risco para sintomas do trato urinário inferior (LUTS, do inglês *Lower urinary tract symptoms*), incluindo bexiga hiperativa e incontinência urinária (KIRBY et al., 2010; LAVEN et al., 2008; RICHTER et al., 2010a), podendo ainda apresentar outras patologias renais e infertilidade (LLEWELLYN et al., 2016; MYDLO, 2004; ULRIK, 2015). Um amplo estudo populacional, envolvendo mais de 50 mil homens com idade entre 40 e 70 anos, com seguimento de aproximadamente 16 anos, demonstrou que o aumento de peso e a adiposidade localizada (mensurado pelo IMC, medida da cintura e quadril) estão amplamente relacionadas com a incidência maior de LUTS (MONDUL; E; EA, 2014) e ainda, com o risco de progressão dos sintomas urinários (ALBAYRAK; SEREFOGLU, 2019).

LUTS é considerado a complicação mais comum em cerca de 80 a 90% dos pacientes com diabetes mellitus (DM) (DANESHGARI; LIU; HANNA-MITCHELL, 2017; GOMEZ; KANAGARAJAH; GOUSSE, 2011), relacionado com a cistopatia diabética caracterizada pela redução da sensibilidade vesical, perda da contratilidade detrusora efetiva e aumento do resíduo pós miccional. A obesidade pode estar associada ainda com aumento da bexiga hiperativa e incontinência urinária (BROWN et al., 2005; LIFFORD et al., 2005).

A bexiga hiperativa é uma condição altamente prevalente que afeta milhões de pessoas em todo o mundo apresentando impacto profundo na qualidade de vida e aumentos consideráveis para os cuidados com a saúde. Os resultados do 3º *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III) mostraram que um aumento no IMC em pessoas com mais de 25 anos de idade está relacionado com LUTS. Demonstraram ainda que homens com circunferência abdominal maior que 102 cm estão mais propensos a exibir sintomas urinários tais como hesitação miccional, diminuição da força do jato urinário, sensação de esvaziamento vesical incompleto, polaciúria e noctúria (ROHRMANN et al., 2005).

No entanto, poucos estudos exploraram os mecanismos envolvidos nesta disfunção vesical. O processo de micção é complexo em vários níveis, envolvendo vias como cérebro, cordão espinal, sistema nervoso periférico e é mediado por muitos neurotransmissores. Dessa forma, distúrbios em qualquer ponto dessas vias podem levar a perda de controle nas funções urinárias. Sabe-se ainda que a obesidade e o consumo de dietas com altos níveis de gordura e açúcar podem afetar os mecanismos envolvidos na fisiologia do músculo detrusor da bexiga (BOLAT et al., 2017).

Os autores que estudam a associação entre a obesidade e a disfunção vesical observaram alterações fisiológicas não relacionadas a alterações morfológica do detrusor. Entretanto, alguns autores têm demonstrado que os níveis de colágenos da parede vesical podem estar relacionados com a homeostase e funcionamento adequado do músculo detrusor (SOUZA et al., 2019).

Evidências recentes associam a patogênese da obesidade a um estado inflamatório sistêmico de baixa intensidade, que é caracterizado pelo aumento dos níveis circulantes de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como: Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral (TNF), entre outros (ROHRMANN et al., 2005). Este processo inflamatório crônico poderia, eventualmente, resultar em alterações vesicais funcionais e ou morfológicas justificando assim a sintomatologia observada nestes pacientes.

Outra possibilidade seria a associação do aumento do tecido adiposo corporal com a redução do volume e da espessura da camada muscular da bexiga (FRY et al., 2003), que poderia estar relacionado com aumento da fibrose intersticial da camada muscular do detrusor ocasionando alteração em sua contratilidade (AZADZOI et al., 1999). Autores tem descrito que na bexiga hiperativa pode ocorrer alterações morfológicas na parede vesical com hipertrofia progressiva desta musculatura e, ainda, com mudanças na relação dos seus componentes como colágeno e fibras elásticas (EWALT et al., 1992; RUBINSTEIN; SAMPAIO; COSTA, 2007; UVELIUS; MATTIASSON, 1984). Considerando-se a possibilidade desta associação, poderíamos inferir que o controle da obesidade acarretaria em uma melhora nos sintomas associados às disfunções vesicais em pacientes obesos.

Existe uma lacuna na literatura de estudos controlados que possam relacionar as alterações estruturais do detrusor ocasionadas pela obesidade/síndrome metabólica e sua relação possível com sintomas de LUTS.

HIPÓTESE

## **2. HIPÓTESE**

Tentar comprovar se a utilização de uma suplementação alimentar com dieta palatável hiperlipídica (DPH) em ratos, será capaz produzir um modelo experimental de obesidade, permitindo assim, de modo controlado, avaliar os parâmetros inflamatórios, bioquímicos de animais com obesidade. Analisar ainda se as propriedades anti-inflamatórias e hipolipemiantes do chá de Hibisco apresentam algum fator protetor contra a eventual ocorrência de alterações histopatológicas do detrusor neste modelo animal.

Até o presente momento, não foram evidenciados estudos que avaliem os efeitos protetores do chá hibisco nos parâmetros laboratoriais e histopatológicos da bexiga de animais com obesidade.

## **OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos das propriedades medicinais atribuíveis ao *Hibiscus sabdariffa* em ratos obesos.

#### 3.2 Objetivos específicos:

**Estudar o efeito protetor do chá de Hibisco, em ratos obesos, avaliando:**

- Os Parâmetros séricos como creatinina, perfil lipídico e eletrolítico;
- O perfil inflamatório através da mensuração das citocinas pró-inflamatórias (Leptina, IL-1 $\alpha$  e a IL-8) e anti-inflamatórias (adiponectina e IL-4);
- As possíveis alterações histológicas na bexiga destes animais.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. 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 deste estudo.

Trata-se de um projeto conjunto envolvendo o Serviço 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: “EFEITO PROTETOR DO CHÁ DE HIBISCO NAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA BEXIGA DE RATOS OBESOS” (Certificado nº 1238/2017 – CEUA) (ANEXO1).

### 4.2. 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 condicionados 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.

### **4.3. Grupos Experimentais**

Quarenta e oito animais foram randomicamente divididos em quatro grupos assim constituídos:

- Grupo CONTROLE (G1) (n=12): animais alimentados com ração comercial para ratos (Presence<sup>®</sup>, Purina) e ingestão de água;
- Grupo CONTROLE+CHÁ DE HIBISCO (G2) (n=12): animais alimentados com dieta comercial para ratos (Presence<sup>®</sup>, Purina) e ingestão de chá de hibisco;
- Grupo OBESO (G3) (n=12): animais alimentados com dieta palatável hiperlipídica (DPH) e ingestão de água;
- Grupo OBESO + CHÁ DE HIBISCO (G4) (n=12): 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).

