



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Aline Costa de Souza

**Efeito da dieta hiperlipídica na bexiga de ratos e ação biotiva do óleo de  
castanha-do-Brasil**

Rio de Janeiro

2019

Aline Costa de Souza

**Efeito da dieta hiperlipídica na bexiga de ratos e ação bioativa do óleo de castanha-do-  
Brasil**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Braga Mano Gallo

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Aline Costa de.

Efeito da dieta hiperlipídica na bexiga de ratos e ação bioativa do óleo de castanha-do-Brasil / Aline Costa de Souza. – 2019.  
61f.

Orientadora: Bianca Martins Gregório.  
Coorientadora: Carla Braga Mano Gallo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Sementes oleaginosas - Teses. 2. Gorduras na dieta - Teses. 3. Bexiga – Teses. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Rato como animal de laboratório. I. Gregório, Bianca Martins. II. Gallo, Carla Braga Mano.. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 634.575

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Aline Costa de Souza

**Efeito da dieta hiperlipídica na bexiga de ratos e ação bioativa do óleo de castanha-do-  
Brasil**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovada em 13 de março de 2019.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Braga Mano Gallo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Bruno Felix Patrício

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dra. Fernanda Amorim de Moraes Nascimento Braga

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação à minha mãe, Maria Alice, que me incentivou em todos os momentos na minha vida profissional e pessoal. Apesar de não estar presente fisicamente comigo, está sempre em meus pensamentos e sempre estará.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco Sampaio pela criação e condução do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas. Graças a seu esforço, competência e liderança somos orgulhosamente alunos de um Programa nota 5 na Capes.

À Profa. Bianca Martins Gregório, exemplo de competência e dedicação. Sua firme e segura orientação permitiu que este trabalho fosse apresentado e aprovado pela comunidade científica. Como Nutricionista me faz sentir orgulhosa de ser também uma Nutricionista.

À Profa. Carla Mano Gallo por generosamente ter me oferecido o projeto desta Dissertação. Agradeço também pelas sugestões e pelo trabalho primoroso na composição das fotos desse manuscrito.

À Profa. Magna Cottini Fonseca Passos por sugerir importantes parâmetros a serem analisados. À Profa. Sandra pela cuidadosa Revisão Prévia do manuscrito

Aos meus pais, Antonio e Maria Alice de Souza por terem me proporcionado uma boa educação e por nunca me deixarem desistir dos meus objetivos. À minha avó Maria da Conceição Pereira da Silva por todo o carinho e incentivo durante todos estes anos.

Ao meu irmão Diego de Souza e minha cunhada Paloma de Souza pela amizade e apoio constantes

Ao meu noivo Alexander de Souza pela compreensão e incentivo durante o tempo em que precisei me dedicar ao Mestrado.

Aos professores e amigos que fiz no Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas e da Unidade de Pesquisa Urogenital pela camaradagem e convívio científico estimulantes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo suporte financeiro ao longo dos dois anos de mestrado.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

*Charles Chaplin*

## RESUMO

SOUZA, Aline Costa de. *Efeito da dieta hiperlipídica na bexiga de ratos e ação bioativa do óleo de castanha-do-Brasil*. 2019. 61f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica está associada a distúrbios metabólicos. A castanha-do-brasil possui substâncias bioativas e tem sido usada para controlar os danos causados pela obesidade em vários órgãos. O trabalho pretende mostrar os danos causados pela dieta rica em lipídios na parede da bexiga e se o óleo de castanha adicionado à dieta pode melhorar ou reverter esse efeito. Ratos com sessenta dias foram divididos em dois grupos: C (controle, n = 30) e HF (alto teor de lipídios, n = 30). Aos 90 dias, 10 animais de cada grupo foram mortos. Os demais foram divididos em 4 grupos: C e HF (animais que mantiveram a dieta anterior, n = 10 para cada grupo) e C / Bno e HF / Bno (animais cuja dieta controle ou hiperlipídica foi suplementada com óleo de castanha do Pará, n = 10 para cada grupo). Aos 120 dias os animais foram mortos. As bexigas foram retiradas e fixadas em formalina tamponada a 4% seguindo-se o procedimento da rotina histológica do laboratório para inclusão em parafina. Os dados morfométricos, altura epitelial, colágeno entre as fibras musculares, diâmetro da fibra muscular e colágeno total foram obtidos utilizando-se o software Image J e analisados com o software *GraphPad Prism*. Aos 90 dias a altura epitelial foi aumentada 22% no grupo HF e foi mantido até os 120 dias. Em contraste, o C / Bno apresentou menor altura epitelial em relação aos grupos C (-23%, p<0,01), HF (-38%, p<0,0001) e HF/Bno (-28%, p<0,0001). A porcentagem de colágeno entre as fibras do músculo detrusor foi significativamente maior em C / Bno (+17%, p<0,001), HF (+45%, p<0,001) e HF / Bno (+45%, p<0,001) do que no grupo controle. O grupo HF apresentou maior diâmetro de fibra muscular aos 90 dias e foi mantido até os 120 dias. O grupo HF aumentou 34%, p<0,001 o diâmetro da fibra muscular em relação ao grupo C, enquanto o C/Bno apresentou valores menores que os grupos HF e HF / Bno (-30%, p <0,001). Não houve alteração no percentual de colágeno total da bexiga. Dietas hiperlipídicas induzem dano na parede da bexiga como o aumento da altura do epitélio, do diâmetro na fibra muscular e o do colágeno no músculo detrusor. Estas alterações na parede da bexiga do rato foram parcialmente revertidas pelo óleo de castanha-do-brasil.

Palavras-chave: Parede da bexiga. Óleo de castanha-do-Brasil. Dieta hiperlipídica. Morfologia.

Ratos.



## ABSTRACT

SOUZA, Aline Costa de. *Effect of a high-fat diet on the rat bladder wall and bioactive action of Brazil nut oil*. 2019. 61f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

High-fat diet-induced obesity is associated with metabolic disorders. The Brazil nut has bioactive substances and has been used to control the damage caused by obesity in several organs. The work intend to show the damage caused by high-fat diet in the bladder wall and if the Brazil nut oil added to the diet could ameliorate or reverse this effect. Sixty-day-old rats were divided into two groups: C (control, n=30) and HF (high-fat, n=30) diets. At 90 days, 10 animals of each group were sacrificed. The others were divided into 4 groups: C and HF (animals that maintained their previous diet, n=10 for each group) and C/Bno and HF/Bno (animals whose control or high-fat diet was supplemented by Brazil nut oil, n=10 for each group). At 120 days the animals were killed. The bladders were removed and fixed in 4% buffered formalin following the laboratory histological routine procedure for paraffin embedd. Morphometric data of epithelial height, collagen between muscle fiber, muscle fiber diameter and total collagen were obtained using Image J software and analyzed with GraphPad Prism software. Epithelial height increased by 22% in the HF group at 90 days and 120 days. In contrast, the C / Bno presented lower epithelial height in relation to the groups C (-23%,  $p < 0.01$ ), HF (-38%,  $p < 0.0001$ ) and HF / Bno (-28%,  $p < 0.0001$ ). The percentage of collagen between the fibers of the detrusor muscle was significantly higher in C / Bno (+ 17%,  $p < 0.001$ ), HF (+ 45%,  $p < 0.001$ ) and HF / Bno than in the control group. The HF group presented greater muscle fiber diameter at 90 days and was maintained up to 120 days. The HF group increased by 34%,  $p < 0.001$  the muscle fiber diameter in relation to the C group, while the C / Bno presented lower values than the HF and HF / Bno groups (-30%,  $p < 0.001$ ). There was no change in the percentage of total bladder collagen. HF diets induce damage to the bladder wall such as increased epithelial height, diameter in the muscle fiber, and collagen in the detrusor muscle. These changes in the rat bladder wall were partially reversed by Brazil nut oil.

Keywords: Bladder wall. Brazil nut oil. High-fat diet. Morphology. Rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Percentual do grau de sobrepeso da população brasileira nos últimos 10 anos.....	13
Figura 2 – Percentual do grau de obesidade da população brasileira nos últimos 10 anos.....	13
Figura 3 – Corte transversal da bexiga urinária.....	20
Figura 4 – Parede vesical com as diferentes camadas que serão analisadas neste trabalho.....	20
Figura 5 – Castanha-do-brasil .....	21
Figura 6 – Formação dos grupos experimentais.....	27
Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.....	28
Tabela 2 - Estratificação dos lipídios do óleo da castanha-do-Brasil .....	29
Figura 7 – Análise morfométrica da altura do epitélio na bexiga urinária.....	31
Figura 8 – Análise morfométrica do diâmetro da fibra muscular na bexiga urinária.....	31
Figura 9 – Análise morfométrica do percentual de colágeno na bexiga urinária.....	32
Figura 10 – Análise morfométrica do percentual de colágeno total na bexiga urinária.....	32
Gráfico 1 - Ingestão Alimentar.....	34
Gráfico 2 - Massa cosporal.....	35
Figura 11 – Fotomicrografia da altura do epitélio da parede da bexiga.....	36
Figura 12 – Fotomicrografia colágeno do músculo detrusor.....	38
Figura 13 – Fotomicrografia do diâmetro do detrusor.....	40
Figura 14 – Fotomicrografia do colágeno total na parede da bexiga.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AL	Ácido linoleico
ALA	Alfa-linolênico
C	Controle
C/Bno	Controle Castanha-do-brasil
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentanóico
G	Gramas
HF	<i>High-fat</i>
HF/Bno	<i>High-fat</i> Castanha-do-brasil
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IMC	Índice de massa corporal
ITU	Infecção do trato urinário inferior
IU	Infecção urinária
Kcal	Quilocalorias

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1	<b>OBESIDADE</b> .....	12
1.1	<b>Influência da deita hiperlipídica no sistema urogenital</b> .....	14
1.2	<b>Modelos experimentais de obesidade</b> .....	14
1.3	<b>Formas de indução da obesidade</b> .....	15
1.4	<b>O tratamento da obesidade</b> .....	17
1.5	<b>A bexiga urinária</b> .....	18
1.6	<b>Castanha-do-brasil</b> .....	21
1.6.1	<u>Taxonomia</u> .....	21
1.6.2	<u>Distribuição geográfica</u> .....	22
1.6.3	<u>Características nutricionais</u> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1	<b>Morfometria da Bexiga Urinária</b> .....	30
3.2	<b>Análise estatística</b> .....	33
4	<b>RESULTADOS</b> .....	34
4.1	<b>Análise histológica</b> .....	35
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	43
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	46
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
	<b>ANEXO – Artigo publicado</b> .....	54

## INTRODUÇÃO

O ambiente moderno é um forte estímulo para o desenvolvimento da obesidade, como a diminuição dos níveis de atividade física e o aumento da ingestão calórica. Há um aumento significativo da prevalência da obesidade em diversas populações no mundo, incluindo o Brasil (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016). Dados recentes mostraram que a porcentagem de pessoas com obesidade dobrou em mais de 70 países entre 1980 e 2015 (AFSHIN et al., 2018). Dados da *World Health Organization* (WHO) em 2018 mostram que mais de 1,9 bilhões de indivíduos em 2016 apresentavam excesso de peso no mundo, sendo mais de 650 milhões obesos (WHO, 2018).

O consumo elevado de alimentos ricos em lipídios, independente da qualidade, é um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade e de outras doenças como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia (MEDEIROS JÚNIOR et al., 2015). Quando comparados os efeitos metabólicos desencadeados por diferentes dietas ricas em lipídios, acredita-se que dietas baseadas em ácidos graxos saturados e colesterol, induzem efeitos deletérios sobre a massa corporal e o metabolismo, e predispõem ao desenvolvimento da resistência à insulina, ao passo que dietas ricas em poli-insaturados acredita-se ter efeitos opostos (CASCIO; SCHIERA; DI LIEGRO, 2012).

O consumo elevado de alimentos ricos em antioxidantes, incluindo frutas e verduras, bem como alimentos ricos em gorduras insaturadas, proteínas, sobretudo de fontes vegetais ou animais magros, ingestão equilibrada de carboidratos complexos e baixa ingestão de gordura saturada e trans, associado com exercício regular podem ser benéficos para a prevenção e controle de dislipidemias, hipertensão arterial, síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (SCHUSTER; OLIVEIRA; BOSCO, 2015). A composição de uma alimentação adequada associada a alguns vegetais, como a castanha-do-Brasil, que possui em sua composição selênio. Esse micronutriente é associado por trazer resultados benéficos como a melhora do perfil lipídico e no controle de doenças cardiovasculares (MARANHÃO et. al., 2011; CARDOSO et. al., 2017).

Sabendo-se que a castanha-do-Brasil possui características importantes e benéficas ao organismo, buscamos em nosso trabalho estudar o óleo da castanha, que até o momento é desconhecido. A hipótese do trabalho é que estes efeitos possam ser efetivos no sistema urogenital, em particular na bexiga.

## 1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença frequentemente associada a outras doenças, como dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (POLSKY; ELLIS, 2015). A influência do ambiente moderno é um estímulo para a obesidade. A diminuição do exercício físico e o aumento da ingestão energética são os fatores ambientais que mais favorecem o aumento do ganho ponderal (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016).

O índice de massa corporal (IMC) superior ou igual a  $30 \text{ kg/m}^2$  (ABESO, 2016) é o parâmetro utilizado para classificar a obesidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (IBGE, 2010), em 2014, aproximadamente 600 milhões da população adulta brasileira já se encontrava obesa (índice de massa corporal – IMC  $> 29,9 \text{ Kg/m}^2$ ). Este dado foi confirmado pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), mostrando que nos últimos 10 anos em 27 cidades brasileiras a frequência de excesso de peso (IMC entre  $24,5 \text{ Kg/m}^2$  e  $29,9 \text{ kg/m}^2$ ) alcançou 53,8% (figura 1) da população enquanto que a obesidade foi de 18,9% (figura 2) (VIGITEL, 2016).

A obesidade e o sobrepeso são um problema em todo mundo, com altas taxas nos países em desenvolvimento (CAPODAGLIO e LIUZZI, 2013). A obesidade tornou-se um fardo para a saúde pública com impacto significativo e profundo na morbidade, mortalidade e custo dos cuidados de saúde (UPADHYAY et al., 2018). O Brasil ocupa a 5ª posição entre as cidades com maior número de obesos e os Estados Unidos são responsáveis por 13% das pessoas obesas no mundo. 62% de obesos no mundo vivem em países em desenvolvimento (NG et al., 2014).

Nos últimos anos, a população vem consumindo de maneira exponencial alimentos com alta densidade energética, alta palatabilidade, de fácil absorção e digestão. Estas características favorecem o aumento do desequilíbrio energético, e consequentemente do ganho ponderal (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE (2016).

Estudos feitos em animais experimentais (AIZAWA; HOMMA; IGAWA, 2013; OBERBACH et al., 2013) e em humanos (MCGROTHER et al., 2006) mostraram disfunções no trato urinário inferior associados à obesidade.

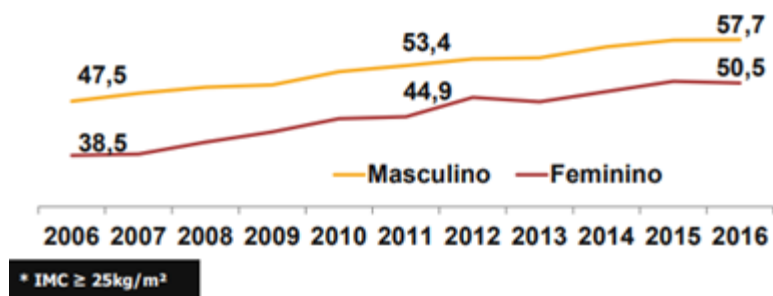
Figura 1 - Percentual do grau de sobrepeso da população brasileira em 10 anos

## EXCESSO DE PESO

Excesso de peso cresceu 26,3% em dez anos  
Passando de **42,6%** em 2006 para **53,8%** em 2016



**Excesso de peso é mais prevalente em homens**



Fonte: Vigitel, 2016.

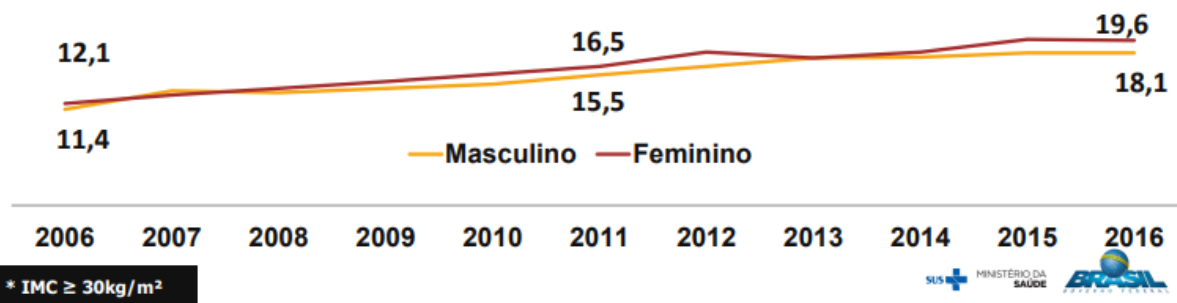
Figura 2 - Percentual do grau de obesidade da população brasileira em 10 anos

## OBESIDADE

Obesidade cresceu 60% em dez anos  
De **11,8%** em 2006 para **18,9%** em 2016



**Frequência é semelhante entre os sexos**



Fonte: Vigitel, 2016.

