



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

Luciana Ghiraldeli

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM LICOPENO SOBRE O
COMPROMETIMENTO RENAL NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EM
RATOS: ANÁLISE DO PERFIL BIOQUÍMICO, FUNCIONAL E
MORFOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Moreto

Botucatu

2020

Luciana Ghiraldeli

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM LICOPENO SOBRE O
COMPROMETIMENTO RENAL NA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EM
RATOS: ANÁLISE DO PERFIL BIOQUÍMICO, FUNCIONAL E
MORFOLÓGICO**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia dos Anjos Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Moreto

Botucatu

2020

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

Ghiraldeli, Luciana.

Influência da suplementação com licopeno sobre o comprometimento renal na obesidade induzida por dieta em ratos : análise do perfil bioquímico, funcional e morfológico / Luciana Ghiraldeli. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Lucia dos Anjos Ferreira

Coorientador: Fernando Moreto

Capes: 20000006

1. Obesidade. 2. Rins - Doenças. 3. Insuficiência renal crônica. 4. Licopeno. 5. Carotenoides.

Palavras-chave: Dieta hipercalórica; Licopeno; Obesidade; Rato; Renal.

Dedico

*Aos meus pais Zelma e Álvaro, com amor,
por me trazerem à vida e me
proporcionarem vivê-la*

*À minha família, meu querido irmão
Alvarinho, minha irmã Renata, sobrinha
Maria Luiza, que estiveram presentes
comigo em mais uma etapa da vida*

*Ao Mario, uma pessoa especial, que me
ajudou e me estimulou sempre, com coragem
e determinação para enfrentar esse desafio*

Agradeço

A Deus, por todas as coisas aos nossos olhos e em nossos corações

À Professora Ana Lucia dos Anjos Ferreira, pelo convívio, por nossa preciosa amizade, por todos os ensinamentos e pela oportunidade que me concedeu nos estudos

Ao Professor Fernando Moreto, pelos ensinamentos, pela importante colaboração e paciência na sua co-orientação

À Professora Camila Renata Corrêa Camacho, pelo companheirismo de uma vida, incentivo e aprendizado

Ao Professor Dijon Henrique Salomé, pelo carinho e pela generosidade em seus ensinamentos primordiais e essenciais para a realização deste trabalho

À Professora Noeme Sousa Rocha pela ajuda preciosa na interpretação da morfologia renal e pelos ensinamentos na experimentação animal

Ao Rivaldo Antonio Piacitelli, meu superior imediato e amigo, que me ajudou com sua anuência para a minha participação de todas as aulas teóricas, foi fundamental para as outras etapas do estudo

Ao Jesse James Alvarado, Larissa Cristina Fava Rodrigues Alves e Ana Maria de Melo, colegas de trabalho e amigos que sempre colaboraram comigo, principalmente na etapa do biotério

Aos jovens estudantes e todos os competentes profissionais e colegas de bancada e biotério: Ângelo, Koody, Fabiana, Pedro, Jéssica, Mariane, Carol, Klinsmann, Fabi, Artur, Dijon, Camila, Fernando e todos os que passaram pela iniciação científica durante esse período

Ao Paulo Cesar Georgette (PC) e Corina Corrêa, profissionais da Unipex que auxiliaram no biotério e foram fundamentais para a realização desse experimento

A todos os funcionários da Unipex que colaboraram sempre com presteza e competência, especialmente ao José Carlos Georgette e Denise Perone

Ao Artur Junio Togneri Ferron, pela ajuda na construção inicial da dissertação, obrigada pela sua dedicação, paciência e principalmente pelo seu incentivo, sempre

À residente Tayná, da FMVZ, por executar as imagens da histologia renal

À secretária da Comissão de Ética em Experimentação Animal, Sara Rosa Stanley Sampaio, pelo apoio constante quando solicitado

Epígrafe

*Tudo tem o seu tempo determinado, e
há tempo para todo o propósito debaixo do
céu...*