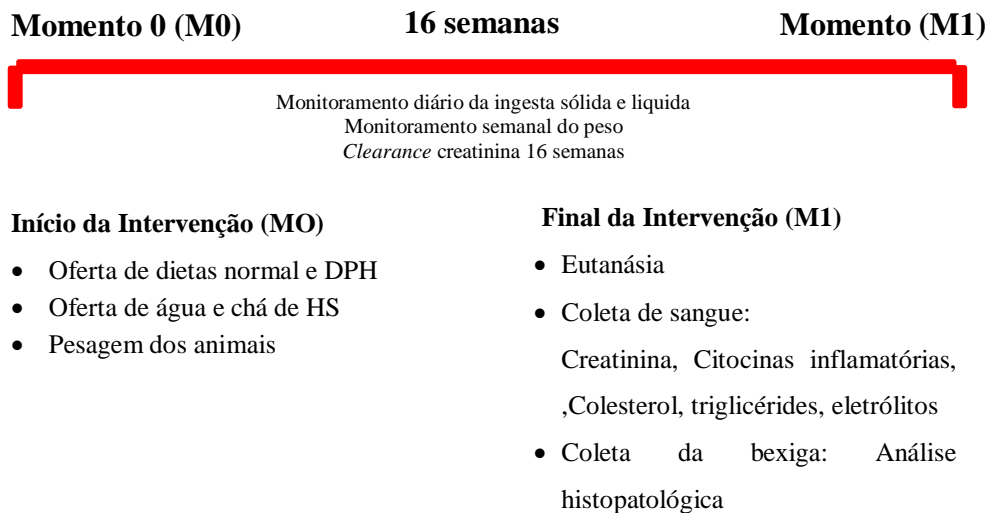
### **4.4. Delineamento do estudo e sequência experimental**

Os animais foram condicionados 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 de hibisco ou água) de acordo com os grupos previamente estabelecidos, os animais tiveram seus consumos monitorados diariamente e os pesos avaliados semanalmente. Ao final de 16 semanas, após sedação e anestesia, os animais foram submetidos a eutanásia para coleta de amostras de sangue e tecido (bexiga) para realização das dosagens das citocinas pró e anti-inflamatórias, função renal, perfis lipídico e eletrolítico, COLETA da análise histopatológica da bexiga (**Figura 1**).

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



**Figura 1.** Diagrama demonstrando os diferentes momentos e os parâmetros avaliados de acordo com grupo de estudo.

#### **4.5. Preparo da dieta palatável hiperlipídica (DPH)**

A DPH ou dieta de cafeteria utilizada foi a padronizada por Estadella *et al.* (2004) e consistiu em uma mistura hipercalórica, normoproteica e

hiperlipídica contendo ração comercial Presence, Purina® (**Figura 2A**), 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 2**) que, após secagem, foi armazenada sob refrigeração. A DPH foi preparada semanalmente.



**Figura 2.** Pellets da ração administradas aos animais. (A) Ração comercial Presence® (Purina) e (B) Pellet moldado da DPH após secagem.

#### **4.6. 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 3**). Todos os chás adquiridos pertenciam ao mesmo lote comercial.



**Figura 3:** Detalhe do cálice desidratado de *Hibiscus sabdariffa* 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 *et al.* (2010). Em suma, o preparo envolveu a adição de 240 mililitros de água quente a 60°C em 1,25 gramas de chá de HS (60mg/Kg/dia). A mistura permaneceu sob infusão durante seis minutos. Após este tempo o chá foi coado e resfriado 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.

#### **4.7. Anestesia geral**

Ao final das 16 semanas, 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.

#### **4.8. Eutanásia**

Após anestesia geral, o sangue foi coletado e a eutanásia dos animais foi realizada utilizando-se o triplo da dose do anestésico 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 da bexiga.

#### **4.9. Parâmetro avaliados**

##### **a) Avaliação do peso corpóreo**

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).

##### **b) Ingestão alimentar de sólidos e líquidos**

A medição 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.

### c) Clearance de Creatinina em urina de 24 horas

Na décima sexta semana de experimentação, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina durante o período de 24 horas (**Figura 4**).



**Figura 4:** Gaiola metabólica para coleta da urina de 24 horas dos animais.

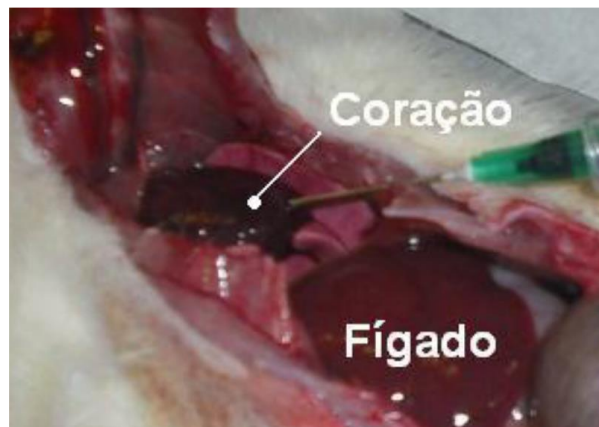
A depuração da creatinina (*Clearance* de creatinina - Ccr) foi calculada a partir fórmula transcrita a seguir (KEENAN et al., 2000), sendo seu resultado final expresso em mililitros/minuto/quilo de peso (mL/min/Kg). Para este cálculo foram utilizados os valores da creatinina sérica obtida no momento 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.

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

(mL/Kg/min)

#### d) Coleta de sangue

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 5**). 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 rpm por 15 minutos. O soro resultante deste processo foi identificado e congelado, sendo mantido a  $-180^{\circ}\text{C}$  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 5:** Ilustração da punção cardíaca para coleta de sangue.

Tal amostra se destinou à mensuração das citocinas inflamatórias; creatinina para cálculo do *Clearence* de Creatinina; 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 ELISA (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 Cytometric Bead Array® utilizando kits CBA Rat Soluble Protein – Flex Set, de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 50 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de plasma de cada animal para detecção simultânea das proteínas solúveis. Neste imuno ensaio 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. Foi utilizado equipamento modelo FACSCalibur-4 color® (BD) para as aquisições da citometria de fluxo e foram analisadas no software BD FCAPArray® (**Figura 6**). Os resultados foram expressos em picogramas por mililitros (pg/mL).



**Figura 6:** Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-4 color® (BD).

#### **e) Processamento histopatológico da bexiga**

Após a extração cirúrgica, a bexiga foi fixada em formaldeído 10% tamponado durante 24h. Posteriormente, mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão em parafina.