### 1.1 Influência da dieta hiperlipídica no sistema urogenital

Trabalhos desenvolvidos na Unidade de Pesquisa Urogenital confirmaram que a dieta hiperlipídica, rica em ácidos graxos poliinsaturados, afetou diferentes órgãos do sistema urogenital. No testículo, foram observadas alterações morfológicas importantes como a redução da altura do epitélio e do diâmetro do túbulo seminífero (CAMPOS-SILVA et al., 2015); enquanto que na próstata houve aumento do estroma prostático (FURRIEL et al., 2014) e no pênis foram verificadas modificações nos componentes eréteis, o que favorece a disfunção erétil (MEDEIROS JÚNIOR et al., 2014).

Também foram observadas lesões renais e glomerulares (KOVESDY *et al.*, 2017; XAVIER; RESENDE, 2015), aumento da incidência de nictúria, aumento do risco de infecção do trato urinário inferior (ITU) (SEMINS et al., 2012; TIKKINEN et al., 2006) e problemas miccionais (MCGROTHER *et al.*, 2006). Alguns estudos mostraram que a perda de peso está associada a reduções de infecção urinária (IU) (WING et al., 2010). Um ensaio clínico randomizado mostrou que mulheres com sobrepeso e obesas que participaram de uma intervenção de perda de peso durante 6 meses, resultou em uma perda de 8%, reduzindo os episódios de IU em 47% quando comparados com 28% no grupo controle, e redução dos episódios de IU de urgência em 42% quando comparado com 26% no grupo controle (SUBAK *et al.*, 2005).

### 1.2 Modelos experimentais de obesidade

Modelos monogênicos e poligênicos de animais obesos tem sido frequentemente empregados em pesquisas. Os pesquisadores utilizam normalmente uma mutação na via da leptina (SPEAKMAN et al., 2007). Dependendo da manipulação genética ou fatores ambientais e dietéticos, a gravidade da obesidade e a comorbidade das alterações metabólicas podem variar muito (NILSSON et al., 2012).

Embora os modelos monogênicos tenham sido extremamente úteis na compreensão da obesidade, a obesidade monogênica em seres humanos é rara e grave. Esses modelos existem principalmente devido a mutações do gene da leptina envolvido na regulação da ingestão alimentar.



Diferentes estirpes de animais têm uma resposta variável a estas dietas, sendo algumas mais propensas e outras mais resistentes ao desenvolvimento da obesidade (LUTZ et al., 2012). Modelos poligênicos imitam mais de perto a obesidade humana, pois eles carregam uma combinação de múltiplos genes que determinam uma característica. As espécies mais comuns de animais utilizados para estudos de obesidade são ratos e camundongos, mas muitos outros foram usados, incluindo outros roedores, animais maiores como porcos, ovelhas e primatas, e ainda mais espécies exóticas como focas e morcegos. (SPEAKMAN et al., 2007). Em modelos poligênicos, a obesidade é frequentemente induzida pela alimentação de animais com dieta hiperenergética.

### 1.3 Formas de indução da obesidade

Variações comuns incluem a dieta de cafeteria, que estimulam a hiperfagia e a obesidade subsequente, devido à sua palatabilidade (SPEAKMAN et al., 2007), dieta rica em sacarose que promove aumento significativo de depósitos de gordura retroperitoneal e epididimária (Nascimento et al., 2010). Somando-se a isso, a literatura ainda relata que dietas *high fat* causa obesidade devido à sua alta densidade energética (HARIRI et al., 2010).

Estudos relatam que o fornecimento de 50% de lipídeos na dieta é o suficiente para que o indivíduo desenvolva a obesidade (CAMPOS-SILVA et al., 2015; FURRIEL et al., 2014). O consumo habitual de uma dieta rica em lipídios é um fator que contribui para o desenvolvimento da obesidade em humanos e em modelos animais. Uma dieta enriquecida com lipídios, independente do teor e da qualidade dos lipídios induzem o ganho de peso (TOWNSEND et al., 2008; MEDEIROS JÚNIOR et al., 2014). Os lipídeos é uma das principais fontes energéticas necessárias para manutenção de algumas espécies. São definidos como uma classe de componentes solúveis em solventes orgânicos, e incluem os triglicerídeos, os ácidos graxos, os fosfolipídeos, os esteróis, os glicolipídeos e os isoprenóides (CARDOSO, 2010). As gorduras e óleos constituem cerca de 34% da energia na alimentação dos seres humanos. Como os lipídeos fornecem 9kcal/g, os seres humanos são capazes de obter as calorias necessárias com um consumo adequado de alimentos que possuam gordura (COZZOLINO E COMINETTI, 2013). Os ácidos graxos são classificados em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados quanto à presença de insaturações na estrutura química (CARDOSO, 2010).

Dos ácidos graxos saturados (AGSs) existentes, estão o ácido esteárico, o palmítico, o mirístico, o láurico e o AGS de cadeia média. São derivados principalmente de fontes animais, como carnes gordas (porco, vaca, vitela, cordeiro, presunto), ovos e produtos lácteos (leite integral, manteiga e queijo). No entanto, alguns produtos de origem vegetal (tais como óleo de coco e óleo de semente de palma) também são ricos em gordura saturada (CARDOSO, 2010 e HAMMAD e JONNES, 2017). Nosso organismo não é capaz de sintetizar os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), logo eles devem estar presentes na dieta. Os principais representantes dos AGPIs são o alfa-linolênico (ALA), o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), e os principais representantes da família n-6 são o ácido linoleico (AL) e o ácido araquidônico (AA) (ANDRADE e CARMO, 2006). Uma das principais fontes desses ácidos graxos essenciais são as plantas terrestres e aquáticas (marinha). O AL pode ser encontrado nas sementes de plantas oleaginosas, principalmente óleos de milho, girassol e soja. O ALA, suas principais fontes são plantas e animais marinhos como os fitoplânctons, as algas e óleo de peixe. O EPA e DHA, são encontrados em grande concentração em peixes de águas profundas, como a cavala, sardinha, salmão e truta (CARDOSO, 2010).

Os ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) são um tipo de gordura insaturada e geralmente são líquidas em temperatura ambiente, sendo mais viscosas que os AGPIs, e tendem a ficar sólidas quando resfriadas. O ácido oleico é um dos representantes dos AGMIs e está presente principalmente no azeite de oliva, mas pode ser encontrado em grande quantidade nos óleos de canola, soja e palma, no gergelim e no bacalhau. O consumo controlado desta gordura contribui para a redução do colesterol, risco de hipertensão, doenças cardiovasculares (APPEL et al., 2005), obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus (PEREZ-MARTINEZ et al., 2011).

O colesterol é uma molécula anfipática, que possui um núcleo esteróide e uma cauda hidrocarbonada. É encontrado na dieta tanto na forma livre quanto na esterificada a ácidos graxos, sendo esse complexo chamado de éster de colesterol. O colesterol assim como os fosfolípidos, desempenha função estrutural, formando a dupla camada que constitui as membranas celulares e a camada única que reveste as lipoproteínas. Além disso, o colesterol é o precursor dos ácidos biliares, dos hormônios esteróides e da vitamina D, sendo encontrado nos alimentos de origem animal, como carnes, gema de ovo, manteiga, leite integral e derivados (CARDOSO, 2010).

Como citado anteriormente, também é possível a indução da obesidade por dieta de cafeteria que retrata os hábitos da dieta ocidental, contendo altos teores de lipídios e

carboidratos simples. Estudos em animais mostraram que a administração dessas dietas promove hiperinsulinemia, hiperglicemia, intolerância à glicose e aumento da massa corporal quando comparadas à dietas ricas em lipídios (SAMPEY et al.,2011). Dentre os malefícios provocados pela ingestão exacerbada de carboidratos simples e lipídios, estão a reprodução feminina, comprometendo o ambiente uterino (BAZZANO et al., 2015) e em homens comprometendo fertilidade masculina (DE OLIVEIRA et al.,2018).

A programação metabólica fetal ocorre em decorrência a estímulos ambientais durante a fase de desenvolvimento, promovendo efeitos irreversíveis na estrutura, fisiologia e metabolismo da prole na vida adulta (LUCAS, 1991). O bebê depende da mãe totalmente para a sua alimentação, crescimento e desenvolvimento, desde a concepção até o nascimento. Com isso, tudo o que a mãe consume (alimentos, cigarro, medicamentos e etc) afeta diretamente a saúde dos filhos. Bazzano e colaboradores 2018, analisaram em seu estudo que a obesidade altera o ambiente intrauterino antes da gravidez. O experimento, mostrou que o útero das ratas obesas durante a fase estro (fase de ovulação), desenvolveu resistência à insulina, isso porque o útero é um órgão sensível à insulina e a obesidade induziu a proliferação de células reduzindo a resposta contrátil uterina, o que pode causar macrosomia fetal.

Uma outra forma de induzir a obesidade é com a dieta rica em sacarose. Assim como outros tipos de dieta, a dieta rica em sacarose induz a obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2, estresse oxidativo e como consequência a doença não alcoólica do fígado gorduroso (LIMA et al., 2015). (NASCIMENTO et al., 2010).

#### **1.4 O tratamento da obesidade**

Atualmente existem algumas formas de tratamento contra a obesidade e sobrepeso. A mudança do estilo de vida é importante para eficácia do tratamento. Os tratamentos mais utilizados são: farmacológico, cirúrgico e dietoterápico.

Segundo as Diretrizes Brasileiras de Obesidade (2016), existem, atualmente, no Brasil três medicamentos aprovados para o tratamento do excesso de massa corporal: sibutramina, orlistate e liraglutida 3,0mg. É importante ressaltar que, o tratamento farmacológico é adjuvante das terapias com foco na modificação de hábitos alimentares e tem início na prevenção secundária para impedir a progressão da doença. Deve ser individualizado com

avaliação de riscos e benefícios apropriados de acordo com as características de cada paciente (FERREIRA-HERMOSILLO; SALAME-KHOURI; CUENCA-ABRUCH, 2018).

A cirurgia bariátrica também é utilizada como forma de tratar a obesidade. Neste caso, a cirurgia é indicada para indivíduos com IMC maior do que 35kg/m<sup>2</sup> ou 40kg/m<sup>2</sup> e portadores de uma ou mais comorbidades graves relacionadas com a obesidade (DIRETRIZ BRASILEIRA DE OBESIDADE, 2016). É um método que engloba absorção restritiva e limitante e também métodos híbridos como a gastrectomia vertical e o *by-pass* em Y de Roux. Apesar de sua eficácia, o tratamento cirúrgico está associado ao aumento do risco de várias complicações, tais como deficiências nutricionais e deterioração da saúde mental (KOMORNIK e STACHOWSKA, 2018).

A intervenção dietética é o método mais eficaz para o tratamento do sobrepeso e obesidade, seguido de uma mudança comportamental para que as características ideais de peso possam ser preservadas ao longo da vida. Uma dieta balanceada é caracterizada por conter de 20% a 30% de lipídios, 55% a 60% de carboidratos e 15% a 20% de proteínas. O objetivo das dietas balanceadas é permitir ao consumidor a escolha de maior variedade de alimentos, adequação nutricional, maior aderência, resultando em perda de peso pequena, porém sustentada (DIRETRIZ BRASILEIRA DE OBESIDADE, 2016).

A alimentação saudável deve ser planejada com alimentos de todos os grupos alimentares, de procedência segura e conhecida, consumidos em refeições, respeitando-se as diferenças individuais, emocionais e sociais, de forma a atingir as recomendações nutricionais, e o prazer ao comer (PHILIPPI, 2014).

A intervenção nutricional exerce importante papel na prevenção e tratamento da obesidade, dislipidemia, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial. O plano alimentar mesmo sendo individualizado, fatores que são benéficos para perda e manutenção do peso, redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovascular e metabólica devem ser recomendadas para todos os indivíduos, como estratégia de prevenção primária (SCHUSTER; OLIVEIRA; BOSCO, 2015).

### **1.5 A Bexiga Urinária**

A bexiga é um órgão neuromuscular cuja função é armazenar urina a pressões relativamente baixas por períodos prolongados de tempo e esvaziar a urina depois de receber impulsos neurais para a contração do músculo liso (NAGATOMI et al., 2005).

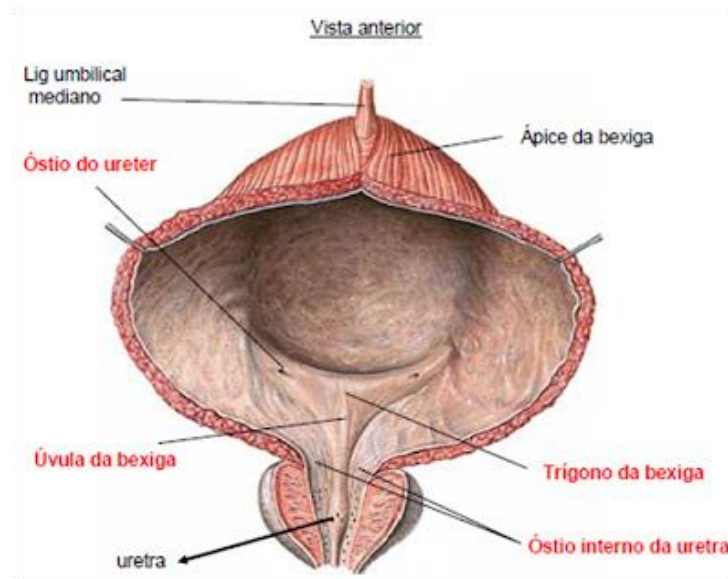
A bexiga pode ser dividida em duas partes: um corpo acima dos orifícios ureterais e uma base que consiste no trígono da bexiga e no colo da bexiga. As duas áreas são diferentes, mas homogêneas em relação à neuromorfologia e neurofarmacologia (ELBADAWI E SCHENK, 1966). (Figura 3).

A parede da bexiga urinária é formada por três camadas de músculo liso : longitudinal interna, circular e longitudinal externa (ROSS E PAWLINA, 2008). A mucosa formada por um epitélio de transição, o urotélio e por uma lâmina própria de tecido conjuntivo que varia do frouxo a denso; a camada do músculo detrusor e a camada adventícia que cobre a maior parte da bexiga e a serosa (peritônio) que cobre a parte superior da bexiga (figura 4) (SMEULDERS; WOOLF; WILCOX, 2003).

As células mais superficiais do epitélio de transição são responsáveis pela barreira osmótica entre a urina e os fluidos teciduais. Nestas células, a membrana plasmática em contato com a urina é especializada, apresentando placas espessas separadas por faixas de membrana mais delgada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004)

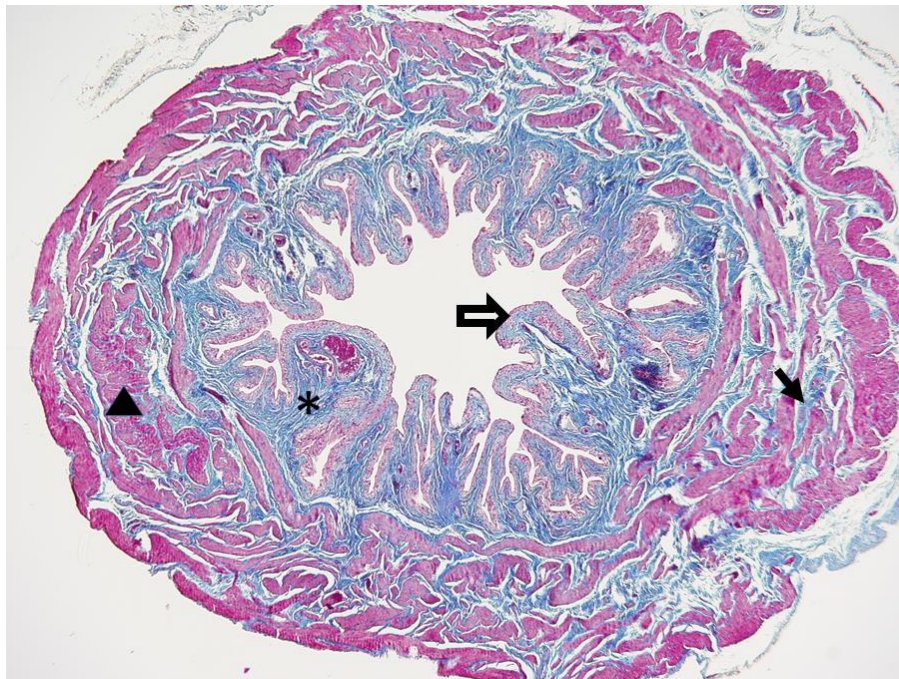
O tecido conjuntivo é formado por colágeno tipo I e tipo III, fibras do sistema elástico e glicosaminoglicanos. O colágeno e a elastina são componentes importantes da bexiga e estão comprometidos com a função vesical. O colágeno garante a força tensil. Todavia, o acúmulo de colágeno pode inibir a contratilidade da bexiga e a condução dos impulsos nervosos pela parede vesical. Já a elastina encontra-se envolvida na elasticidade, auxiliando na complacência vesical (KIM et al., 1991). O músculo detrusor da bexiga é uma das mais espessas camadas de músculo liso do corpo (BASKIN et al., 2001) e a maior das camadas da parede vesical ocupando cerca de 60% a 70% nas bexigas normais. A túnica muscular é formada por uma camada longitudinal interna e uma circular externa (NAGATOMI et al., 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Este músculo é responsável pela principal função da bexiga, ou seja, estocar e eliminar a urina. Uma avaliação das características morfológicas do detrusor pode contribuir com informações importantes para caracterizar o estado funcional do órgão.