Eclesiastes 3

Resumo

Introdução. A obesidade está relacionada com o desenvolvimento de várias doenças, entre elas a doença renal crônica. O licopeno é um carotenoide presente no tomate e em outros vegetais e é um dos compostos antioxidantes mais potentes dentre os carotenoides. Vários estudos tem investigado o efeito protetor do licopeno em inúmeras doenças. Entretanto, para o nosso conhecimento, poucos estudos abordaram o efeito do licopeno sobre as alterações renais associadas à obesidade. **Objetivo.** O objetivo geral do presente estudo será o de verificar a influência da suplementação com licopeno sobre o comprometimento bioquímico, funcional e morfológico renal em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples e gordura saturada. **Método.** Ratos *Wistar* (n= 40) randomizados em dois grupos: Controle (C, n=20) - dieta padrão + água ou Obeso (Ob, n=20) - dieta hipercalórica + água acrescida de sacarose 25% por 20 semanas. Na 20ª semana foi detectada insuficiência renal por meio de avaliação bioquímica urinária (proteinúria) e os animais foram redistribuídos em 4 grupos: Controle (C, n=10); Controle+Licopeno (C+Li, n=10); Obeso (Ob, n=10); Obeso+Licopeno (Ob+Li, n=10). Os animais receberam óleo de milho (C, C+Li) ou licopeno (10 mg/kg peso/dia) (Ob, Ob+Li) via gavagem por 10 semanas adicionais. Na 30ª semana foram submetidos à coleta de urina de 24 horas, aferição de pressão arterial sistólica e à eutanásia para coleta de sangue e rins. Avaliados os seguintes parâmetros: índice de adiposidade, dosagens bioquímicas plasmática (glicose, insulina, ureia, creatinina, proteína total, albumina, e urinárias (proteínas totais, albumina, ureia, creatinina); cálculo do índice de Homa-IR, biomarcadores do dano oxidativo renal (carbonilação de proteínas e lipoperoxidação), análise do licopeno renal e análise histológica renal. **Resultados.** O modelo de dieta adotado promoveu obesidade nos grupos obesos (Ob e Ob+Li) em relação aos grupos controles (C e C+Li). Os animais obesos (Ob e Ob+Li) exibiram maior nível de pressão arterial sistólica, glicose sérica, e albumina plasmática em relação aos grupos controles (C e C+Li). Insulina plasmática, índice HOMA-IR, índice urinário proteína/creatinina, carbonilação de proteínas de tecido renal que se mostraram aumentados nos animais do grupo obeso foram reduzidos com a suplementação com licopeno (Ob vs Ob+Li). A análise histológica renal mostrou aumento de depósito de gordura (lipidose) tubular nos animais do grupo Obeso e diminuído com a suplementação com licopeno (Ob vs

Ob+Li). **Conclusões.** O modelo de dieta adotado promoveu obesidade (índice de adiposidade), aumento de pressão arterial, glicose sérica e albumina plasmática sem influência da suplementação com o carotenoide. Por outro lado, o aumento de insulina sérica, índice HOMA-IR, índice urinário proteína/creatinina, carbonilação de proteínas de tecido renal e depósito de gordura renal (lipidose) verificado no grupo obeso foram reduzidos com a suplementação com licopeno (Ob vs.Ob+Li). Esses dados sugerem que o licopeno pode representar uma estratégia terapêutica na atenuação da doença renal crônica e de alterações metabólicas associada à obesidade.

Palavras chave: renal, doença, licopeno, obesidade, dieta hipercalórica, rato.