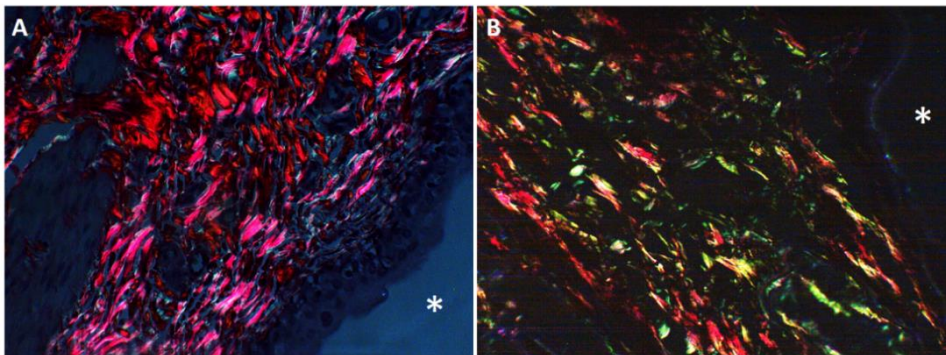
Os blocos de parafina com tecido de bexiga foram seccionados com espessura de 5  $\mu\text{m}$ , obtendo secções transversais da parede da bexiga, as quais foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e *Picrosirius red* (PR) para avaliação das fibras musculares e de colágeno, respectivamente. Após secção da bexiga e fixação da lâmina em HE, as imagens foram escaneadas utilizando-se o *scanner* Aperio, da marca LEICA® e as imagens avaliadas de maneira cega por um patologista experiente que, utilizando microscopia óptica sob aumento de 40 vezes, mensurou os grupamentos de camada muscular presentes em cada lâmina. A medida transversal da fibra muscular ( $\mu\text{m}$ ) foi realizada em cinco campos randomizados utilizando o programa de morfometria Aperio Imagescope® (**Figura 7**).



**Figura 7.** *Scanner* Aperio, da marca LEICA®

Para a avaliação morfológica do tecido conjuntivo, as lâminas foram coradas em kit comercial (Histokit™, Easypath, SP, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram examinadas com aumento de 20 vezes em microscopia óptica com luz polarizada (Axio Imager, Zeiss®),

Alemanha). As fibras de colágeno que apresentaram birrefringência vermelho-laranja foram consideradas do tipo I, enquanto as fibras de colágeno com birrefringência verde foram interpretadas como do tipo III (RICHTER et al., 2010b). A avaliação foi realizada de maneira cega por um patologista experiente que mensurou a porcentagem média de colágeno total, tipo I e III em três campos randomizados utilizando o programa de morfometria Pro-Image Plus® configurado com os seguintes parâmetros: HSB, dark background, Hue (121-179), Saturation (20-255) and Brightness (90-181) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Fibras colágenas coradas com Picrosirius. (A)Fibras coradas em vermelho e rosa indicam colágeno tipo I (maduro) e (B) fibras coradas em amarelo e verde indicam colágeno do tipo III (imaturo). Aumento 20x. \*indica regiões da mucosa da bexiga.

#### 4.10 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, teste e análises morfológicas 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.

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação do ganho de peso dos animais

As medidas do peso corporal, realizada na primeira semana do experimento, não demonstraram diferença significativa do peso corporal entre os grupos, demonstrando uma homogeneidade nos diferentes grupos. De maneira geral, a análise do peso corporal revelou que todos os grupos nos diferentes momentos apresentaram progressivo ganho de peso. Entretanto, a partir da quarta semana este ganho de peso foi significativamente maior nos grupos G3 e G4 quando comparados aos grupos controles.

Notamos ainda, que a partir da décima segunda semana, somente no grupo G3 (controle Obeso) observou-se um aumento significativo de ganho de peso em relação a 16<sup>a</sup> semana. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos G3 e G4 nos diferentes momentos.

Os dados estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2:** Valores do peso corporal (em gramas) dos animais, após exposição a diferentes condições experimentais, ao longo das 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semanas.

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

Valores são expressos em média ± desvio padrão. 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 da ingestão de sólidos e líquidos

Avaliando-se a monitorização da ingestão de ração realizada diariamente, observou-se que os grupos controles, G1 e G2, apresentaram, em média, um consumo de ração significativamente maior em relação aos grupos com dieta suplementada, G3 e G4 ( $27,6 \pm 1,8g$ ,  $25,8 \pm 2,1g$  Vs.  $21,4 \pm 2,4$ ,  $21,3 \pm 3,2$ ,  $p < 0,05$  respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa nem entre os grupos controles (G1 e G2) e, nem entre os entre os grupos com dietas suplementas (G3 e G4).

Com relação à avaliação da ingestão de líquidos, não houve diferença estatística no volume de líquidos ingeridos (chá de HS ou água) entre os grupos nos diferentes momentos.

## 5.3. Clearance de Creatinina (CCr) em urina de 24 horas

A taxa de depuração da creatinina na urina de 24 horas, avaliada ao final do estudo (16<sup>a</sup> semana), mostrou uma diminuição significativa no grupo G3 (controle obeso) em relação aos Grupos controles (G1 e G2). Salientamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo G4 (DPH + Chá de Hibisco) e os grupos controles (G1 e G2) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Taxa de depuração da creatinina (mL/Kg/min) nos diferentes grupos experimentais após 16 semanas de experimento.

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
CCr	2,69±1,3	2,66±1,5	1,34±0,83*	1,89±0,89

Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05 = G3X G1, G2$

## 5.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos

**a) Avaliação dos eletrólitos séricos**

Os níveis séricos de sódio foram significativamente maiores no Grupo G4 (DPH + chá de Hibisco) em relação aos grupos G1 (controle) e G3 (DPH). Não houve diferença estatisticamente significativa dos demais eletrólitos nos diferentes grupos (Tabela 4).

**Tabela 4:** Valores dos eletrólitos séricos (mEq/L), nos diferentes grupos de estudo, ao final do experimento.

Parâmetros séricos	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Cálcio	8,35±0,71	8,38±0,73	8,42±0,37	8,32±0,33
Sódio	138,23±2,55 <sup>#</sup>	139,77±3,90	137,92±2,25 <sup>##</sup>	142,15±1,91
Potássio	5,22±1,82	4,35±0,63	4,65±0,95	4,45±0,40

<sup>#</sup> p<0,05:G1XG2,G4; <sup>##</sup> p<0,05:G3XG4

**b) Avaliação do perfil lipídico no momento final**

Na análise do colesterol total, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos (Tabela 5). Notamos uma redução significativa na fração HDL do colesterol no Grupo G3 (DPH) comparado aos Grupos G1 (controle) e G2 (controle + chá de hibisco), não houve diferença entre os demais grupos.

Observamos que a fração LDL do colesterol foi significativamente menor no grupo G2 (controle + chá de hibisco) em relação ao grupo controle (G1) e G3 (DPH). Notamos ainda, uma redução significativa do LDL nos animais obesos que receberam chá de hibisco (G4) em relação aos que não receberam (G3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G2 (controle + chá de hibisco) e G4 (DPH + chá de hibisco).

No grupo controle (G2), que recebeu chá de hibisco, houve uma redução significativa nos níveis de triglicerídeos em relação aos demais grupos.

Os dados sobre perfil lipídicos estão expostos na tabela 5.

**Tabela 5:** Análise do perfil lipídico sérico (mg/dL) nos animais, segundo diferentes grupos de estudo, ao final do experimento.