Figura 3 - Corte transversal da bexiga urinária



Legenda: Vista anterior mostrando os principais componentes anatômicos.  
 Fonte: Anatomia e Fisioterapia, 2019.

Figura 4 – Fotomicrografia de corte transversal da bexiga do grupo C aos 90 dias de idade



Legenda: Fotomicrografia mostrando as diferentes estruturas que compõem a parede vesical. Seta vazada: epitélio; cabeça de seta: músculo detrusor; asterisco: colágeno na lamina própria; seta: colágeno no músculo detrusor. Coloração de Masson.

Fonte: Costa-Souza A, 2019.

Nota: Objetiva de 10 X.

## 1.6 Castanha-do-Brasil

### 1.6.1 Taxonomia

*Bertholletia excelsa* H.B.K também conhecida como castanha-do-brasil ou castanha do Pará é a noz proveniente do fruto da castanheira-do-brasil, planta da família das *Lecythidaceae*, sub-família *Lecythidoideae*, gênero *Bertholletia*, espécie *excelsa*. É uma árvore de tronco escuro, liso, com ramos apenas próximos da extremidade. As flores são brancas e grandes, o fruto é globoso (ouriço), chegando a pesar 1,5 kg e abriga de 12 a 22 sementes, que são as castanhas (Figura 5 A e B) (CHUNHIENG *et al.*, 2004; MULLER *et al.*, 1995; MULLER; FIGUEIREDO; CARVALHO, 1995).

Figura 5 - Árvore da castanha-do-Brasil e o fruto



Legenda: A) Árvore da Castanha-do-brasil planta da família das *Lecythidaceae*, sub-família *Lecythidoideae*, gênero *Bertholletia*, espécie *excelsa*. B) O fruto é globoso (ouriço), chegando a pesar 1,5 kg e abriga de 12 a 22 sementes.

Fonte: Jornal da USP, 2017 B) Fonte: Sabor a vida, 2017.

### 1.6.2 Distribuição geográfica

No Brasil, a sua área de distribuição geográfica estende-se pelos Estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima e Amazonas, (FERREIRA *et al.*, 2006; MULLER; FIGUEIREDO; CARVALHO, 1995). Ela é encontrada principalmente, na região norte do Brasil, sendo considerada uma espécie nativa da Amazônia (MULLER *et al.*, 1995). É uma das mais importantes espécies de exploração extrativa dessa região. O Brasil ocupa posição de produtor quase exclusivo de castanha-do-brasil, comercializando suas sementes e/ou amêndoas tanto para o mercado interno como para o mercado externo e tendo expressiva participação na geração de divisas para a região norte do país (MULLER *et al.*, 1995).

### 1.6.3 Características nutricionais

A amêndoa da castanha-do-brasil, parcialmente desidratada, é composta basicamente de 17,0% de proteínas, 67,0% de gorduras, 7,0% de carboidratos, 4,0% de sais minerais e 5,0% de água (FRANCO G. 1992). Segundo Cominetti e colaboradores (2011), a composição centesimal é de: 9,2g de carboidratos; 15,1g de proteínas; 70,7g de gorduras; 1,8% de umidade; 3,2g de cinzas, o que perfaz um total de energia em torno 734Kcal/100g de castanha. Klucznovski e colaboradores (2015), mostraram uma tabela comparativa da composição centesimal da castanha-do-brasil de resultados obtidos por diferentes autores.

As diferenças encontradas pelos autores em relação ao teor de macronutrientes são aceitáveis, visto que podem ser explicadas devido às variações de solo, clima, safra, modo de armazenamento das castanhas, classificação das mesmas e diferenças nas metodologias de análise (KLUCZKOVSKI *et al.*, 2015).

A castanha-do-brasil é considerada a fonte vegetal de maior teor de aminoácidos essenciais e devido a essa característica é chamada de “carne vegetal” (SILVA; ASCHERI; SOUZA, 2010; SOUZA; MENEZES, 2004). Segundo Srur, (1976) o aminograma das proteínas da amêndoa da castanha-do-brasil apresenta valores médios em 100 g de proteína de 3,7 g de ácido aspártico, 12,92 g de ácido glutâmico, 1,00 g de lisina, 2,03 g de glicina, 1,49 g de alanina, 1,66g de valina, 2,82 g de metionina, 1,19 g de isoleucina, 3,28 g de leucina, 46 g



de tirosina, 1,49 g de fenilalanina, 0,79 g de histidina e 5,32 g de arginina. Em contrapartida, Souza e Menezes (2004), encontraram valores diferentes ao de Srur acima, pois, para cada 100g de proteína da castanha-do-brasil: isoleucina, 3,09; leucina, 8,58; lisina, 4,53; metionina, 7,12; cisteína, 2,53; triptofano, 1,10; valina, 5,12 e treonina, 3,02 (g/100g de proteína).

Também existe uma complexa matriz composta por substâncias bioativas como o selênio e o alfa e gama tocoferol, compostos fenólicos, fólicos, magnésio, potássio e cálcio (MARANHÃO et al., 2011).

A característica marcante da castanha é a grande quantidade de selênio, e também sua alta biodisponibilidade (COMINETTI *et al.*, 2012). Embora a literatura seja escassa, há algumas associações entre alta disponibilidade de selênio e a baixa incidência de doença cardiovascular. Entretanto, essa associação pode ser devido à grande quantidade de AGMI e AGPI presentes na castanha-do-brasil que parece promover efeitos benéficos à saúde como redução de processos oxidativos, aumento do HDL-colesterol, diminuição do LDL-colesterol e redução dos riscos de doença cardiovascular (FLORES-MATEO *et al.*, 2006; HUGUENIN *et al.*, 2015).

Alguns dos efeitos benéficos da castanha-do-brasil já foram comprovados. Podemos citar o efeito sobre a inflamação (ROS, 2009), sobre a função endotelial (ROS et al., 2004) e na melhora do perfil lipídico como colesterol total, LDL e triglicerídeos (MARANHÃO et al., 2011), Além da castanha-do-brasil, outro componente que vem sendo estudado, é o óleo da castanha-do-brasil (PENA MUNIZ et al., 2015). Este produto é obtido a partir do tratamento da amêndoa da castanha-do-brasil, onde ela é hidratada, pesada, triturada e submetida à extração de lipídios. Ferreira e colaboradores (2006) analisaram por cromatografia gasosa a composição dos principais ácidos graxos presentes no óleo bruto da castanha-do-brasil e verificaram que o óleo era constituído de 85% de ácidos graxos insaturados (AGI), sendo 34% de ácido linoleico e 51% de ácido oléico.

Concordando com esses autores, outros estudiosos apontam que o ácido oleico (ômega-9) é o principal constituinte do óleo de castanha-do-brasil (KLUCZKOVSKI et al., 2015). Quimicamente, é um ácido graxo de cadeia longa com 18 átomos de carbono em sua estrutura molecular (18:1 *cis*-9) (GILMORE et al., 2010), relacionado positivamente à melhora do perfil lipídico, à diminuição da resistência à insulina (CARVALHO et al., 2015) e do estresse oxidativo pós-prandial em indivíduos portadores de síndrome metabólica (PEREZ-MARTINEZ et al., 2011). De modo geral, atua também reduzindo o processo inflamatório envolvido nas doenças crônicas não transmissíveis (HLAIS et al., 2013; PERDOMO et al., 2015).

A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), é uma citocina que favorece o desenvolvimento da inflamação e da resistência à insulina. A IL-1 $\beta$  é gerada pelo inflamassoma NLRP3 que matura esta citocina. O ácido oleico por sua vez, inibe a secreção de IL-1 $\beta$  causada por AGS, pois perturba a ativação deste inflamassoma, aumentando a sensibilidade à insulina (PALOMER et al., 2018).

Mediante o exposto, supomos o acréscimo do óleo de castanha-do-Brasil à dieta poderia minimizar e/ou reverter os possíveis danos causados pelo excesso na massa corporal e seus efeitos na bexiga.

## 2 OBJETIVO

- a) Caracterizar os efeitos da dieta hiperlipídica na massa corporal dos animais aos 90 e 120 dias;
- b) Estudar por métodos quantitativos em microscopia de luz a ação da dieta hiperlipídica sobre os seguintes parâmetros da parede vesical de ratos: epitélio, colágeno total, colágeno entre a fibra muscular e o diâmetro das fibras musculares lisas;
- c) Testar a hipótese segundo a qual o óleo extraído das suas castanhas, quando acrescentado à dieta, minimiza as alterações provocadas pela dieta hiperlipídica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia da UERJ (CEUA/031/2013), segundo as recomendações contidas na Lei nº. 11.794 promulgada em novembro de 2008 e no padrão estabelecido pelo *Journal of Physiology* da Sociedade Britânica de Fisiologia.

Ratos Wistar (*rattus norvegicus*), machos, com 21 dias de idade provenientes do Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), receberam ração comercial da marca Labina<sup>®</sup> até completarem 60 dias de idade.

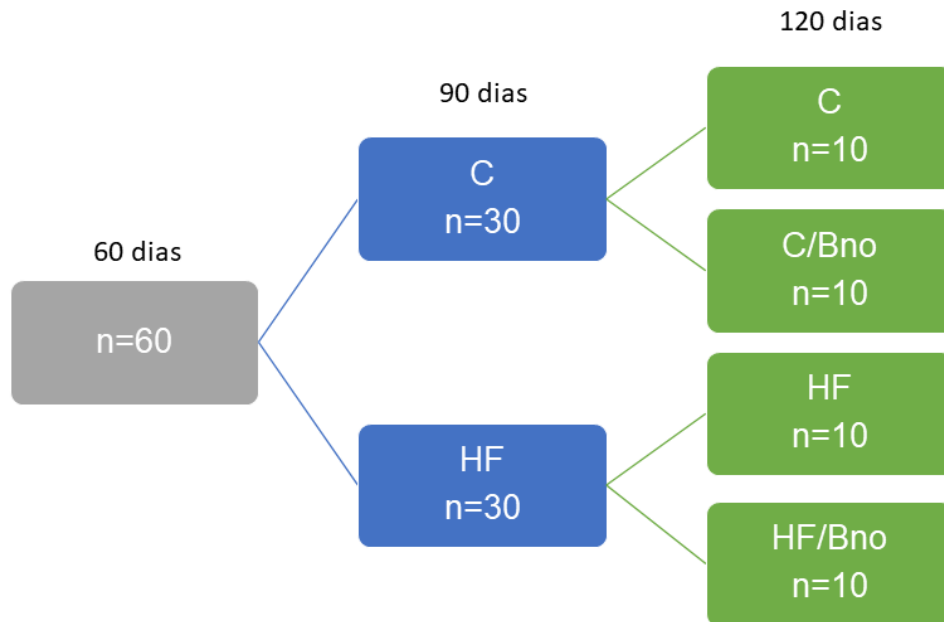
Aos 60 dias de idade, os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com as dietas experimentais, até os 90 dias de idade (Figura 6):

- Grupo controle - C (n = 30): dieta à base de caseína e óleo de soja a 4% (normolipídica), *ad libitum* (AIN 93-M).
- Grupo hiperlipídico - HF (n = 30): dieta à base de caseína e óleo de soja a 4% adicionada de 32% de banha de porco, *ad libitum* (AIN-93M).

Aos 90 dias, parte dos grupos C e HF (10 animais cada), foram sacrificados. Os animais restantes (40) foram novamente subdivididos, de acordo com a dieta a base de óleo de castanha, sendo acompanhados até os 120 dias de idade (Figura 5):

1. Grupo controle – C (n = 10): dieta à base de caseína e óleo de soja a 4% (normolipídica) (AIN 93-M), *ad libitum*;
2. Grupo Controle castanha-do-brasil – C/Bno (n = 10): dieta à base de caseína e 4% de óleo de soja adicionada de 15% de óleo de *Bertholettia excelsa* H.B.K., *ad libitum*.
3. Grupo hiperlipídico HF (n = 10): dieta à base de caseína e 4% de óleo de soja adicionada de 32% de banha de porco, *ad libitum*.
4. Grupo hiperlipídica castanha-do-brasil –HF/Bno (n = 10): dieta à base de caseína e 4% de óleo de soja adicionada de 15% de óleo de *Bertholettia excelsa* H.B.K., (AIN 93-M), *ad libitum*.

Figura 6 - Formação dos grupos experimentais



Legenda: Grupos - C (dieta controle); HF (dieta hiperlipídica); C (dieta controle aos 90 e 120 dias); C/Bno (dieta controle aos 90 dias e dieta a base de óleo de castanha aos 120 dias); HF (dieta hiperlipídica aos 90 e 120); HF/Bno (dieta hiperlipídica aos 90 dia e dieta a base de óleo de castanha aos 120 dias). Os animais foram mortos aos 90 dias e 120 dias de idade.

A ingestão alimentar e a massa corporal dos animais foram verificadas diária e semanalmente até o final do experimento, respectivamente. As dietas experimentais foram formuladas conforme a recomendação do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) para roedores (REEVES *et al.*, 1993), seguindo os percentuais de macronutrientes para indução da obesidade de acordo com Correia-Santos e colaboradores (2012).

Semanalmente, após a extração lipídica do óleo de castanha-do-brasil, os ingredientes das dietas foram pesados e homogeneizados em batedeira industrial Hobart®, com água fervente. A massa obtida foi desidratada em estufa ventilada a 50°C por 24 h e transformada em *pellets*, e após a identificação, armazenada sob refrigeração até seu uso. A composição nutricional das 3 dietas aplicadas no estudo encontra-se detalhada na tabela 1.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g/100g de ração)	Dieta	Dieta	Dieta
	controle (4%)	Hiperlipídica (32% BP)	Hiperlipídica (15% BP)
	%	%	%
<b>Caseína</b>	14,00	14,00	14,00
<b>Amido</b>	62,07	29,95	46,95
<b>Açúcar</b>	10,00	10,00	10,00
<b>Mix Minerais</b>	3,50	3,50	3,50
<b>Mix Vitaminas</b>	1,00	1,00	1,00
<b>Óleo de soja</b>	4,00	4,00	4,00
<b>Banha de porco</b>	-	32,00	-
<b>Óleo de Castanha</b>	-	-	15,00
<b>Celulose</b>	5,00	5,00	5,00
<b>B-colina</b>	0,25	0,25	0,25
<b>L-cistina</b>	0,30	0,30	0,30
<b>Valor energético (Kcal/ 100g)</b>	400,38	559,80	474,80

BP = banha de porco

O óleo da castanha-do-brasil (tabela 2) foi extraído por prensagem a frio em prensa hidráulica (Marconi<sup>®</sup>, modelo ME 098) em temperatura ambiente (31°C) e com pressão inicial de 3 e final de 12 toneladas.

Tabela 2 - Estratificação de lipídios do óleo de castanha-do-brasil

<b>ÁCIDO GRAXO</b>	<b>ESTRUTURA</b>	<b>NOME TRIVIAL</b>	<b>QUANTIDADE TOTAL (%)</b>
<i>SATURADOS</i>			<b>28,871</b>
Ácido tridecanóico	C13:0	-	4,103
Ácido tetradecanóico	C14:0	Ácido mirístico	0,068
Ácido pentadecanóico	C15:0	-	0,018
Ácido hexadecanóico	C16:0	Ácido palmítico	13,763
Ácido heptadecanóico	C17:0	Ácido margárico	0,077
Ácido octadecanóico	C18:0	Ácido esteárico	10,109
Ácido docosanóico	C22:0	Ácido behénico	0,130
Ácido tetracosanóico	C24:0	Ácido lignocérico	0,001
<i>MONOINSATURADO</i>			<b>70,022</b>
Ácido hexadecanóico	C16:1	Ácido palmitoléico	0,329
Ácido octadecanóico	C18:1	Ácido oléico	32,838
Ácido octadecanóico	C18:1 -11c	-	0,780
Ácido nonadecanóico	C19:1	-	35,728
Ácido tetrasenóico	C24:1	Ácido selacholéico	0,048
<i>POLIINSATURADOS</i>			<b>0,320</b>
Ácido eicosatrienóico	C20:3	-	0,052
Ácido eicosapentaenóico	C20:5 -3c	Ácido eicosapentaenóico	0,016
Ácido docosantrienóico	C22:3	-	0,060
Ácido eicosatetraenóico	C20:3 -6c	Ácido araquidônico	0,056
Ácido docosadienóico	C22:2	-	0,208
Ácido docosatetraenóico	C22:4	Ácido adrênico	0,010

### 3.1 Morfometria da bexiga urinária

Aos 90 e 120 dias, os animais foram anestesiados com ketamina (3,0 mg) e xilazina (0,6 mg) para cada 100 g de massa corporal por via intraperitoneal. As bexigas foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 4% seguindo-se o procedimento da rotina histológica do laboratório para inclusão em parafina.

Cortes de 5 $\mu$ m de espessura foram corados por Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Masson, Picrosirius e ácido periódico de Schiff (PAS) para a análise morfométrica. Os parâmetros analisados foram a altura do epitélio, o colágeno total, o colágeno entre as fibras musculares lisas do musculo detrusor e o diâmetro das fibras musculares do detrusor.

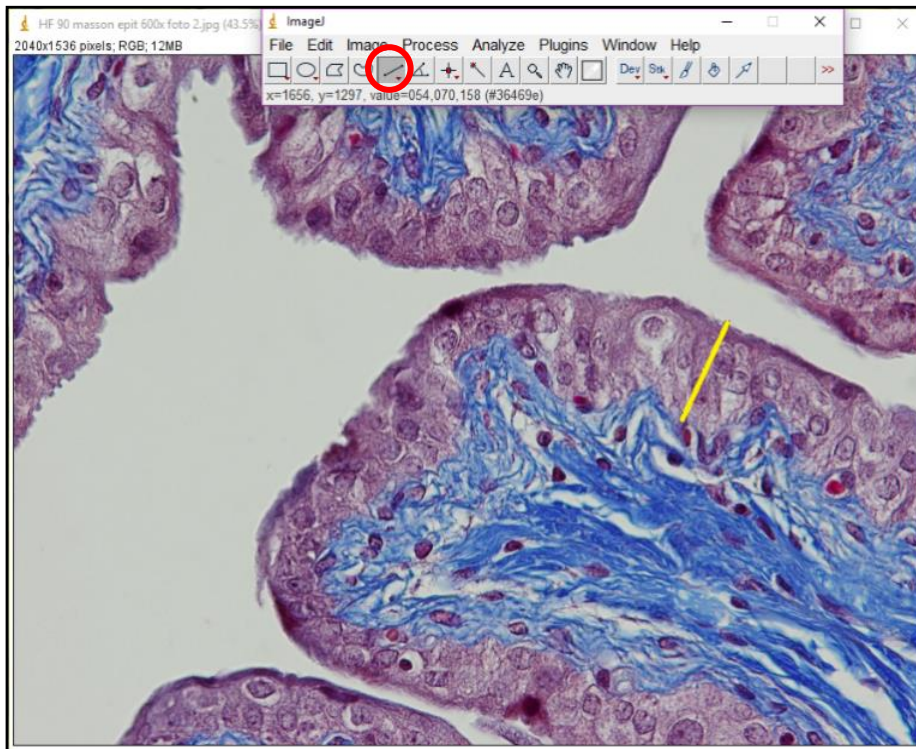
Para a avaliação desses parâmetros, fotomicrografias da bexiga urinária foram obtidas com câmara digital (Olympus DP70 - Tokyo, Japão) acoplada a um microscópio de luz BX51 (Tokyo, Japão). Foram utilizadas objetivas planapocromáticas com aumentos de 20, 60 e 100 vezes.

Dados morfométricos foram obtidos utilizando-se o Software Image J<sup>®</sup> (Image Processing and Analysis in Java). A altura do epitélio e o diâmetro das fibras musculares lisas foram determinados usando-se o plugin “*straight line selections*”. Foram feitas 5 medidas para cada parâmetro analisado, após calibração. Para a altura do epitélio foi traçada uma linha reta que compreendia a distância entre a membrana basal e o ápice da célula epitelial, utilizando-se um aumento de 600x (figura 7). O diâmetro das fibras foi aferido utilizando-se em cada campo somente aqueles cortes em que as fibras apresentavam secções aproximadamente circulares. Foram feitas duas medidas em cruz para cada fibra e o resultado utilizado foi a média entre as medidas. O aumento foi de aproximadamente 1000x (figura 8).

A determinação das quantidades de colágeno do músculo detrusor e do colágeno total foi realizada com o plugin “*cell counter*” com objetiva 100x e 20x respectivamente, utilizando-se o mesmo Software. Uma grade de 99 cruces foi sobreposta às fotomicrografias por meio da ferramenta “*grid*” (figura 9). O quadrante superior direito de cada cruz foi padronizado como referencial para a realização da contagem. O número de cruces sobrepostas às estruturas quantificadas no colágeno do músculo e no colágeno total foi multiplicado por 100 e dividido por 99, a fim de corrigir a porcentagem para as 99 cruces utilizadas como sistema de teste (figura 10). Desta forma, estes resultados foram considerados como a densidade de superfície de cada uma das estruturas analisadas, expressa em porcentagem. Para todas essas análises, foram considerados 5 (cinco) campos/animal.

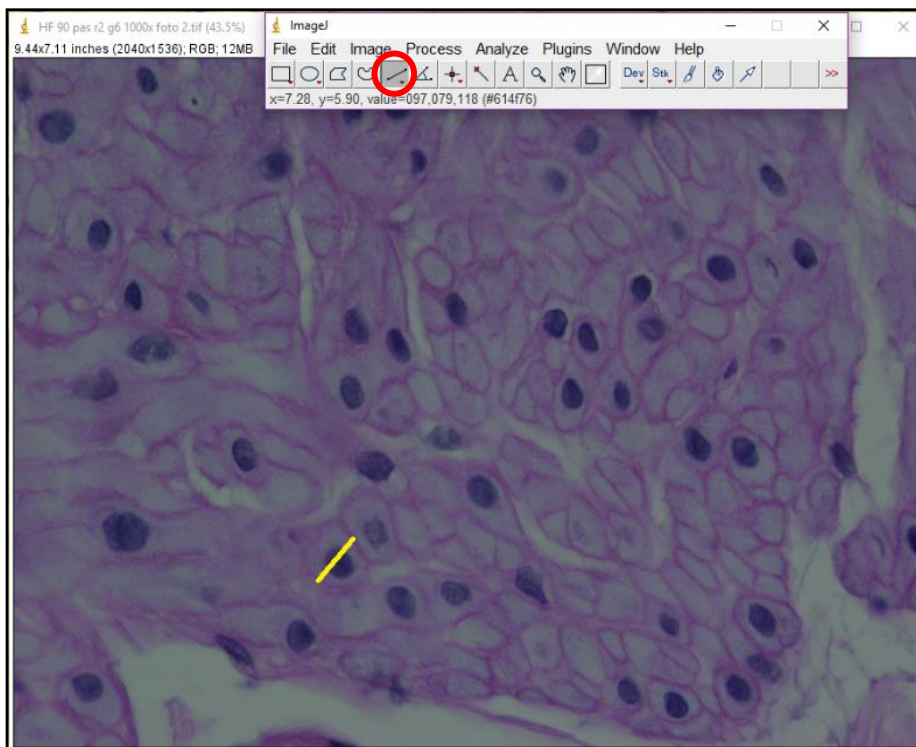


Figura 7 - Análise morfométrica da altura do epitélio na bexiga urinária



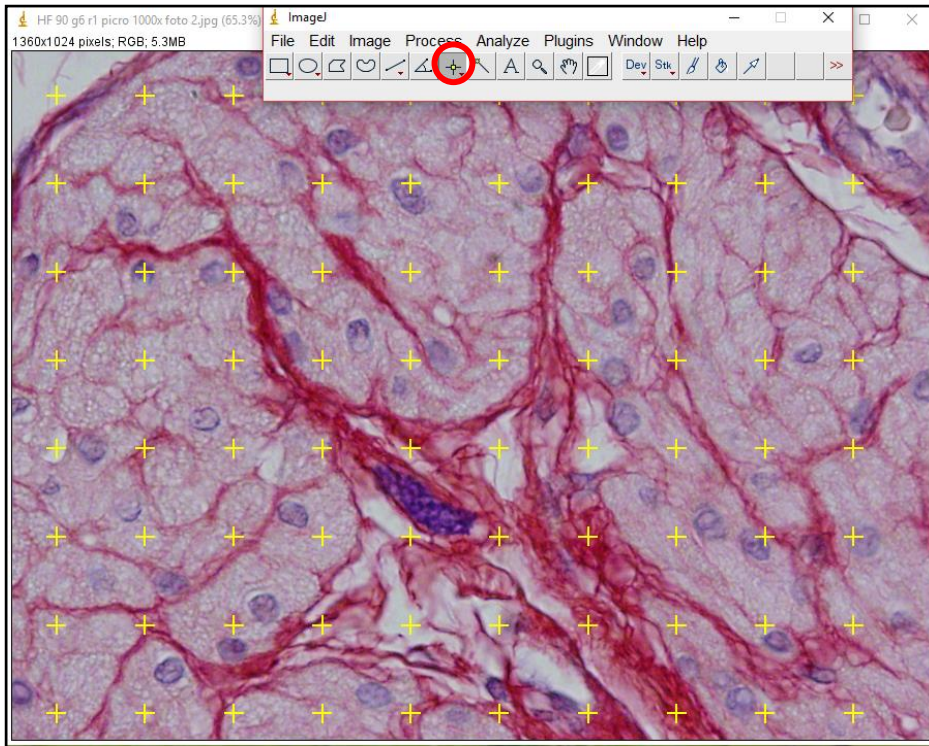
Legenda: Quantificação da altura do epitélio na bexiga urinária, objetiva de 60x.  
Fonte: Costa-Souza A, 2019.

Figura 8 - Análise morfométrica do diâmetro da fibra muscular na bexiga urinária



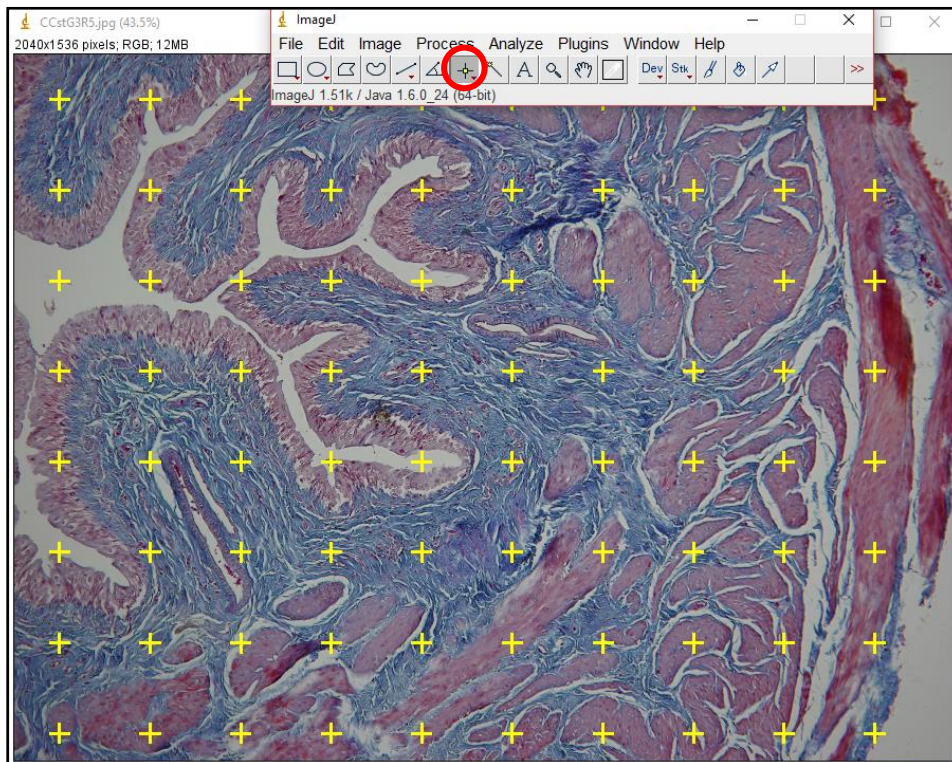
Legenda: Quantificação do diâmetro da fibra muscular na bexiga urinária, objetiva 100x.  
Fonte: Costa-Souza A, 2019.

Figura 9 - Análise morfométrica do percentual de colágeno na bexiga urinária



Legenda: Quantificação do percentual de colágeno na bexiga urinária, objetiva 100x.  
Fonte: Costa-Souza A, 2019.

Figura 10 - Análise morfométrica do percentual de colágeno total na bexiga urinária



Legenda: Quantificação do percentual de colágeno total na bexiga urinária, objetiva 20x.  
Fonte: Costa-Souza A, 2019.

### 3.2 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos aos 90 dias foram calculadas por teste *t-Student* não pareado, e os grupos aos 120 dias foram calculadas por análise de variância (*One-way* ANOVA e *Two-way* ANOVA) seguido de pós-teste de *Bonferroni*.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (*GraphPad Prism version 5.03 for Windows - GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). A *two-way* ANOVA não visa apenas avaliar o efeito principal de cada variável independente mas também se há alguma interação entre elas. No caso o fator tempo.

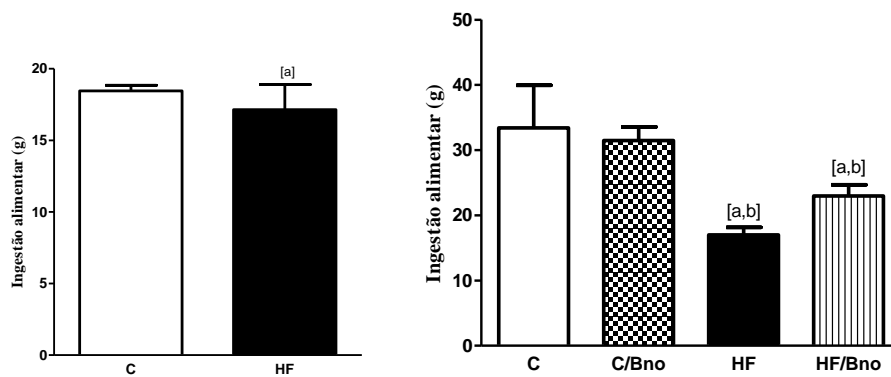
### 3 RESULTADOS

A ingestão alimentar (em gramatura) foi menor nos animais que receberam a dieta hiperlipídica aos 90 dias (C:  $18,45 \pm 0,09\text{g}$ , HF:  $17,14 \pm 0,38\text{g}$ ,  $p < 0,0001$ ) e 120 dias (C:  $33,40 \pm 6,56\text{g}$ , C/Bno:  $31,46 \pm 2,11\text{g}$ , HF:  $17,00 \pm 1,15\text{g}$ , and HF/Bno:  $22,97 \pm 1,72\text{g}$ ,  $p < 0,0001$ ) em relação aos seus respectivos controles (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Representação da ingestão alimentar (g) dos animais

90 dias

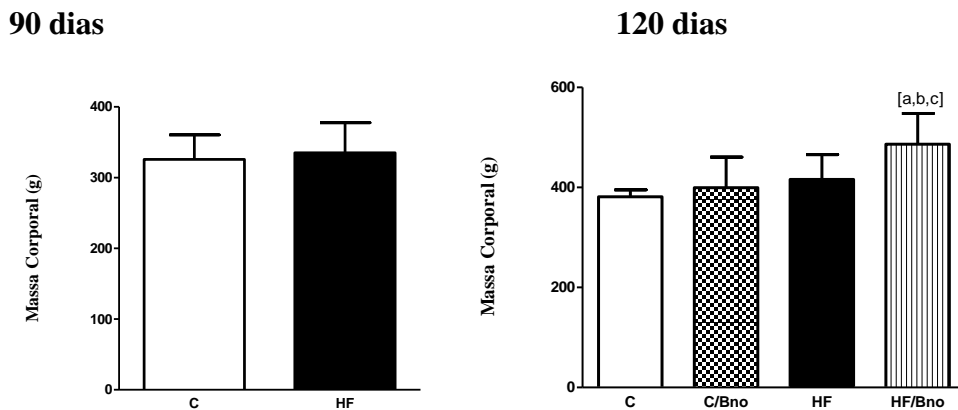
120 dias



Legenda: Ingestão alimentar (g) dos animais aos 90 e 120 dias de idade. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, analisados por teste t (90 dias) e *One-way* ANOVA (120 dias). [a], quando  $\neq$  C; [b], quando  $\neq$  C/Bno, considerando  $p < 0,05$ .