Parâmetros séricos	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
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 <sup>#</sup>	7,31±2,29	5,62±1,19 <sup>##</sup>
Triglicérides	83,23±34,11	46,31±15,35 <sup>&amp;</sup>	86,77±36,55	84,08±32,44

\*p<0,05: G3XG1,G2    #p<0,05 G2XG1,G3    ##p<0,05 G4XG3    &p<0,05: G2XG1,G3,G4

## 5.5. Avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias

### a) Citocinas pró-inflamatórias

A dosagem da leptina foi significativamente maior nos grupos G3 (DPH) e G4 (DPH + chá de hibisco) em relação ao Grupos controles (G1 e G2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2 (Tabela 6).

Com relação à análise dos níveis séricos da IL-1 $\alpha$ , foi significativamente menor no grupo G4 (DPH + chá de Hibisco) comparado aos demais grupos. Observamos ainda, que houve uma diminuição significativa do IL-1 $\alpha$  no grupo controle e chá de hibisco (G2) comparado aos G1 (controle) e G3 (DPH) (Tabela 6).

Na IL-8 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabela 6).

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

Citocinas	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 $\alpha$	17,90 ( 2,87-23,09 )	6,74& ( 3,61-28,88 )	16,98 ( 9,83-26,33 )	0,91¥ (0,00 - 23,25)
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      G1=G2      &p<0,05:G2XG1,G3      G2=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 houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabela 7).

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

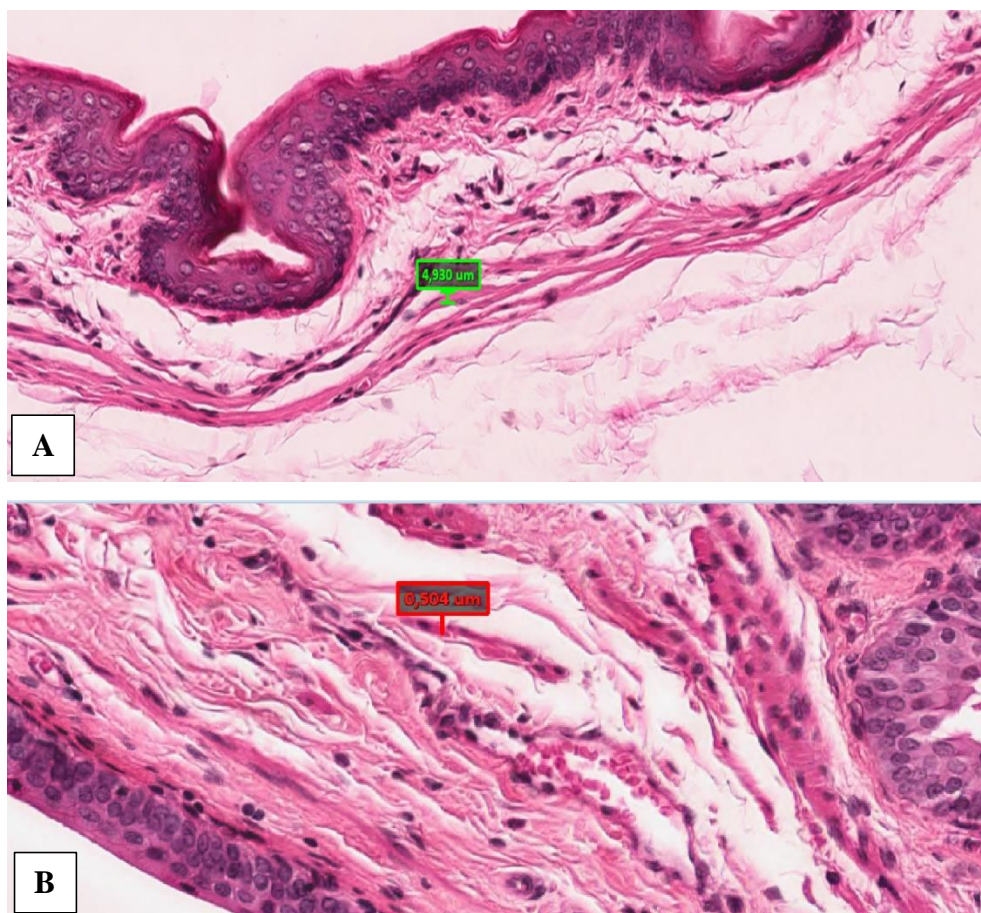
Citocina	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Adiponectina (ng/mL)	4278,41 (3057,7;7048,7)	3758,30 (2726,2;7158,4)	5198,72 (3666,2;7695,6)	4431,357 (3480,9;6748,4)
IL-4 (pg/mL)	3,10 (0,0;14,4)	4,28 (0,8;11,4)	5,09 (1,4;9,9)	6,20 (0,9;15,0)

p> 0,05

## 5.6. Avaliação histológica da Bexiga

### a) Avaliação muscular da bexiga

Nos animais que receberam suplementação e chá de hibisco (G4) observou-se uma diminuição significativa da espessura das fibras da camada muscular da bexiga em comparação ao grupo controle (G1). Houve ainda um aumento significativo da espessura das fibras da camada muscular nos animais do grupo G3 (DPH) em relação ao G4 (DPH + chá de hibisco) (Figura 9, tabela 8 e gráfico 1).

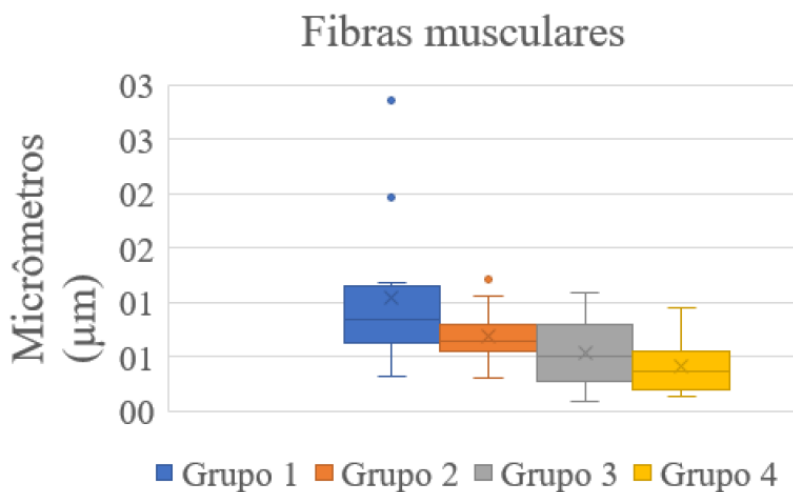


**Figura 9. A:** Medida de fibra muscular da bexiga de ratos que receberam DPH (G3). **B:** Medida de fibra muscular da bexiga de ratos que receberam DPH + chá de hibisco (G4). Ambas imagens apresentam coloração HE e aumento 20x.