Quanto à massa corporal, não foram observadas diferenças aos 90 dias. Aos 120 dias, o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica a base de óleo de castanha mostrou sobrepeso quando comparado aos outros grupos experimentais (C:  $381,30 \pm 14,00\text{g}$ , HF:  $416,00 \pm 49,51\text{g}$ , HF/Bno:  $486,60 \pm 61,21\text{g}$ ,  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação da massa corporal (g) dos animais

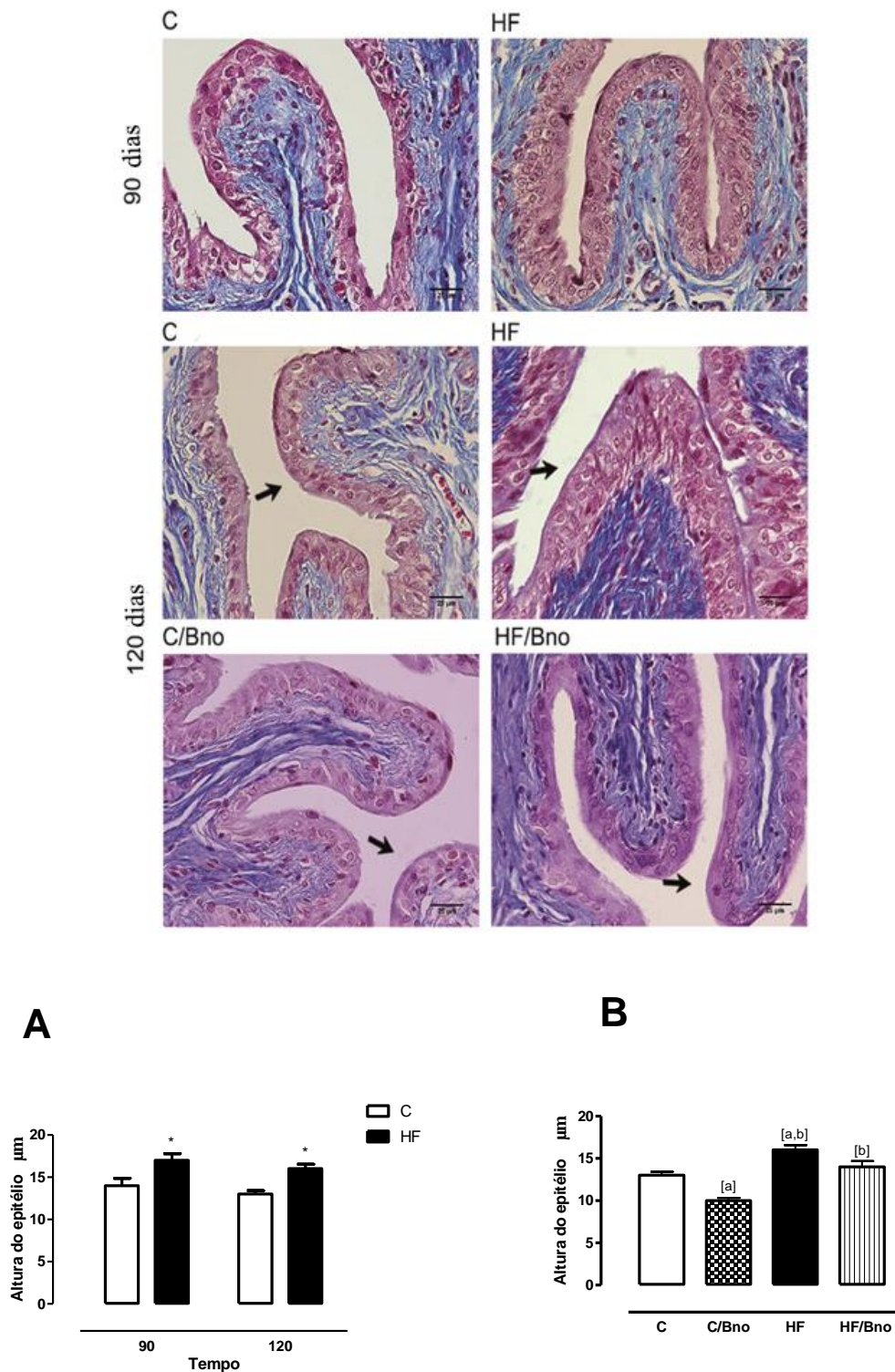


Legenda: Massa corporal (g) dos animais aos 90 dias e aos 120 dias de idade. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, analisados por teste t (90 dias) e *One-way* ANOVA (120 dias). [a], quando  $\neq$  C; [b], quando  $\neq$  C/Bno; [c], quando  $\neq$  HF, considerando  $p < 0,05$ .

#### 4.1 Análise Histológica

Os animais que receberam dieta hiperlipídica aos 90 dias apresentaram um aumento significativo (+22%) da altura do epitélio e os valores foram mantidos aos 120 dias (Figura 11A). A análise de Two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo da dieta e da interação entre dieta e tempo sobre o resultado, indicando que não houve um efeito significativo apenas do tempo. A Figura 11 B, mostra que o grupo HF, que permaneceu com a dieta hiperlipídica, apresentou um aumento significativo (+23%,  $p < 0,01$ ) da altura do epitélio em comparação ao grupo C. Ao contrário, o grupo C/Bno apresentou a altura do epitélio menor quando comparado aos grupos C (-23%,  $p < 0,01$ ), HF (-38%,  $p < 0,0001$ ) e HF/Bno (-28%,  $p < 0,0001$ ).

Figura 11 - Fotomicrografia do epitélio da parede da bexiga

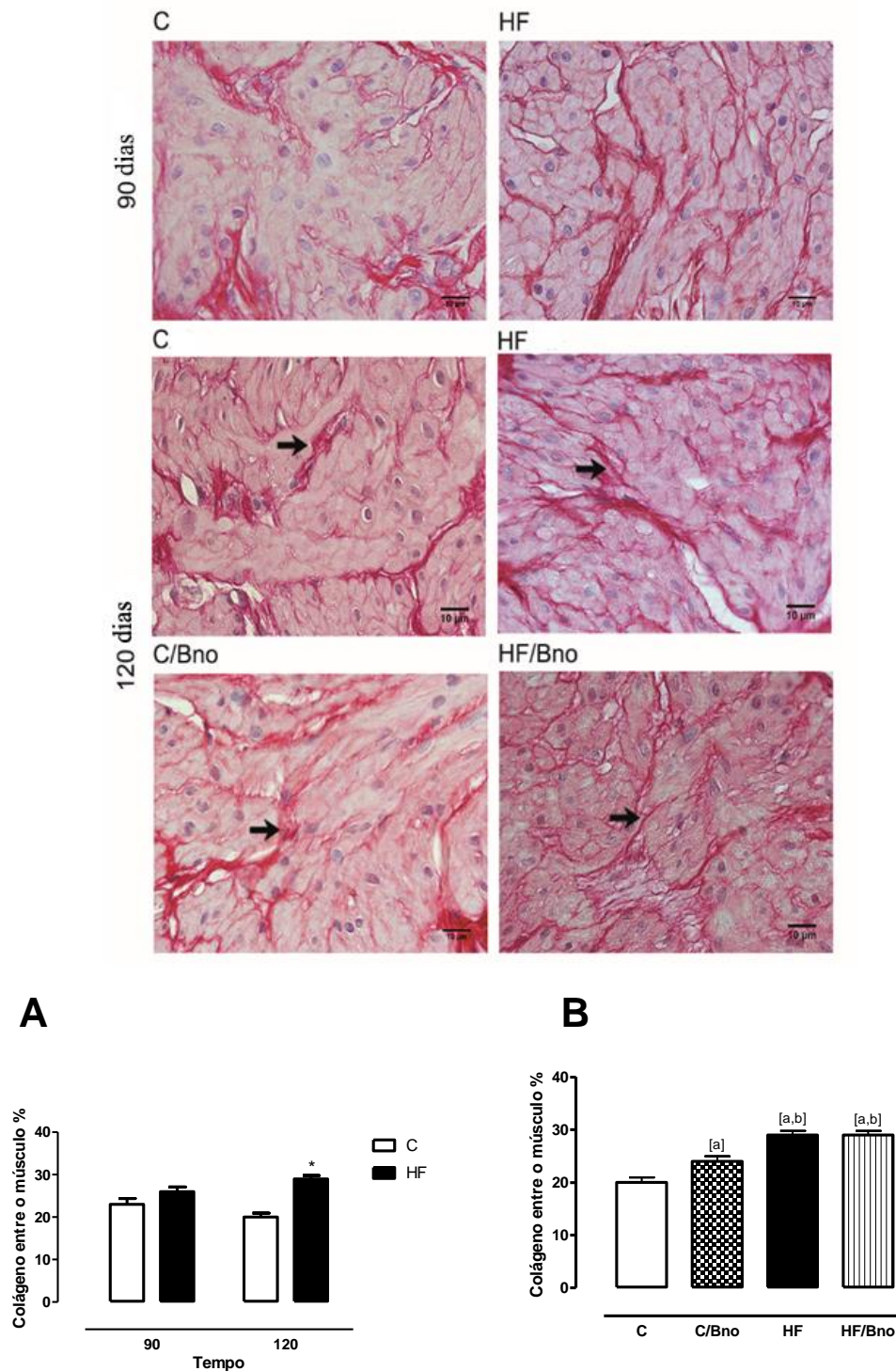


Legenda: Fotomicrografia mostrando a altura do epitélio (Tricrômico de Masson. 60X). A - ratos submetidos a dietas controle e com alto teor de gordura aos 90 e 120 dias, analisados por *Two-way* ANOVA e teste t; [\*], quando  $\neq$  grupo C. B - ratos submetidos a diferentes dietas aos 120 dias. Os dados foram analisados por *One-way* ANOVA; [a], quando  $\neq$  C; [b], quando  $\neq$  C/Bno. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: Costa-Souza A, 2019.

A figura 12A mostra a percentagem de colágeno presente no músculo detrusor. Aos 90 dias não houve diferença significativa entre os grupos, mas aos 120 dias houve um aumento significativo (+30%) na percentagem de colágeno no grupo HF (Figura 12A). A análise de *Two-way* ANOVA mostrou que houve um efeito significativo da dieta e da interação entre dieta e tempo sobre o resultado, porém não houve um efeito significativo apenas do tempo. Aos 120 dias, observa-se na Figura 11B, que tanto o grupo de dieta hiperlipídica (HF) como os de dieta de óleo de castanha (C/Bno e HF/Bno) apresentaram maior percentagem de colágeno no músculo (+45%,  $p < 0,001$ ; +17%,  $p < 0,001$ ; e +45%,  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação ao grupo C. Porém, o grupo C/Bno mostrou ainda menor percentagem de colágeno comparado aos grupos HF e HF/Bno (-20%,  $p < 0,01$ ).

Figura 12 - Fotomicrografia do colágeno do músculo



Legenda: Fotomicrografia mostrando o colágeno do músculo detrusor (Picosirius 1000X ). A - ratos submetidos a dietas controle e com alto teor de gordura aos 90 e 120 dias, analisados por Two-way ANOVA e teste t; [\*], quando  $\neq$  grupo C. B - ratos submetidos a diferentes dietas aos 120 dias. Os dados analisados por One-way ANOVA; [a], quando  $\neq$  C; [b], quando  $\neq$  C/Bno. Os valores apresentam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: Costa-Souza A, 2019.



A Figura 13 A mostra que os animais que receberam dieta HF apresentaram aumento significativo do diâmetro da fibra aos 90 dias. O aumento desse parâmetro se manteve até os 120 dias. A análise do *Two-way* ANOVA mostrou que houve um efeito significativo da dieta e da interação entre dieta e tempo sobre o resultado, porém não houve um efeito significativo apenas do tempo. Na Figura 13B observa-se que ambos os grupos de dieta hiperlipídica apresentou maior diâmetro das fibras musculares (+34%,  $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo controle (C). O grupo C/Bno apresenta novamente menores valores comparado aos grupos HF e HF/Bno (-30%,  $p < 0,001$ ).

Figura 13 - Fotomicrografia do diâmetro do detrusor

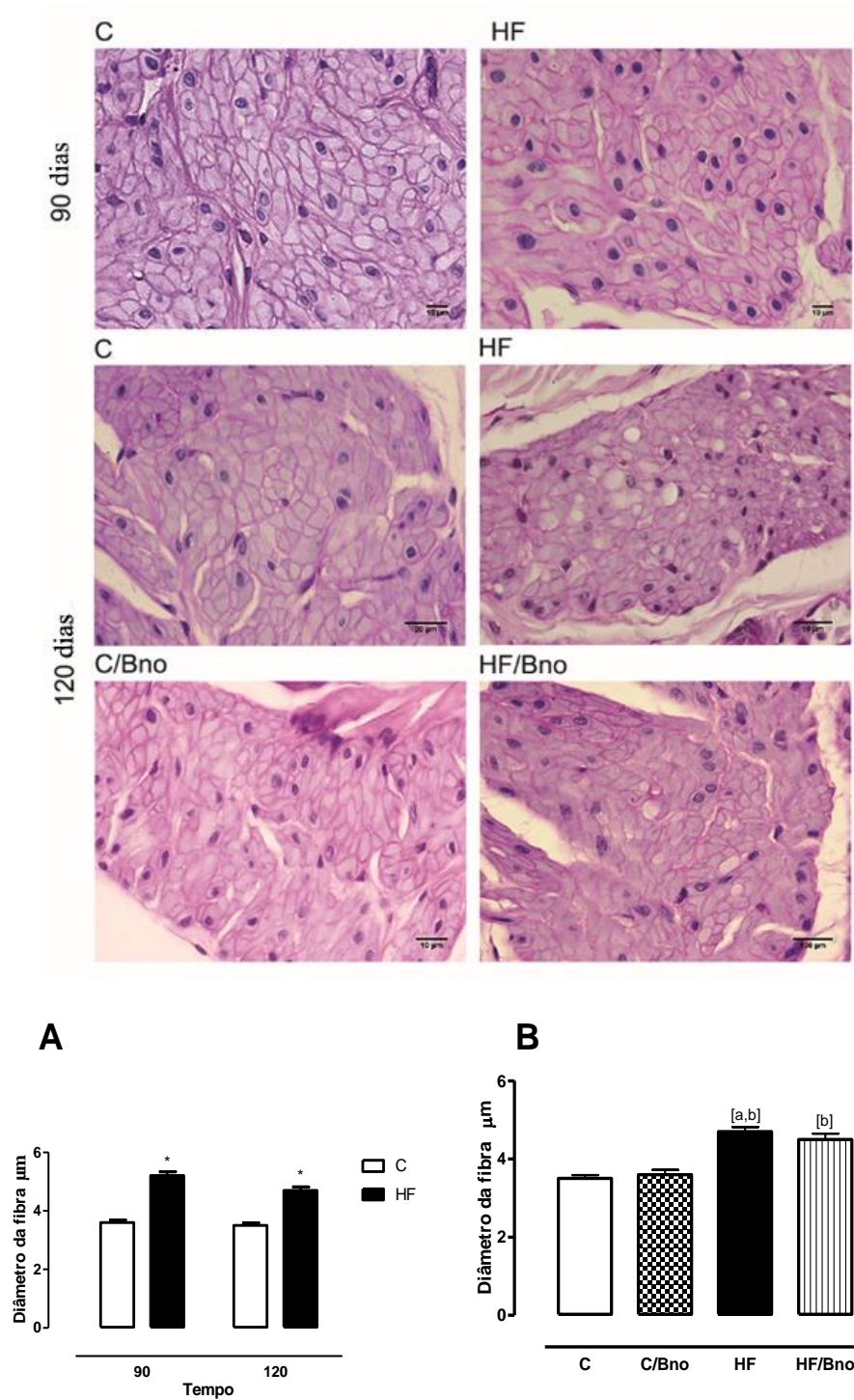
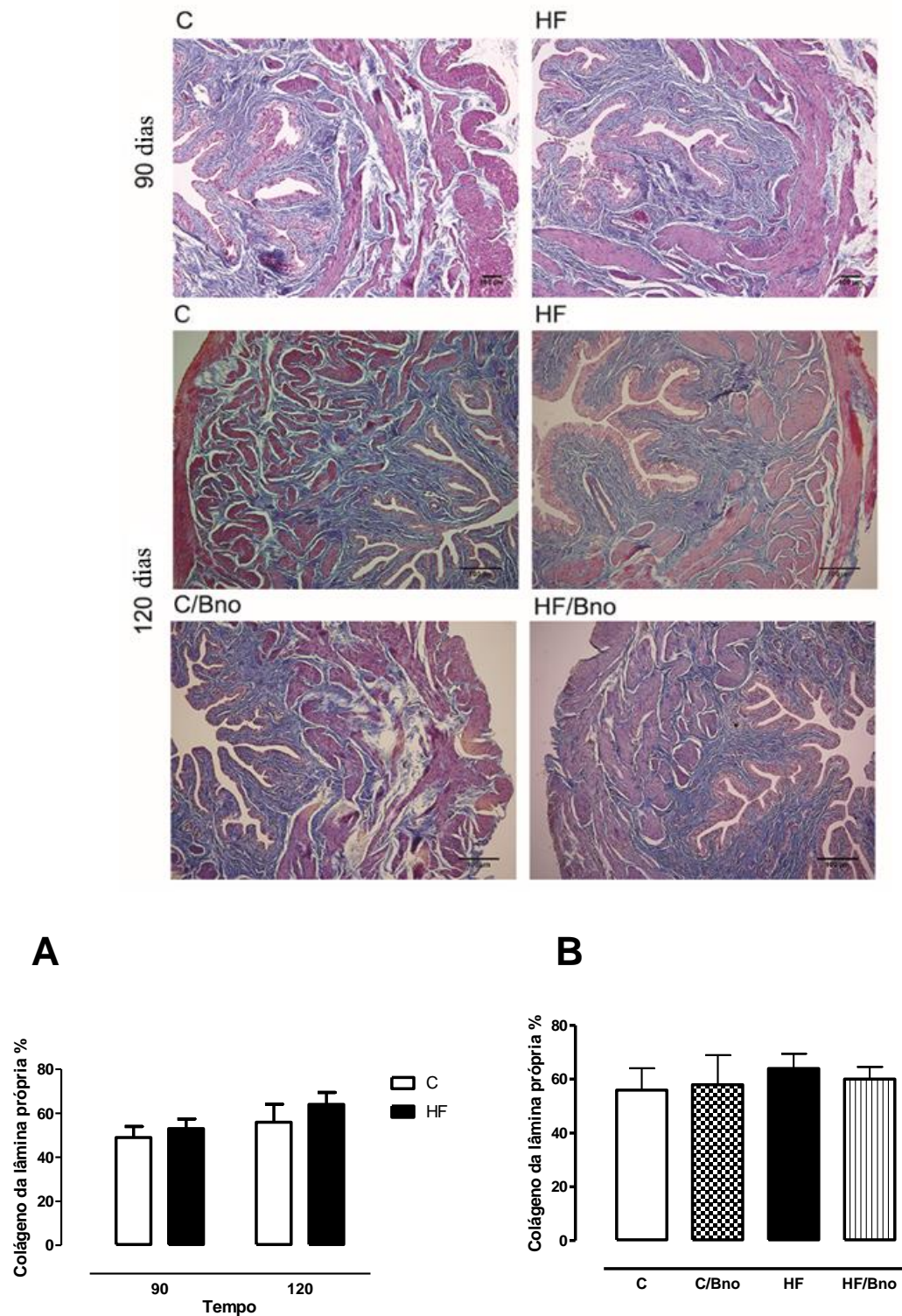


Figura.13: Fotomicrografia mostrando o diâmetro do detrusor (PAS 600X). A-ratos submetidos a dietas controle e com alto teor de gordura aos 90 e 120 dias, analisados por Two-way ANOVA e teste t; [\*], quando  $\neq$  grupo C. B - ratos submetidos a diferentes dietas aos 120 dias. Os dados analisados por One-way ANOVA; [a], quando  $\neq$  C; [b], quando  $\neq$  C/Bno. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: Costa-Souza A, 2019.

A figura 14 mostra que a percentagem de colágeno, presente na parede vesical, não se alterou de maneira significativa em nenhum dos grupos estudados.

Figura 14 - Fotomicrografia colágeno total na parede da bexiga



Legenda: Fotomicrografia do colágeno total na parede da bexiga (Tricrômico de Masson 200X). A - ratos submetidos a dietas controle e com alto teor de gordura aos 90 e 120 dias, analisados por Two-way ANOVA e teste t. B - ratos submetidos a diferentes dietas aos 120 dias. Os dados foram analisados por One-way ANOVA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: Costa-Souza A, 2019.

### 3 DISCUSSÃO

O uso de plantas para se obter produtos medicinais é tão antigo quanto a história da humanidade. Resultados obtidos ao longo dos anos proporcionaram conhecimentos promissores na área da saúde incentivando novas pesquisas.

Dados epidemiológicos mostraram que o aumento da massa corporal em adultos está ligado a uma prevalência de sintomas do trato urinário inferior levando à hiperatividade do músculo detrusor (LI et al., 2018). A potencial etiologia e os fatores que contribuem para a hiperatividade vesical ainda permanecem obscuros. No entanto a obesidade é um fator bem conhecido como causa da hiperatividade vesical (LI et al., 2018). As mudanças observadas na bexiga dos ratos e causadas pela ingestão da dieta HF permitiram hipotetizar, baseados nas propriedades dos elementos encontrados na castanha do Brasil, se o óleo extraído desta semente exerce algum tipo de ação benéfica nos componentes da parede da bexiga. Ou seja, se ele reverte ou minimiza os efeitos deletérios provocados pela dieta hiperlipídica à qual os animais foram submetidos.

A análise biométrica dos animais que receberam dietas HF mostraram que eles apresentaram maior massa corporal, apesar da menor ingestão de alimentos. Esse achado pode ter sido uma consequência do comportamento dietético do rato que, na presença de uma dieta hiperenergética passa a ajustar a quantidade de alimento ingerida com o mesmo valor energético. Apesar de ingerir menos os ratos ganharam mais peso, o que se deve à maior eficiência da dieta HF em acumular tecido adiposo (TOWNSEND; LORENZI; WIDMAIER, 2008).

As disfunções do trato urinário inferior são frequentemente associadas às dietas HF (AIZAWA; HOMMA; IGAWA 2013; OBERBACH et al., 2013). A ingestão de gorduras, como a banha de porco, por exemplo, afeta negativamente o metabolismo de carboidratos e maximizam os danos em diferentes órgãos do sistema urogenital (FURRIEL et al., 2014; MEDEIROS JÚNIOR et al., 2014). A bexiga, apesar dos importantes problemas miccionais que acometem este órgão, ainda não foi suficientemente investigada quando o animal é submetido a uma dieta HF.

O metabolismo dos ácidos graxos está relacionado a diferentes funções celulares e pode ser observado nos mecanismos de proliferação celular. A dieta HF a que os animais foram submetidos provavelmente provocou a circulação de ácidos graxos livres mediando os efeitos biológicos

ligados à proliferação celular resultando no aumento da altura epitelial como foi observado no presente estudo (OBERBACH et al., 2013).

Os efeitos terapêuticos da castanha-do-Brasil já foram mostrados em diferentes órgãos como, por exemplo, no sistema cardiovascular (ROS et al., 2004; ROS, 2009). No entanto, esses trabalhos que pretenderam evidenciar as propriedades medicinais da castanha do Brasil utilizaram a própria castanha. Diferentemente, o nosso trabalho usou o óleo da castanha do Brasil cuja composição difere da composição castanha. Isto ocorre porque na prensagem para a fabricação do óleo a sua composição se modifica. O mecanismo pelo qual ocorre esta mudança ainda não foi totalmente esclarecido. Portanto, propriedades do óleo não são semelhantes às da castanha e em consequência os efeitos podem não ser semelhantes. A nossa opção foi produzir e testar o óleo da forma como ele é comumente encontrado e comercialmente vendido para diferentes fins.

A maioria dos estudos, focando obesidade e bexiga urinária, mostraram as alterações fisiológicas sem caracterizar as alterações morfológicas que, em última análise, são as responsáveis pelas diferentes comorbidades.

Os resultados mostraram que a adição de óleo da castanha-do-Brasil tanto nas dietas controle quanto nas dietas de HF diminuiu significativamente a altura epitelial, caracterizando uma ação protetora que minimizou o efeito da dieta hiperlipídica. Esse efeito benéfico está provavelmente associado a quantidades significativas de ácido oleico (32,83%) e ácido esteárico (10,09%) no óleo da castanha-do-Brasil, conforme a tabela apresentada em *Material e Método*, ambos importantes agentes no controle dos mecanismos de proliferação celular (NAVARRO-TITO et al., 2010). Apoiando esta possibilidade, os estudos mostraram que células cancerígenas da bexiga podem ter um aumento do metabolismo lipídico. Navarro-Tito et al., (2010) verificaram que a administração de ácido oleico a células epiteliais mamárias não tumorais é incapaz de induzir a secreção de metaloproteinase-9 e dessa forma controlar melhor a proliferação celular. Por outro lado, altos níveis de ácidos esteárico e oléico são importantes indicadores da tumorigênese da bexiga (MIRYAGHOUBZADEH et al., 2013).

O músculo detrusor da parede vesical é o responsável pela regulação das funções da bexiga. Estudos fisiológicos mostraram a influência das dietas de HF nas fibras musculares afetando as funções-mitocôndrias por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa e a diminuição das defesas antioxidantes endógenas (LAMBERTUCCI et al., 2012). Em nossa análise, que ficou restrita aos aspectos morfológicos, encontramos um aumento significativo no diâmetro da fibra muscular nos animais alimentados com a dieta HF. No

entanto, diferentemente de seu efeito sobre as células epiteliais, o óleo de castanha-do-Brasil não exerceu nenhum efeito aparente sobre as fibras musculares quando adicionada à dieta controle ou quando adicionada à dieta HF.

A dieta HF também atuou no músculo detrusor aumentando a produção de colágeno significativamente (30%) aos 120 dias. Um crescimento anômalo do colágeno nesse músculo pode inibir a contratilidade da bexiga e a condução do impulso elétrico através da parede vesical. Esse aumento já foi observado em bexigas cronicamente obstruídas em homens adultos (SEMINS et al., 2012). Nossos dados suportam, portanto, estudos fisiológicos e explicam as alterações funcionais que são afetadas pelo aumento da produção de colágeno.

O colágeno é o componente fibroso do tecido conjuntivo responsável pela resistência tensil (MARTIN E ISHIDA, 1989). Dietas baseadas em gordura animal parecem estar ligadas à proliferação do estroma da bexiga (LEVIN et al., 2002). As dietas de HF promovem aumento da síntese de FGF- $\beta$  (fator de crescimento de fibroblastos beta), o que acarreta um aumento na produção de colágeno no compartimento estromal da bexiga (ALTUNTAS et al., 2012). Surpreendentemente a análise quantitativa do colágeno encontrado na mucosa e submucosa da parede vesical não apresentou aumento, tal como foi observado no colágeno do músculo detrusor. Foi observado também que a adição de óleo de castanha do Brasil não interferiu nesse parâmetro, ou seja, no aumento ou na diminuição do colágeno estromal. É possível que os ácidos graxos saturados presentes no óleo possam aumentar a taxa de mortalidade celular, reduzir a capacidade antioxidante total e aumentar a peroxidação lipídica. No entanto, ainda não está claro como esses ácidos graxos influenciariam o comportamento do colágeno (MANUEL et al., 2018).

Devemos assinalar, ao final desta discussão, que o presente trabalho utilizou o óleo de castanha-do-Brasil obtido após prensagem, o que causou a perda de alguns elementos importantes encontrados na semente como por exemplo o selênio. Seria desejável que um grupo de animais fosse alimentado com uma dieta na qual a noz seria triturada, ao invés de prensada, e posteriormente misturada à dieta controle produzindo assim resultados mais conspícuos em relação ao efeito protetor da castanha do Brasil. Este experimento está sendo realizado em nosso laboratório para testar esta hipótese.

## CONCLUSÃO

Dietas hiperlipídicas estão associadas a danos na parede da bexiga como aumento da altura epitelial, diâmetro das fibras musculares e colágeno no músculo detrusor. Essas alterações morfológicas dos parâmetros analisados na parede da bexiga dos ratos foram parcialmente revertidas pelo óleo de castanha-do-Brasil.



## REFERÊNCIAS

ABESO. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 4 ed. São Paulo: ABESO, 2016:15-60.

Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Influence of High Fat Diet Feeding for 20 Weeks on Lower Urinary Tract. Function in Mice. LUTS Low Urin Tract Symptoms 2013;5:101-8.

Altuntas CZ, Daneshgari F, Izgi K, Bicer F, Ozer A, Ozer A, et al. Connective tissue and its growth factor CTGF distinguish the morphometric and molecular remodeling of the bladder in a model of neurogenic bladder. Am J Physiol Renal Physiol. 2012;303:1363–9.

Anatomia e Fisioterapia. Disponível em:

<<https://sites.google.com/site/anatomiafisioterapia/roteiros-praticos/sistema-urinario>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

Andrade PMM, Carmo MGT. N-3 fatty acids: a link between eicosanoids, inflammation and immunity. Journal of Metabolism and Nutrition. 2006;8:135-43.

Afshin A, et. al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. N Engl J Med. 2017;317:1-15.

Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Iii ERM, Conlin PR, et al. Effects of Protein, Monounsaturated Fat , and Carbohydrate Intake on Blood Pressure Results of the OmniHeart Randomized Trial. JAMA 2005;294:2455-64.

Baskin L, DiSandro M, Li Y, Li W, Hayward S, Cunha G. Mesenchymal-Epithelial Interactions in Bladder Smooth Muscle Development : Effects of the Local Tissue Environment. J Urol 2001;165:1283–8.

Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple. Reprod Biomed Online 2015;31:652-67.

Bazzano MV, Sarrible GB, Martinez N, Astrada MBde, Elia EM. Obesity alters the uterine environment before pregnancy. J Nutr Biochem 2018;62:181-91.

BRASIL. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados br. 1a edição ed. Brasília: [s.n.], 2016. 160 p. 9788533419568.

Campos-Silva P, Furriel A, Costa WS, Sampaio FJB, Gregório BM. Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. Int Braz J Uro 2015;41:569–75.

Capodaglio P, Liuzzi A. Obesity: a disabling disease or a condition favoring disability? Eur J Phys Rehabil Med 2013;49:395-8.

Cardoso BR, Duarte GBS, Reis BZ, Cozzolino SMF. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food Res Int* 2017;100:9-18.

Cardoso MA. *Nutrição Humana: nutrição e metabolismo*. I Koogan G.; 2010.

Cascio G, Schiera G, Di Liegro I. Dietary Fatty Acids in Metabolic Syndrome, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Curr Diabetes Rev* 2012;8:2-17.

Carvalho RF, Huguenin VGB, Luiz RR, Moreira ASB, Oliveira GMM, Rosa G. Intake of partially defatted Brazil nut flour reduces serum cholesterol in hypercholesterolemic patients - a randomized controlled trial. *Nutr J*. 2015;14:1-9.

Castanha-do-brasil: benefícios e cuidados. 2017. Disponível em: <  
<http://www.saboravida.com.br/gastronomia/2017/04/23/castanha-do-brasil-beneficios-e-cuidados/>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

Chunhieng, Thavarith *et al*. Recent analysis of the composition of Brazil nut *Bertholletia excelsa*. *BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES*, 2004, N° 280 (2) FORÊTS AMAZONIENNES v. 280, n. 2, p. 91–98, 2004.

Cominetti C, De Bortoli MC, Garrido AB, Cozzolino, SMF. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutr Res* 2012;32:403–7.

Correia-Santos MA, Suzuki A, Anjos SJ, Rêgo ST, Almeida CLK, Boaventura TG. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2012;45:436–44.

Cozzolino SMF & Cominetti C. *BASES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DA NUTRIÇÃO* 1ª Ed. Editora Manole; 2013.

De Oliveira FA, De Souza DB, Gallo CBM, Costa WS, Sampaio FJ, Gregório BM. Resveratrol attenuates metabolic, sperm and testicular changes in adult Wistar rats fed a cafeteria dietary. *Asian J Androl*.2018;20:1-7.

El-Badawi A, Schenk EA. Dual innervation of the mammalian urinary bladder. A histochemical study of the distribution of cholinergic and adrenergic nerves. *Am J Anat* 1966;119:405-27.

Ferreira-Hermosillo A, Salame-Khouri L, Cuenca-Abruch D. Pharmacological treatment of obesity. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2018;56:395-409

Ferreira ES, Silveira CS, Lucien VG, Amaral AS. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). *Alim Nutr*. 2006;17:203-8.

Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*.2006;84:762–73.

Franco G. Tabela de composição química dos alimentos 9º Ed. Editora Atheneu; 2008.

Furriel A, Campos-Silva P, Silva PCGP, Costa WS, Sampaio FJB, Gregório BM. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids induce morphological alterations in the rat ventral prostate. *PLoS One* 2014;9:1-9.