**Tabela 8.** Mediana e valores mínimo e máximo da fibra muscular ( $\mu\text{m}$ ) da bexiga dos animais.

	Grupos				Valor de $p$
	G1	G2	G3	G4	
<b>Músculo detrusor (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0,84 (0,62 – 1,15) <sup>ab</sup>	0,64 (0,54 – 0,80) <sup>bc</sup>	0,50 (0,28 – 0,79) <sup>ab</sup>	0,36 (0,19 – 0,54) <sup>c</sup>	0,006

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas.



**Gráfico 1.** Distribuição comparativa em “box-whisker plots” das fibras musculares ( $\mu\text{M}$ ) corada pelo HE.

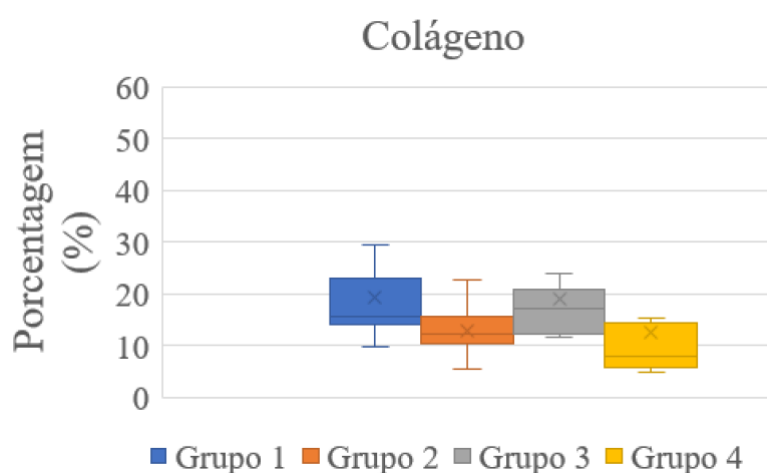
### *b) Avaliação do colágeno*

Observamos uma diminuição significativa do colágeno total no grupo de animais obesos que ingeriram chá de hibisco (G4) em relação aos grupos controle (G1) e obeso (G3). (Tabela 9 e gráfico 2).

**Tabela 9.** Mediana de valores mínimo e máximo de presença de colágeno (%) na bexiga dos animais, segundo grupo de estudo.

GRUPOS				
	G1	G2	G3	G4
<b>Colágeno</b>	15,67	11,72	17,38	7,93
<b>(%)</b>	(14,12–23,10) <sup>ab</sup>	(9,70 -15,27) <sup>bc</sup>	(12,16 – 22,40) <sup>ab</sup>	(5,79 – 14,53) <sup>c</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ).



**Gráfico 2.** Distribuição comparativa em “box-whisker plots” da quantidade, em porcentagem, de fibras totais de colágeno corada pelo Picrosirius.

### *c) Avaliação tipos de colágeno*

Em relação aos colágenos I e III não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabela 10).

**Tabela 10.** Mediana e valores mínimo e máximo de presença de colágeno tipo I e tipo III (%) na bexiga dos animais.

	Grupos				Valor de p
	G1	G2	G3	G4	
<b>Colágeno</b>	0,8	0,7	0,8	0,8	0,46
<b>Tipo I (%)</b>	(0,50 – 0,85)	(0,60 – 0,85)	(0,60 – 1,0)	(0,70 – 0,90)	
<b>Colágeno</b>	0,2	0,3	0,2	0,2	0,46
<b>tipo III (%)</b>	(0,15 – 0,50)	(0,15 – 0,40)	(0,0 – 0,40)	(0,10 – 0,30)	

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, tivemos uma distribuição homogênea em relação ao peso corporal entre os grupos, tendo em vista que na primeira semana não notamos diferença estatisticamente significativa entre os diferentes animais distribuídos (Tabela 2). Salientamos ainda, que os grupos com dieta hiperlipídica e hipercalórica (G3 e G4) tiveram um consumo médio diário de ração significativamente menor em relação aos grupos controles (Tabela 2). Entretanto, a partir da quarta semana o ganho de peso foi significativamente maior nos grupos (G3 e G4) quando comparados aos controles (Tabela 2). Demonstrando que apesar da menor ingestão nos grupos com dieta hiperlipídica, o valor calórico ingerido foi suficiente para induzir um modelo adequado de obesidade em ratos, e ainda, este fato pode ser explicado pela maior sensação de saciedade nestes animais dos grupos G3 e G4. Estes achados estão de acordo com outros autores (JAGADEESHWAR et al., 2021; KRETSCHMER et al., 2005; YANG et al., 2019), que relataram um aumento no ganho de peso e um menor consumo nos animais com ração hiperlipídica.

Analisando o ganho de peso na 16<sup>o</sup> semana, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos G3 e G4, apesar de uma queda numérica no grupo suplementado com chá de hibisco. Demonstrando assim, que o chá de hibisco não teve uma ação relevante em relação à proteção contra a obesidade neste experimento. Este fato está em desacordo ao descrito por outros autores (Alarcon-Aguillar et al., 2007). Entretanto, levando-se em consideração que no grupo G4 não houve um ganho de peso significativo na 16<sup>a</sup> semana em relação ao momento anterior. Este fato, aliado ainda à queda em número absoluto no peso no grupo 4, pode sugerir um efeito protetor do chá de hibisco no controle da obesidade. Assim, estudos controlados com uma amostra maior e um seguimento superior a 16 semanas, poderia elucidar este problema.

Outro achado relevante foi que o *clearance* de Cr foi significativamente menor no grupo com obesidade (G3) em relação aos controles (G1 e G2), e

ainda, não houve diferença significativa entre os animais suplementados com chá de hibisco (G4) e os grupos controles. Este achado demonstra o efeito nefroprotetor do HS, corroborando com trabalhos anteriores (IBRAHIM; ALBADANI, 2014; O. AJANI et al., 2021; RODRÍGUEZ-FIERROS et al., 2021), que demonstram que a obesidade e síndrome metabólica podem ter uma ação deletéria na função renal.

A dosagem do sódio, nos animais que receberam chá de hibisco (G2 e G4), foi significativamente maior em comparação ao controle, e ainda, houve um aumento significativo deste íon entre os ratos obesos suplementados com chá de hibisco em relação aos que não receberam. Demonstrando assim, um aumento do sódio nos grupos que receberam HS, podendo ser relacionado à concentração elevada deste mineral na composição deste chá, conforme descrito por outros autores (NZIKOU; MATOS, 2011). Este fato pode ter importância no caso de comorbidade associado à obesidade como a hipertensão arterial. Porém, até o momento, existe uma falta de evidências na literatura que apoiem nossos resultados. A dosagem dos demais eletrólitos séricos nos animais não revelou variações significativas nos diferentes grupos.

Observamos, no grupo G3 (obesos), uma redução significativa da fração HDL em comparação aos grupos controles (G1 e G2). Apesar de não termos notado esta mesma redução quando comparados os controles com e sem suplementação do chá de hibisco, e nem quando comparados os animais obesos (G3 vs. G4), parece ter havido um efeito protetor do chá de hibisco nos animais obesos (G3), se levarmos em consideração que esta fração do colesterol protegeria contra possíveis doenças vasculares.