Gilmore LA, Walzem RL, Crouse SF, Smith DR, Adams TH, Vaidyanathan V, et al. Consumption of High-Oleic Acid Ground Beef Increases HDL-Cholesterol Concentration but Both High- and Low-Oleic Acid Ground Beef Decrease HDL Particle Diameter in Normocholesterolemic Men. *J Nutr* 2011;141:1188-94.

Hammad SS, Jonnes PJ. Dietary Fatty Acid Composition Modulates Obesity and Interacts with Obesity- Related Genes. *Lipids* 2017;52:803-22.

Hlais S, El-Bistami D, El Rahi B, Mattar MA, Obeid OA. Combined Fish Oil and High Oleic Sunflower Oil Supplements Neutralize their Individual Effects on the Lipid Profile of Healthy Men. *Lipids* 2013;48:853–61.

Hariri N, Thibault L: High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010;23:270–99.

Huguenin GVB, Oliveira GMM, Moreira ASB, Saint'Pierre TD, Gonçalves RA, Pinheiro-Mulder AR et al.,. Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects. *Nutr J.* 2015;14:1-10.

Jornal da USP. Direto da Amazônia, livro revela como a castanha-do-pará ganhou o mundo. 2017. Disponível em: < <https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-humanas/direto-da-amazonia-livro-revela-como-a-castanha-do-para-ganhou-o-mundo/>> Acesso em: 22 jan. 2019.

Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho Urinário. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004:371- 89.

Kim MK, Kogan BA, Massad CA, Huang Yi-C. Collagen and elastin in the normal fetal bladder. *The J of urol.* 1991;146:524-7.

Komorniak N, Stachowska E. Surgical treatment of obesity from the nutritional point-of-opportunities and dangers. *Pol Med J* 2018;269:179-84.

Kluczkovski AM, Martins M, Mundim SM, Simões RH, Nascimento KS, Marinho HA, et al. Properties of Brazil nuts: A review. *Afr. J. Biotechno.* 2015;13: 642-8.

Kovesdy CP, Furth SL, Zoccali C. Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic. *Afr J Prim Health Care Fam Med* 2017;43:346–54.

Lambertucci RH, Leandro CG, Vinolo MA, Nachbar RT, Dos Reis Silveira L, Hirabara SM, et al. The Effects of Palmitic Acid on Nitric Oxide Production by Rat Skeletal Muscle: Mechanism via Superoxide and iNOS Activation. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30:1169-80.

Levin RM, Chichester P, Hass MA, Gosling JA, Buttyan R. Obstructive Bladder Dysfunction : Morphological, Biochemical and Molecular Changes. *Eur Urol Suppl* 2002;1:14–20.

Li N, Ding H, Li Z, Liu Y, Wang P. Effect of high-fat diet-induced obesity on the small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel function affecting the contractility of rat detrusor smooth muscle. *Int Urol Nephrol* 2018;1-12.

Lima MLRP, Leite LHR, Gioda CR, Leme FOP, Couto CA, Coimbra CC et al. A Novel Wistar Rat Model of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Sucrose-Rich Diet. *J Diabetes Res* 2015;1-10.

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50; discussion 50-5.

Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 2012;58:1–18.

Manuel CR, Charron MJ, Ashby CR, Reznik SE. Saturated and unsaturated fatty acids differentially regulate in vitro and ex vivo placental antioxidant capacity. *Am J Reprod Immunol* 2018;1-9.

Maranhão PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, Koury CJ, Bouskela E. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8:32.

Martin RB, Ishida J. The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. *J Biomech* 1989;22:419-26.

McGrother CW, Donaldson MMK, Hayward T, Matthews R, Dallosso HM, Hyde C. Urinary storage symptoms and comorbidities: A prospective population cohort study in middle-aged and older women. *Age and Ageing* 2006;35:16–24.

Medeiros Júnior JL, Oliveira FA, Silva PC, Furriel A, Sampaio FJB, Gregório BM. Lard and/or canola oil-rich diets induce penile morphological alterations in a rat model. *Acta Cir Bras* 2014;29:39–44.

Miryaghoubzadeh, J., Darabi, M., Madaen, K., Shaaker, M., Mehdizadeh, A., Hajihosseini, R. Tissue fatty acid composition in human urothelial carcinoma. *Br J Biomed Sci* 2013;70:1-5.

Muller CH, Figueiredo FJC, Carvalho JE. Características comparativas entre frutos e sementes de castanha-do-brasil. Belém, PA: [s.n.], 1995.

Muller CH. Coleção Plantar Castanha-do-brasil. EMBRAPA. 1995:65.

Nagatomi J, Toosi KK, Grashow JS, Chancellor MB, Sacks MS. Quantification of bladder smooth muscle orientation in normal and spinal cord injured rats. *Ann Biomed Eng* 2005;33:1078–89.

Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP. Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:306–17.

Nascimento FAM, Barbosa-da-silva S, Fernandes-santos C, Mandarin-de-lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL / 6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil ( n-3 fatty acid rich oil ). *Exp Toxicol Pathol* 2010;62:17-25.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014;384:766–81.

Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M: Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:173–81.

Oberbach A, Jehmlich N, Schlichting N, Heinrich M, Lehmann S, Wirth H, et al. Molecular Fingerprint of High Fat Diet Induced Urinary Bladder Metabolic Dysfunction in a Rat Model. *PLoS One* 2013;8:1-12.

Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29:178-90.

Pena Muniz MA, Ferreira-Dos-Santos MN, da Costa CE, Moaris L, Lamarão ML, Ribeiro-Costa RM et al. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. *Pharmacogn Mag* 2015;41:147-51.

Perdomo L, Beneit N, Otero YF, Escribano O, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc diabetol*. 2015;14:1-12.

Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Mediterranean Diet Rich in Olive Oil and Obesity, Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus. *Curr Pharm Des*. 2011;17:769–77.

Philippi ST. PIRÂMIDE ALIMENTAR: FUNDAMENTOS BÁSICOS DA NUTRIÇÃO 2º Ed. Editora Manole. 2014.

Polsky S, Ellis SL. Obesity, Insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015;22:277–82.

Reeves GP, Nielsen HF, Fahey GCJr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.

Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* 2004;109:1609-14.

Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease 1 – 4. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1649S–56S.

Ross MH, Pawlina W. *Histologia texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.; 2008. p. 651-87.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity* 2011;19:1109-17.

Schuster J, Oliveira made, Bosco SMDal. O papel da nutrição na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas. *SOCERGS.* 2015;28:1-6.

Semins MJ, Shore AD, Makary MA, Weiner J Matlaga BR. The impact of obesity on urinary tract infection risk. *Urology.* 2012;79:266–9.

Silva RF, Ascheri JLR, Souza JMLDe. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-brasil. *Ciênc Agrotec* 2010;34:445–50.  
Smeulders N, Woolf AS, Wilcox DT. Extracellular matrix protein expression during mouse detrusor development. *J of Pediatric Surg.* 2003;38:1–12.

Souza MLde; Menezes HCde. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004;24:120–8.

Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. *Obes Rev* 2007;8(Suppl 1):55–61.

Subak L, Whitcomb E, Shen H, Saxton J, Vittinghoff E, Brown J. Weight Loss: a Novel and Effective Treatment for Urinary Incontinence. *J Urol* 2005; 174: 190-195.

Tikkinen KAO, Auvinen A, Huhtala H, Tammela TLJ. Nocturia and obesity: A population-based study in Finland. *Am J of Epidem.* 2006;163:1003–11.

Townsend KL, Lorenzi MM, Widmaier EP. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocr.* 2008;33176-88.

Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin N Am* 2018;102:13–33.

Van Kuilenburg J, Lappegrd KT, Sexton J, Plesiewicz I, Lap P, Bouwels L, et al. Persisting thrombin activity in elderly patients with atrial fibrillation on oral anticoagulation is decreased by anti-inflammatory therapy with intensive cholesterol-lowering treatment. *J Clin Lipidol* 2011;5:273–80.

Who. World Health Organization. Obesity and overweight. Feb. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Wing RR, West DS, Grady D, Creasman JM, Richter HE, Myers D, et al. Effect of weight loss on urinary incontinence in overweight and obese women: Results at 12 and 18 months. *The J of Urol.* 2010;184:1005–10.

Xavier C, Resende C de. *Obesidade e doença renal crónica* Obesidade e doença renal crónica. 2015.



## Effect of a high-fat diet on the rat bladder wall and bioactive action of Brazil nut oil

Aline Costa de Souza <sup>1</sup>, Carla Braga Mano Gallo <sup>1</sup>, Magna Cottini da Fonseca Passos <sup>2</sup>, Carolina Crocchia <sup>3</sup>, Glauciane Lacerda Miranda <sup>3</sup>, Francisco José Barcellos Sampaio <sup>1</sup>, Bianca Martins Gregório <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidade de Pesquisa Urogenital, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>2</sup> Departamento de Nutrição Aplicada, Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>3</sup> Instituto de Nutrição Josue de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

### ABSTRACT

High-fat diet-induced obesity is associated with metabolic disorders. The Brazil nut has bioactive substances and has been used to control the damage caused by obesity in several organs. The work intended to show the damage caused by high-fat diet in the bladder wall and if the Brazil nut oil added to the diet could ameliorate or reverse this effect. Sixty-day-old rats were divided into two groups: C (control, n = 30) and HF (high-fat, n = 30) diets. At 90 days, 10 animals of each group were sacrificed. The others were divided into 4 groups: C and HF (animals that maintained their previous diet, n = 10 for each group) and C / Bno and HF / Bno (animals whose control or high-fat diet was supplemented by Brazil nut oil, n = 10 for each group). Sacrifice occurred at 120 days, and the bladders were removed and analyzed. Epithelial height was increased in the HF compared to the C group. In contrast, the C / Bno had a lower epithelial height compared to the others. The percentage of collagen between the detrusor muscle fibers was significantly greater in C / Bno, HF and HF / Bno than in control group. The HF had a larger muscle fiber diameter than the C group, while the C / Bno presented lower values than the HF and HF / Bno groups. HF diets induced bladder wall damage. These changes in the rat's bladder wall were partially reversed by the Bno.

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bladder; Nuts; Diet, High-Fat; Rats

Int Braz J Urol. 2018; 44: XX-XX

Submitted for publication:  
August 07, 2018

Accepted after revision:  
October 05, 2018

Published as Ahead of Print:  
December 15, 2018

### INTRODUCTION

The number of overweighted and obese individuals is increasing in the World. Weight gain affects individuals of all ages, social strata and ethnic groups. Although the etiology of obesity is complex, several factors are involved, particularly changes in food patterns (1).

High-fat diet-induced obesity is associated with higher incidences of insulin resistance, hypertension, dyslipidemia, cancers and certain metabolic disorders (2). Concerning the urogenital system, our group, working with experimental animals, showed that a high-fat diet promoted obesity and affected different organs, including the testicle (3), prostate (4) and penis (5). Other



studies in both experimental animals (6, 7) and humans (7) have shown that lower urinary tract dysfunctions are associated with obesity. Several debilitating urological symptoms associated with obesity could represent pathogenic as well as functional involvement of the bladder (8). Most of the studies focusing on obesity versus the urinary bladder have demonstrated physiological dysfunctions without pointing out the morphological changes that lead to these comorbidities. Although the morphological bladder wall components, mainly collagen and muscle, have not yet been investigated, they are the substrate from which problems affecting the bladder arise.

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) comes from the Amazon region and has a complex matrix of bioactive substances such as selenium, alpha-tocopherol, phenolic compounds, folate, magnesium, potassium, and calcium. It is rich in monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (9, 10).

Whereas the properties and beneficial effects of the Brazil nut have already been reported in different studies on inflammation (9), endothelial dysfunction (11) and obesity (9) no data in the literature has been found concerning the Brazil nut oil (Bno) and its potential benefits on the urogenital system, particularly the bladder.

This study gives continuity to previous studies on high-fat diets and the urogenital system (3-5) by analyzing the bladder wall of rats fed with a high-fat diet to determine the effect on morphology. We also hypothesized that the extracted Bno, when added to the diet, could ameliorate high-fat diet-induced metabolic disorders related to the bladder components. So, the work intended to show the damage caused by high-fat diet in the bladder wall and if the Brazil nut oil added to the diet could ameliorate or reverse this effect.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design and experimental diets

The experiments were approved by the Ethics Committee of the Institute of Biology of the State University of Rio de Janeiro, per the re-

commendations in Law no. 11.794, promulgated in November 2008 and in the standards set by the Journal of Physiology of the British Society of Physiology.

At 60 days of age, the animals were divided into two groups by experimental diet until 90 days of age: Control group (C, n = 30), fed with a casein-based diet and 4% soybean oil (normolipid) ad libitum (AIN 93-M - American Institute of Nutrition); high-fat group (HF, n = 30), fed with a casein-based diet and 4% soybean oil supplemented with 32% lard, ad libitum. At 90 days, 10 animals from each group were sacrificed. The 40 remaining animals were subsequently divided into 4 groups and were followed until 120 days of age (Figure-1).

1 - Control group (C, n = 10), fed with a casein-based diet and soybean oil 4% (normolipid) (AIN 93-M), ad libitum.

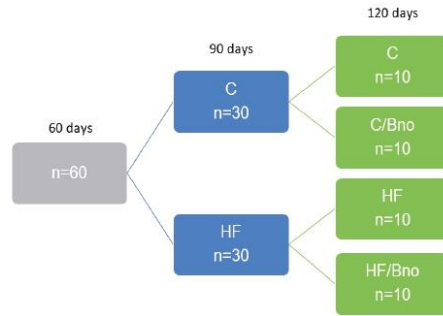
2 - Brazil nut oil control group (C / Bno, n = 10), fed with a casein-based diet and 4% soybean oil supplemented with 15% *Bertholletia excelsa* oil, ad libitum.

3 - High-fat group (HF, n = 10), fed with a casein-based diet and 4% soybean oil supplemented with 32% lard, ad libitum.

4 - Brazil nut oil high-fat group (HF / Bno, n = 10), fed with a casein-based diet and 4% soybean oil supplemented with 15% *Bertholletia excelsa* oil (AIN 93-M), ad libitum.

The food intake and body mass of the rats were monitored daily and weekly, respectively, until the end of the experiment. The experimental diets were formulated per the recommendations of the AIN-93 M for rodents (12). Each week, after extracting the lipids from the Bno, the diet ingredients were weighed and homogenized in a Hobart® (Professional Equipment for Industrial Kitchens, São Paulo, Brazil) industrial mixer with boiling water. The obtained mass was dehydrated in an oven ventilated at 50°C for 24 h and transformed into pellets and, after identification, was stored in a refrigerator until used. The diet composition is listed in Table-1. Bno was extracted by cold hydraulic pressing (Marconi®, model ME 098, Piracicaba, São Paulo, Brazil) at room temperature (31°C) at an initial pressure of 3 and a final pressure of 12 tons (Table-2).

Figure 1 - Study design.



**C** (control diet at 90 and 120 days); **C/ Bno** (control diet at 90 days and diet based on Brazil nut oil at 120 days); **HF** (high-fat diet at 90 and 120 days); **HF/ Bno** (high-fat diet at 90 days and diet based on Brazil nut oil at 120 days). The animals were killed at 90 days and 120 days of age.

Table 1 - Composition of experimental diets.

Nutrients (g / 100g)	C diet	HF diet (lard)	HF diet (Brazil nut oil)
	%	%	%
Casein	14.00	14.00	14.00
Corn starch	62.07	29.95	46.95
Sugar	10.00	10.00	10.00
Minerais Mix	3.50	3.50	3.50
Vitamins Mix	1.00	1.00	1.00
Fat (Soybean oil)	4.00	4.00	4.00
Fat (Lard)	-	32.00	-
Fat (Brazil oil nut)	-	-	15.00
Cellulose	5.00	5.00	5.00
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
L-cystine	0.30	0.30	0.30
Energy (Kcal)	400.38	559.80	474.80

**C** = control diet; **HF** = High-fat diet.

Table 2 - Principal lipids from Brazil nut oil.

Fatty acid	Trivial name	Total amount (%)
<b>Saturated</b>		
Tridecanoic Acid	-	4.103
Hexadecanoic acid	Palmitic acid	13.763
Octadecanoic acid	Stearic acid	10.109
<b>Monounsaturated</b>		
Octadecanoic Acid	Oleic acid	32.838
Nonadecanoic acid	-	35.728

At 90 and 120 days, the animals were anesthetized and euthanased. The euthanasia was made with a mixture of ketamine (3.0 mg) and xylazine (0.6 mg) per 100 g of body weight intraperitoneally. After that, bladders were removed and fixed in 4% buffered formalin, following routine histological procedure.