Em relação à fração deletéria do colesterol, o LDL, observamos uma diminuição significativa no controle com chá de hibisco (G2) em relação ao controle (G1) e obeso (G3), e ainda, entre obesos com suplementação de HS (G4) em comparação aos sem (G3). Estes fatos demonstram, mais uma vez, o efeito protetor do HS na obesidade. Tais achados foram semelhantes aos encontrados em outros estudos (CHEN, 2003), reforçando assim este efeito.

Em nossa série, os animais que receberam chá de hibisco associado à

dieta normal (G2) apresentaram uma redução significativa dos níveis de TG em relação aos demais grupos. Estes resultados sugerem que além de auxiliar no controle da dislipidemia em ratos obesos, o uso do chá de hibisco poderia beneficiar também animais com quadros dislipidêmicos não associados à obesidade. Em humanos, o HS também apresentou ação hipolipemiante em indivíduos com síndrome metabólica, evidenciando redução nos níveis de glicemia, colesterol total, triglicérides e aumento de HDL, através da inibição da lipase pancreática e redução da absorção intestinal de lipídeos (SUN; WU; CHAU, 2016).

Nas interleucinas pró inflamatórias, observamos que os animais obesos (G3 e G4) apresentaram uma elevação significativa da leptina quando comparados ao controle (G1), demonstrando que a dieta rica em gordura foi capaz de interferir na fisiologia do tecido adiposo, alterando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Observamos ainda, uma diminuição da leptina, em número absoluto, do grupo obeso com chá de hibisco em relação ao sem suplementação. Notamos uma diminuição significativa da IL-1 $\alpha$  nos animais obesos com chá de hibisco em relação ao demais grupos. Assim, podemos afirmar que obtivemos um modelo de obesidade associado a um processo inflamatório, podendo caracterizar a síndrome metabólica. Alguns autores acreditam que estas adipocinas podem gerar um processo inflamatório no organismo, podendo estar envolvida em uma série de comorbidades, inclusive, no desenvolvimento da resistência à insulina (GUTIERREZ; PUGLISI; HASTY, 2009). Assim, em nosso experimento ocorreu uma secreção desregulada de adipocinas, fato que pode resultar no aumento da ingestão alimentar e redução do gasto energético, contribuindo ainda mais para o ganho de peso e consequente estado inflamatório (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010).

Notamos ainda a ação protetiva do chá de hibisco diminuindo a produção destas interleucinas pró inflamatórias. Outros autores demonstraram que o HS é capaz de reduzir os níveis de leptina por ação direta sobre os adipócitos (BELTRÁN-DEBÓN et al., 2010; BOIX-CASTEJÓN et al., 2018;

HERRANZ-LÓPEZ et al., 2012). A geração de fatores pró inflamatórios do tecido adiposo visceral pode ainda influenciar na alteração da função sensorial vesical (SHEN et al., 2007). Em nosso estudo não houve diferença significativa das ILs anti-inflamatória nos diferentes grupos, o que nos permite inferir que alterações encontradas foram decorrentes principalmente pelo aumento das adipocinas pró-inflamatórias.

Observamos uma diminuição significativa da espessura das fibras musculares da parede vesical no grupo de obesos suplementados com chá de hibisco (G4) em relação aos obesos (G3) e em comparação ao grupo controle (G1). Este fato demonstra o fator protetor do HS em relação as fibras musculares do detrusor. Alguns autores (Souza et. al, 2019), em estudo controlado, observando os efeitos de uma dieta rica em gordura observaram o aumento da espessura da fibra muscular da bexiga dos animais com suplementação de gordura.

Em nosso estudo observamos uma diminuição significativa na quantidade total de colágeno na bexiga de animais obesos suplementado com chá de hibisco (G4) em comparação aos grupos G3 e G1. Demonstrando assim, que o chá de HS foi capaz proteger contra a produção excessiva de colágeno, fato comum em alguns modelos de obesidade (Souza et al., 2019). Desta forma poderia estar evitando a fibrose do músculo detrusor e permitindo manter a função adequada da bexiga nestes animais obesos que receberam HB.

Na bexiga, os colágenos tipo I, III e IV são os mais comuns, sendo o tipo I mais prevalente (MACARAK et al., 1995; CHANG et al., 1998). As fibras do tipo I são mais maduras, estando relacionadas aos processos crônicos, em casos um aumento da carga volumétrica, e com consequente estiramento da fibra muscular da bexiga (CHANG et al., 1998). Os do tipo III, geralmente localizadas próximas ao tipo I, é imatura e está relacionada à desestruturação da homeostase do órgão, sendo sintetizado em processos de reparação e fibrose, e de acordo com a função de cada órgão, pode ser substituído pelo colágeno I (TEODORO; YOSHINARI, 2009). Em nossa

série observamos uma predominância dos colágenos tipo I e III, mas não observamos diferença estaticamente significativa entre os diferentes grupos. Assim, não nos permitindo avaliar qual seria o impacto nem da obesidade e nem do efeito protetor do HS na remodelagem do colágeno.

## **CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- Obtivemos um modelo de obesidade e síndrome metabólica em ratos.
- O chá da planta *Hibiscus sabdariffa* (HS) apresentou efeitos terapêuticos protetores nos animais obesos como:
  - Na função renal;
  - No controle da dislipidemia;
  - Redução do processo inflamatório;
  - Diminuição dos efeitos deletérios na musculatura vesical.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. REFERÊNCIAS

ADEMILUYI, A. O. et al. Anthocyanin - Rich Red Dye of Hibiscus Sabdariffa Calyx Modulates Cisplatin-induced Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Rats. **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 9, n. 4, p. 243–8, dez. 2013.

ALARCON-AGUILAR, F. et al. Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 66–71, 8 out. 2007.

ALBAYRAK, A. T.; SEREFOGLU, E. C. Obesity and Men's Health. **Effects of Lifestyle on Men's Health**, p. 149–168, 2019.

ALI, B. et al. Effect of aqueous extract and anthocyanins of calyces of Hibiscus sabdariffa (Malvaceae) in rats with adenine-induced chronic kidney disease. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 69, n. 9, p. 1219–1229, 2017.

AMOS, S. et al. Neuropharmacological Effects of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extract. <http://dx.doi.org/10.1076/phbi.41.5.325.15933>, v. 41, n. 5, p. 325–329, 2008.

ANNAMALAI, S. et al. Effect of combination therapy of melatonin and orlistat on high fat diet induced changes in lipid profiles and liver function parameters in serum of rats. 2016.

AZADZOI, K. et al. Atherosclerosis-induced chronic ischemia causes bladder fibrosis and non-compliance in the rabbit. **The Journal of urology**, v. 161, n. 5, p. 1626–1635, 1999.

BANU, S. G.; PANDIAN, R. M. JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH Cholesterol-Lowering Activity of the Aqueous Fruit Extract of *Trichosanthes dioica* Roxb (L.) in Normal and Streptozotocin Diabetic Rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 1, n. 6, p. 561–569, 2007.

BELTRÁN-DEBÓN, R. et al. The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 3–4, p. 186–191, 2010.

BOIX-CASTEJÓN, M. et al. Hibiscus and lemon verbena polyphenols modulate appetite-related biomarkers in overweight subjects: a randomized controlled trial. **Food & function**, v. 9, n. 6, p. 3173–3184, 2018.

BOLAT, M. S. et al. Effect of a Carbohydrate-Rich Diet on Rat Detrusor Smooth Muscle Contractility: An Experimental Study. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

BROWN, J. S. et al. Urologic Complications of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 177–185, 1 jan. 2005.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl\_1, p. S4–S9, 2019a.

CARVAJAL-ZARRABAL, O. et al. Effect of Hibiscus sabdariffa L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 2009.

CHANG, S.L.; HOWARD, P.S; KOO, H.P.; MACARAK, E.J. Role of type III collagen in bladder filling. **NeuroUrol Urodyn**. 1998; 17: 135.

CHEN, C. et al. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5472–5477, 2003.

DA-COSTA-ROCHA, I. et al. Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, v. 165, p. 424–443, 2014.

DANESHGARI, F.; LIU, G.; HANNA-MITCHELL, A. T. Path of translational discovery of urological complications of obesity and diabetes. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00489.2016>, v. 312, n. 5, p. F887–F896, 2017.

DARWISH, R. et al. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of Staphylococcus aureus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 359–364, 2002.

ELBADAWI, A.; YALLA, S.; RESNICK, N. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. IV. Bladder outlet obstruction. **The Journal of urology**, v. 150, n. 5 Pt 2, p. 1681–1695, 1993.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218–224, 1 fev. 2004.

EWALT, D. et al. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? **The Journal of urology**, v. 148, n. 2 Pt 2, p. 544–549, 1992.

FAROMBI, E.; IGE, O. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of Hibiscus sabdariffa in alloxan-induced diabetic

rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 21, n. 6, p. 601–609, dez. 2007.

FRY, C.; WU, C.; SUI, G. Cellular properties of human suburothelial myofibroblasts, their role in bladder sensationNo Title. **Neurology ans Urodynamics**, v. 22, p. 374–375, 2003.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, 25 mar. 2010.

GELEN, V. et al. Therapeutic effect of quercetin on renal function and tissue damage in the obesity induced rats . 2017.

GOMEZ, C. S.; KANAGARAJAH, P.; GOUSSE, A. E. Bladder Dysfunction in Patients with Diabetes. **Current Urology Reports 2011 12:6**, v. 12, n. 6, p. 419–426, 2011.

GURROLA-DÍAZ, C. et al. Effects of Hibiscus sabdariffa extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 7, p. 500–505, 2010.

GUTIERREZ, D. A.; PUGLISI, M. J.; HASTY, A. H. Impact of Increased Adipose Tissue Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia. 2009.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual review of food science and technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HERRANZ-LÓPEZ, M. et al. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 3–4, p. 253–261, 2012.

HERRERA-ARELLANO, A. et al. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of Hibiscus sabdariffa on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. **Planta medica**, v. 73, n. 1, p. 6–12, 2007.

HIRUNPANICH, V. et al. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of Hibiscus sabdariffa L. in hypercholesterolemic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 252–260, 2006.

HOWE, L. et al. Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 22, p. 6074–6083, 2013.

HSU, C.; YEN, G. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 1, p. 53–61, 2008.

HUANG, T.-W. et al. Effect of Hibiscus sabdariffa extract on high fat diet–induced obesity and liver damage in hamsters. **Food & Nutrition Research**, v. 59, 2015.

IBRAHIM, D. A.; ALBADANI, R. N. Evaluation of the Potential Nephroprotective and Antimicrobial Effect of Camellia sinensis Leaves versus Hibiscus sabdariffa (In Vivo and In Vitro Studies). **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2014, 2014.

IMAFIDON, C. E.; AKOMOLAFE, R. O. Obesity-induced renal injury is associated with oxidative stress via renal ischemia reperfusion injury. **Obesity Medicine**, v. 14, p. 100093, 1 jun. 2019.

JAGADEESHWAR, K. et al. Evaluation of Anti-obesity of Pithecellobium dulce against high fat diet Induced Obesity in Experimental Animals. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 3, p. 1447–1452, 18 mar. 2021.

KANASHIRO, G.; CASSU, R. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. **Manual de terapêutica veterinária**, p. 727–745, 2008.

KAO, E. et al. Polyphenolic extract from Hibiscus sabdariffa reduces body fat by inhibiting hepatic lipogenesis and preadipocyte adipogenesis. **Food & function**, v. 7, n. 1, p. 171–182, 2016.

KEENAN, K. et al. Chronic nephropathy in ad libitum overfed Sprague-Dawley rats and its early attenuation by increasing degrees of dietary (caloric) restriction to control growth. **Toxicologic pathology**, v. 28, n. 6, p. 788–798, 2000.

KIM, J. et al. Hibiscus sabdariffa L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 260–267, 2007.

KIRBY, M. et al. Overactive bladder: Is there a link to the metabolic syndrome in men? **Neurourology and urodynamics**, v. 29, n. 8, p. 1360–1364, 2010.

KRETSCHMER, B. D. et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Sciences**, v. 76, n. 14, p. 1553–1573, 18 fev. 2005.

LAVEN, B. et al. Birth weight, abdominal obesity and the risk of lower urinary tract symptoms in a population based study of Swedish men. **The Journal of urology**, v. 179, n. 5, p. 1891–1896, 2008.

LEE, S. et al. Panax ginseng Leaf Extracts Exert Anti-Obesity Effects in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 10 set. 2017.

LIFFORD, K. L. et al. Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Developing Urinary Incontinence. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 53, n. 11, p. 1851–1857, 2005.

LIN, T. L. et al. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. **Nutrition Research**, v. 27, n. 3, p. 140–145, 1 mar. 2007.

LLEWELLYN, A. et al. Childhood obesity as a predictor of morbidity in adulthood: a systematic review and meta-analysis. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 17, n. 1, p. 56–67, 1 jan. 2016.

MAHADEVAN, N.; SHIVALI; KAMBOJ, P. Hibiscus sabdariffa Linn.-An overview. **undefined**, 2009.

MACARAK, E.J.; EWALT, D.; BASKIN, L., et al. The collagens and their urological implications. **Adv Exp Med Biol**. 1995; 385: 173.

MCGUIRE, S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 7, n. 2, p. 418–419, 1 mar. 2016.

MCKAY, D. et al. Hibiscus sabdariffa L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 2, p. 298–303, 2010.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe | Scientia Plena. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, 2012.

MOHAGHEGHI, A. et al. The effect of hibiscus sabdariffa on lipid profile, creatinine, and serum electrolytes: a randomized clinical trial. **ISRN**

**gastroenterology**, v. 2011, p. 1–4, 2011.

MONDUL, A.; E, G.; EA, P. A prospective study of obesity, and the incidence and progression of lower urinary tract symptoms. **The Journal of urology**, v. 191, n. 3, p. 715–721, 2014.