#### Staining and morphometry

Five micrometer sections of bladder were stained with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, picosirius and periodic acid-Schiff reagent (PAS) for morphometric quantification. Digital urinary bladder analyses were obtained using a microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (DP70, Olympus). The bladder epithelium height and muscle fiber diameter were evaluated using 60x and 100x objectives, respectively, and morphometrically analyzed by ImageJ Software (version 1.51k, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The amounts of detrusor muscle collagen and total collagen were determined using the point counting technique with an objective of 100x and 20x respectively and the same software. For all analyses, 5 fields per animal were considered (13, 14).

#### Statistical analysis

Data were presented as the mean  $\pm$  standard error mean (SEM). The differences between

the groups at 90 days were calculated using an unpaired Student's t-test, and the group differences at 120 days were calculated using one-way and two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant (GraphPad Prism version 5.03 for Windows - GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

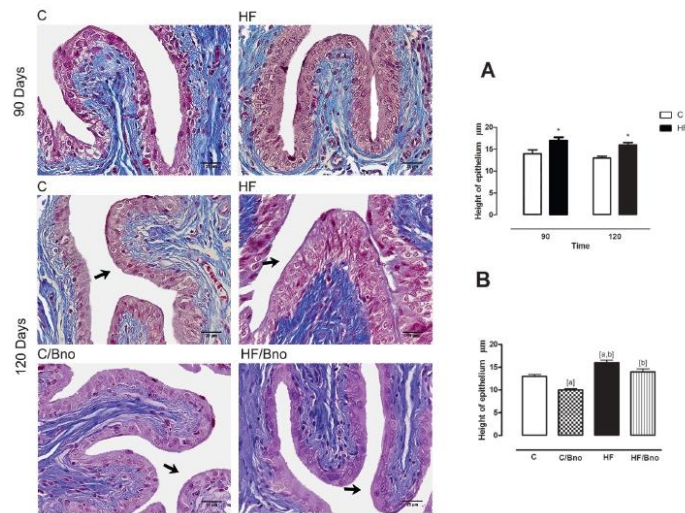
## RESULTS

Daily food intake was lower in animals fed with the high-fat diet at 90 days (C:  $18.45 \pm 0.09$  g, HF:  $17.14 \pm 0.38$ g,  $p < 0.0001$ ) and 120 days (C:  $33.40 \pm 6.56$ g, C / Bno:  $31.46 \pm 2.11$ g, HF:  $17.00 \pm 1.15$ g, and HF / Bno:  $22.97 \pm 1.72$ g,  $p < 0.0001$ ) in relation to their respective controls. No differences in body mass were observed at 90 days. At 120 days, the group that received the HF diet, HF and HF / Bno was heavier ( $416.00 \pm 49.51$ g and  $486.60 \pm 61.2$ g) than the other experimental groups (C:  $381.30 \pm 14.00$ g and C / Bno:  $399.60 \pm 60.96$ g).

Animals that received an HF diet showed a significant increase (+22%) in epithelial height at 90 days, and this difference was maintained at 120 days (Figure-2A). A two-way ANOVA showed that both diet type and the interaction between diet type and duration significantly affected the outcome, but duration alone did not. The HF group, which remained on the HF diet, presented a significant increase (+23%,  $p < 0.01$ ) in the epithelial height compared to the C group. In contrast, the C / Bno group presented a lower epithelial height than C (-23%,  $p < 0.01$ ) and HF groups (-38%,  $p < 0.0001$  and -28%,  $p < 0.0001$ ) (Figure-2B).

The animals that received an HF diet presented a significant increase in muscle fiber diameter at 90 days (Figure-3A) that was maintained at 120 days. A two-way ANOVA showed that there was a significant effect of the interaction between diet type and duration on the outcome, but there was not a significant effect from duration alone. Both groups receiving the HF diet had muscle fi-

**Figure 2 - Image showing the height of the bladder wall epithelium (arrows).**



**A)** rats submitted to control and high-fat diets at 90 and 120 days, analyzed using a two-way ANOVA and t-test; [\*], when  $\neq$  C group. **B)** rats submitted to different diets at 120 days. Data were analyzed using an one-way ANOVA; [a], when  $\neq$  C; [b], when  $\neq$  C / Bno. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 10 animals per group, considering  $p < 0.05$ . Masson's trichrome, 600x.

bers with a greater diameter (+34%,  $p < 0.001$ ) in comparison to the control group (C) (Figure-3B). The C / Bno group presented lower values than HF and HF / Bno groups (-30%,  $p < 0.001$ ).

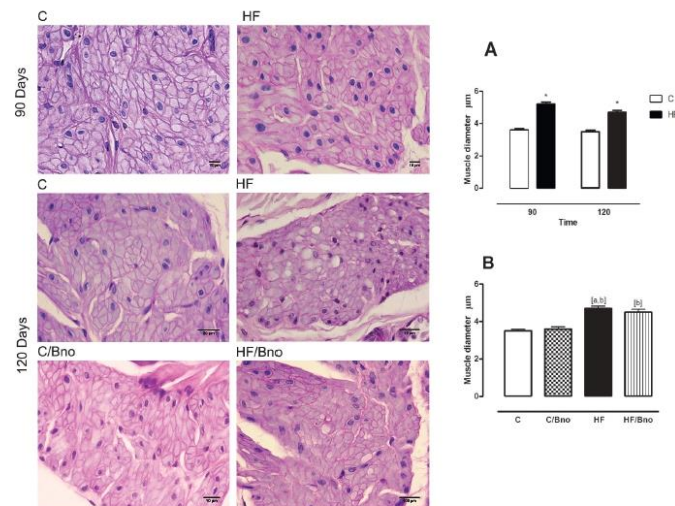
At 90 days, the groups did not significantly differ in the percentage of collagen in the detrusor muscle, while at 120 days, the percentage of collagen in the HF group increased significantly (+30%) (Figure-4A). A two-way ANOVA showed that both diet type and the interaction between diet type and duration significantly affected the outcome, but duration alone did not. At 120 days (Figure-4B), both the high-fat diet (HF) and the nut oil diet (C / Bno and HF / Bno) groups had higher percentages of collagen in the muscle (+45%,  $p < 0.001$ ; +17%,  $p < 0.001$ ; and +45%,  $p < 0.001$ , respectively) than the C group. However, the C / Bno group showed a lower percentage of collagen than the HF and HF / Bno groups (-20%,  $p < 0.01$ ). Concerning the percentage of total collagen present in the bladder, it was similar among the groups.

## DISCUSSION

The use of medicinal plants has shown interesting results in experimental research (15). Our results showed that the animals that received HF diets presented a higher body mass despite a lower food intake. This finding may be a consequence of the rat's dietary behavior, which, in the presence of a hyperenergetic diet, is adjusted for the amount of food ingested at the same energy value. Furthermore, despite eating less, the rats still gained more weight, which is due to the greater efficiency of the HF diet in accumulating adipose tissue (16).

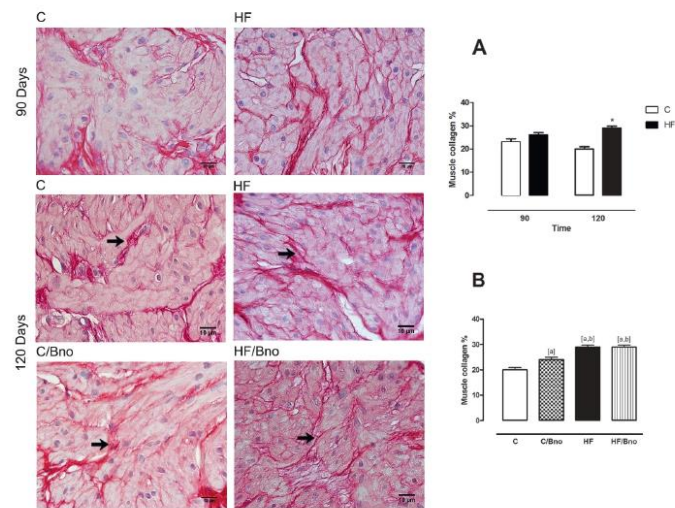
Lower urinary tract dysfunctions are often associated with HF diets (6, 7). The intake of some fats, such as lard, negatively affects carbohydrate metabolism and maximizes the damage in different organs of the urogenital system (4, 5). The bladder, despite the important micturition problems that may be present, has not been sufficiently investigated when submitted to an HF diet.

**Figure 3 - Image showing the diameter of the detrusor.**



**A)** rats submitted to control and high-fat diets at 90 and 120 days, analyzed using a two-way ANOVA and t-test; [\*], when  $\neq$  C group. **B)** rats submitted to different diets at 120 days. Data were analyzed using an one-way ANOVA; [a], when  $\neq$  C; [b], when  $\neq$  C / Bno. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 10 animals per group, considering  $p < 0.05$ , PAS, 1000x.

**Figure 4 - Image showing the collagen in the detrusor muscle (arrows).**



**A)** rats submitted to control and high-fat diets at 90 and 120 days, analyzed using a two-way ANOVA and t-test; [\*], when  $\neq$  C group. **B)** rats submitted to different diets at 120 days. Data were analyzed using an one-way ANOVA; [a], when  $\neq$  C; [b], when  $\neq$  C / Bno. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 10 animals per group, considering  $p < 0.05$ . Picrosirius red, 1000x.

Fatty acid metabolism is related to cellular functions and can be observed in cellular proliferation mechanisms. The HF diet likely caused circulating free fatty acids to mediate biological effects linked to cell proliferation, which triggered the increase in epithelial height observed in the present study (7).

The changes in the rat bladders caused by ingesting HF diets allowed us to verify whether Bno exerts its actions on the bladder wall components. The therapeutic effects of Brazil nuts have already been demonstrated in cardiovascular system (10, 11). However, the composition of Bno differs from chestnut composition since it changes while being pressed for oil manufacturing. Therefore, we cannot assume that the oil properties are similar to those of the chestnut.

In this work, the addition of Bno to control and HF diets significantly decreased epithelial height, showing a protective action that minimize the effects of lard. This effect is likely associated with

the significant amounts of oleic acid (32.83%) and stearic acid (10.09%) in Bno, both important in the control of cell proliferation mechanisms (17). Supporting this rationale, studies have shown that urinary bladder cancer cells may have an increased lipid metabolism. Navarro-Tito et al. (2010) (17) found that administering oleic acid to non-tumor mammary epithelial cells does not induce metalloproteinase-9 secretion and controls cell proliferation better, whereas high levels of stearic and oleic acids are important indicators of bladder tumorigenesis (18).

The detrusor muscle in the bladder wall regulates bladder functions. Physiological studies have demonstrated the influence of HF diets on muscle fibers, showing impaired effects on mitochondrial functions including the uncoupling of oxidative phosphorylation and the decrease of endogenous antioxidant defenses (19). Concerning morphology, we found significant increases in muscle fiber diameter in the animals fed with the

HF diet. However, unlike its effect on epithelial cells, Bno did not exert any effect on muscle fiber hypertrophy either when added to the control diet or when added to the HF diet. Most likely, palmitic and stearic acids counteracted the beneficial effects of oleic acid.

The HF diet also acts on the detrusor muscle to increase collagen production, which was significantly increased (30%) at 120 days. An anomalous increase in collagen can inhibit bladder contractility and electrical impulse conduction through the wall. This increase is observed in chronically obstructed bladders in adult men (20). These data support the morphological studies and explain the functional changes that are affected by increase in collagen production.

Collagen ensures tissue tensile strength (21). Diets based on animal fat appear to be linked to bladder stroma proliferation (22). HF diets are associated with increased FGF- $\beta$  (fibroblast growth factor beta) synthesis, which increases collagen production in the stromal compartment of the bladder (23). Surprisingly, collagen found in the mucosa and submucosa of the bladder wall did not increase, as was observed in the detrusor. Similarly, the addition of Bno did not interfere with this parameter. Possibly, the saturated fatty acids present in this oil could be induced to elevate cell death, reduce total antioxidant capacity, and augment lipid peroxidation. However, it remains unclear how this fatty acid influences collagen behavior (24).

The present work used the Brazil nut oil obtained after pressing which causes the loss of some properties of the seed. A group of animals fed with a diet in which the nut was crushed instead of pressed would be desirable and perhaps could produce more conspicuous results in relation to its protective effect. This experiment is being carried out in our laboratory to test this hypothesis.

In summary, high-fat diets are associated with bladder wall damage as increased epithelial height, muscle fiber diameter and detrusor collagen. These morphological changes in the bladder wall of the rats were partially reversed by the Brazil nut oil.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the agency FAPERJ (<http://www.faperj.br>). The authors thank Priscila Fernandes dos Santos for technical assistance. The author(s) declare that they have no conflict of interest.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## REFERENCES

1. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2522-5.
2. Polsky S, Ellis SL. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22:277-82.
3. Campos-Silva P, Furriel A, Costa WS, Sampaio FJ, Gregorio BM. Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. *Int Braz J Urol.* 2015;41:569-75.
4. Furriel A, Campos-Silva P, Silva PC, Costa WS, Sampaio FJ, Gregório BM. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids induce morphological alterations in the rat ventral prostate. *PLoS One.* 2014;9:e102876.
5. Medeiros Júnior JL, Oliveira FA, Silva PC, Furriel A, Sampaio FJ, Gregório BM. Lard and/or canola oil-rich diets induce penile morphological alterations in a rat model. *Acta Cir Bras.* 2014;29 Suppl 1:39-44.
6. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Influence of High Fat Diet Feeding for 20 Weeks on Lower Urinary Tract Function in Mice. *Low Urin Tract Symptoms.* 2013;5:101-8.
7. Oberbach A, Jehmlich N, Schlichting N, Heinrich M, Lehmann S, Wirth H, et al. Molecular fingerprint of high fat diet induced urinary bladder metabolic dysfunction in a rat model. *PLoS One.* 2013;8:e66636.
8. McGrother CW, Donaldson MM, Hayward T, Matthews R, Dallosso HM, Hyde C, et al. Urinary storage symptoms and comorbidities: a prospective population cohort study in middle-aged and older women. *Age Ageing.* 2006;35:16-24.

9. Maranhão PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8:32.
10. Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:1649S-56S.
11. Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilibert R, Casals E, et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation*. 2004;109:1609-14.
12. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939-51.
13. Alves EF, de Freitas Ribeiro BLM, Costa WS, Gallo CBM, Sampaio FJB. Histological and quantitative analyzes of the stromal and acinar components of normal human prostate zones. *Prostate*. 2018;78:289-93.
14. Felix-Patricio B, De Souza DB, Gregório BM, Costa WS, Sampaio FJ. How to Quantify Penile Corpus Cavernosum Structures with Histomorphometry: Comparison of Two Methods. *Biomed Res Int*. 2015;2015:832156.
15. Feitosa DJS Junior, de Carvalho LTF, Rocha IRO, de Brito CN, Moreira RA, de Barros CAV. Effects of Copaiba oil in the healing process of urinary bladder in rats. *Int Braz J Urol*. 2018;44:384-9.
16. Townsend KL, Lorenzi MM, Widmaier EP. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine*. 2008;33:176-88.
17. Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP. Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:306-17.
18. Miryaghoubzadeh J, Darabi M, Madaen K, Shaaker M, Mehdizadeh A, Hajhosseini R. Tissue fatty acid composition in human urothelial carcinoma. *Br J Biomed Sci*. 2013;70:1-5.
19. Lambertucci RH, Leandro CG, Vinolo MA, Nachbar RT, Dos Reis Silveira L, Hirabara SM, et al. The effects of palmitic acid on nitric oxide production by rat skeletal muscle: mechanism via superoxide and iNOS activation. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30:1169-80. Erratum in: *Cell Physiol Biochem*. 2013;31:14.
20. Semins MJ, Shore AD, Makary MA, Weiner J, Matlaga BR. The impact of obesity on urinary tract infection risk. *Urology*. 2012;79:266-9.
21. Martin RB, Ishida J. The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. *J Biomech*. 1989;22:419-26.
22. Levin RM, Chichester P, Hass MA, Gosling JA, Buttyan R. Obstructive Bladder Dysfunction: Morphological, Biochemical and Molecular Changes. *Eur Urol Suppl*. 2002;1:14-20.
23. Altuntas CZ, Daneshgari F, Izgi K, Bicer F, Ozer A, Sakalar C, et al. Connective tissue and its growth factor CTGF distinguish the morphometric and molecular remodeling of the bladder in a model of neurogenic bladder. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303:F1363-9.
24. Manuel CR, Charron MJ, Ashby CR Jr, Reznik SE. Saturated and unsaturated fatty acids differentially regulate in vitro and ex vivo placental antioxidant capacity. *Am J Reprod Immunol*. 2018;80:e12868.

**Correspondence address:**

Bianca Martins Gregório, RD, PhD  
 Unidade de Pesquisa Urogenital,  
 Centro Biomédico, Univ. do Estado do Rio de Janeiro, UERJ  
 Av. 28 de setembro, nº 87 (fundos)  
 Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brasil  
 Telephone: +55 21 2868-8021  
 E-mail: biancamgregorio.uerj@gmail.com