MOUL, S.; MCVARY, K. Lower urinary tract symptoms, obesity and the metabolic syndrome. **Current opinion in urology**, v. 20, n. 1, p. 7–12, 2010.

MOYANO, G. et al. Potential use of dietary fibre from Hibiscus sabdariffa and Agave tequilana in obesity management. **Journal of Functional Foods**, v. C, n. 21, p. 1–9, 1 mar. 2016.

MOZAFFARI-KHOSRAVI, H. et al. Effects of sour tea (Hibiscus sabdariffa) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 8, p. 899–903, 2009.

MYDLO, J. The impact of obesity in urology. **The Urologic clinics of North America**, v. 31, n. 2, p. 275–287, maio 2004.

NUNES, R. L. V. **Influência da dieta hipercolesterolêmica na remodelação do colágeno da matriz extracelular da parede vesical em ratos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

NZIKOU, J. M.; MATOS, L. Characteristics and Nutritional Evaluation of seed oil from Roselle ( Hibiscus sabdariffa L . ) in Congo-Brazzaville. **Current research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 141–146, 2011.

AJANI O.E., et al. ROSELLE HIBISCUS SABDARRIFA CALYCES EXTRACTS MODULATES CARDIOVASCULAR DISEASE RISK AND KIDNEY DYSFUNCTIONS IN DIABETIC RATS. **PLANT ARCHIVES**, v. 21, n. Suppliment-1, p. 1350–1359, 2021.

OCHANI, P. C.; D’MELLO, P. Antioxidant and antihyperlipidemic activity of Hibiscus sabdariffa Linn. leaves and calyces extracts in rats. **undefined**, 2009.

ODIGIE, I.; ETTARH, R.; ADIGUN, S. Chronic administration of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 86, n. 2–3, p. 181–185, 2003.

PAN, M. et al. Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. **Food & function**, v. 7, n. 11, p. 4481–4491,

2016.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. DE; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.

PÉREZ-TORRES, I. et al. Hibiscus sabdariffa Linnaeus (Malvaceae), curcumin and resveratrol as alternative medicinal agents against metabolic syndrome. **Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry**, v. 11, n. 1, p. 25–37, 2013.

PINTO, P. et al. Inadequabilidade da Creatinina Sérica na Identificação Precoce da Disfunção Renal - Brazilian Journal of Nephrology (BJN). **J. Bras. Nefrol.**, v. 26, n. 4, p. 196–201, 2004.

PONTES-JÚNIOR, J. et al. Adhesion molecules of detrusor muscle cells are influenced by a hypercholesterolemic diet or bladder outlet obstruction in a wistar rat model. **BMC Urology** 2013 13:1, v. 13, n. 1, p. 1–7, 20 out. 2013.

RAHMAN, H. A. et al. Anti-obesity and antioxidant activities of selected medicinal plants and phytochemical profiling of bioactive compounds. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1247098>, v. 20, n. 11, p. 2616–2629, 2017.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 11, p. 717–726, 1 nov. 2008.

RIAZ, G.; CHOPRA, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 102, p. 575–586, 2018a.

RIAZ, G.; CHOPRA, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 102, p. 575–586, 1 jun. 2018b.

RICHTER, H. E. et al. The Impact of Obesity on Urinary Incontinence Symptoms, Severity, Urodynamic Characteristics and Quality of Life. **The Journal of Urology**, v. 183, n. 2, p. 622, 2010a.

RICHTER, H. E. et al. The Impact of Obesity on Urinary Incontinence Symptoms, Severity, Urodynamic Characteristics and Quality of Life. **The Journal of Urology**, v. 183, n. 2, p. 622, fev. 2010b.

RODRÍGUEZ-FIERROS, F. et al. Modulation of Renal Function in a

Metabolic Syndrome Rat Model by Antioxidants in Hibiscus sabdariffa L. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 7, 4 abr. 2021.

ROHRMANN, S. et al. Association between markers of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **International journal of obesity (2005)**, v. 29, n. 3, p. 310–316, mar. 2005.

RUBINSTEIN, M.; SAMPAIO, F.; COSTA, W. Stereological study of collagen and elastic system in the detrusor muscle of bladders from controls and patients with infravesical obstruction. **International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 33, n. 1, p. 33–39, 2007.

SEGAL, L.; RAYBURN, J.; MARTIN, A. **The state of obesity: better policies for a healthier America : 2016 - Digital Collections - National Library of Medicine**, 2016. Disponível em: <<https://collections.nlm.nih.gov/catalog.nlm.nlmuid-101698962-pdf>>

SHEN, J. et al. In vivo effects of leptin on autonomic nerve activity and lipolysis in rats. **Neuroscience letters**, v. 416, n. 2, p. 193–197, 2007.

SOUZA, A. C. DE et al. Effect of a high-fat diet on the rat bladder wall and bioactive action of Brazil nut oil. **International braz j urol**, v. 45, n. 1, p. 161–168, 1 jan. 2019.

SUN, N.N.; WU, T.Y.; CHAU, C.F. Natural Dietary and Herbal Products in Anti-Obesity Treatment. **Molecules**, v. 21, p. 1351, 2016.

SUSANI, M. Morphology and ultrastructure of the aging bladder. **The Aging Bladder**, p. 31–40, 2004.

TEODORO, W.R.; YOSHINARI, N.H. Estrutura e função do tecido conjuntivo: In: Martins MA, Carrilho FJ, Alves VAF, Castilho EA, Cerri GG, Wen CL (Org.), 1a. edição. Clínica Médica. Barueri: Manole; 2009, vol. 5, p. 528-36.

TORRES-FUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. **Nutritional neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 49–65, 1 fev. 2015.

TSENG, T. et al. Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. **Biochemical pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 307–315, 2000.

TZU LI, L. et al. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men

and women. **Nutrition Research**, v. 27, n. 3, p. 140–145, 2007.

ULRIK, C. S. Asthma symptoms in obese adults: The challenge of achieving asthma control. <https://doi.org/10.1586/17512433.2016.1093415>, v. 9, n. 1, p. 5–8, 2 jan. 2015.

UVELIUS, B.; MATTIASSON, A. Collagen content in the rat urinary bladder subjected to infravesical outflow obstruction. **The Journal of urology**, v. 132, n. 3, p. 587–590, 1984.

WANG, S.-C. et al. Aqueous Extract from Hibiscus sabdariffa Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 $\gamma$  in an Experimental Animal Model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2011, 2011.

WHO. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. **World Health Organization**, p. 102, 2013.

WONG, P. et al. Physico-chemical characteristics of roselle ( Hibiscus sabdariffa L.). **Nutrition & Food Science**, v. 32, n. 2, p. 68–73, 2002.

YANG, R. et al. Effects of feeding hyperlipidemia rats with symbiotic oat-based frozen yogurt on serum triglycerides and cholesterol. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 1096–1103, 1 mar. 2019.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. **Gerontology**, v. 55, n. 4, p. 379–386, 2009.