Abstract

Introduction: Obesity is related to the development of various diseases, including chronic kidney disease. Lycopene is a carotenoid present in tomatoes and other vegetables and is one of the most potent antioxidant compounds among carotenoids. Several studies have investigated the protective effect of lycopene in numerous diseases. However, to our knowledge, few studies have addressed the effect of lycopene on renal changes associated with obesity. **Objective.** The general objective of the present study will be to verify the influence of lycopene supplementation on renal biochemical, functional and morphological impairment in an experimental model of obesity induced by a diet rich in simple carbohydrates and saturated fat. **Method.** Wistar rats (n = 40) were randomized into two groups: Control (C, n=20) or Obese (Ob, n=20) hypercaloric diet rich in simple carbohydrate and saturate fat for 20 weeks. At week 20 renal failure was detected by urinary biochemical evaluation (proteinuria) and the animals were redistributed in 4 groups: Control group (C, n = 10); Control + Lycopene (C + Li, n = 10); Obese (Ob, n = 10) or Obese + Lycopene (Ob + Li, n = 10). Animals received corn oil (C, C + Li) or lycopene (10 mg / kg weight / day) (Ob, Ob + Li) via gavage for an additional 10 weeks. At week 30 they were submitted to 24-hour urine collection, systolic blood pressure measurement and euthanasia for blood and kidney collection and the following parameters were evaluated: adiposity index, plasma biochemical dosages (glucose, insulin, urea, creatinine, total protein, albumin, and urine (total protein, albumin, urea, creatinine), Homa-IR index calculation, renal oxidative damage biomarkers (protein carbonylation and lipoperoxidation), renal lycopene analysis and renal histological analysis. **Results.** The adopted diet model promoted obesity in the obese groups (Ob and Ob + Li) in relation to the control groups (C and C + Li). Obese animals (Ob and Ob + Li) exhibited a higher level of systolic blood pressure, serum glucose, and plasma albumin compared to the control groups (C and C + Li). Plasma insulin, HOMA-IR index, urinary protein / creatinine index, carbonylation of renal tissue proteins that were increased in animals in the obese group were reduced with lycopene supplementation (Ob vs Ob + Li). Renal histological analysis showed an increase in tubular fat deposition (lipidosis) in animals in the Obese group and decreased with lycopene supplementation (Ob vs Ob + Li). **Conclusions.** The adopted diet model promoted obesity (adiposity index), increased blood pressure, serum glucose,

and plasma albumin without the influence of carotenoid supplementation. On the other hand, the increase in serum insulin, HOMA-IR index, urinary protein / creatinine index, renal protein carbonylation and renal fat deposition (lipidosis) observed in the obese group were reduced with lycopene supplementation (Ob vs. Ob + Li). These data suggest that lycopene may represent a therapeutic strategy to mitigate chronic kidney disease and metabolic changes associated with obesity.

Keywords: renal, disease, lycopene, obesity, hypercaloric diet, rat.

Lista de quadros

Quadro 1. Composição da dieta padrão e obeso.....	25
--	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Perfil nutricional e pressão arterial sistólica.....	31
Tabela 2. Perfil glicídico.....	32
Tabela 3. Concentração de licopeno no tecido renal.....	34
Tabela 4. Morfologia renal.....	35

Lista de figuras

Figura 1. Carbonilação.....	18
Figura 2. Estrutura molecular do licopeno.....	21
Figura 3. Protocolo Experimental.....	24
Figura 4. Marcadores plasmáticos da função renal.....	32
Figura 5. Marcadores urinários da função renal.....	33
Figura 6. Biomarcadores do dano oxidativo.....	33
Figura 7. Morfologia renal.....	36
Figura 8. Desenvolvimento de alterações metabólicas e renais associadas à obesidade induzida por dieta ocidental e efeitos do tratamento com licopeno.....	42

SUMÁRIO

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de figuras

RESUMO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
1 Protocolo experimental	23
2 Indução da obesidade	24
3 Suplementação com licopeno	25
4 Caracterização da obesidade	26
5 Doenças associadas à obesidade	26
5.1 Hipertensão arterial sistólica	26
5.2 Alterações bioquímicas metabólicas e renais	26
6 Biomarcadores do dano oxidativo	27
6.1 Malondialdeído	27
6.2 Carbonilação de proteínas	27
7 Análise do licopeno do tecido renal	28
8 Morfologia renal	29
9 Análise estatística	29
RESULTADOS	31
Perfil nutricional e pressão arterial sistólica.....	31
Perfil glicídico	32
Marcadores plasmáticos da função renal.....	32
Marcadores urinários da função renal.....	33
Biomarcadores do dano oxidativo	33
Concentração de licopeno no tecido renal	34
Morfologia renal	35
DISCUSSÃO	37
Disfunções renais associadas à obesidade.....	37
Tratamento com licopeno sobre alterações induzidas pela obesidade.....	39
CONCLUSÃO	43

Introdução

A prevalência da obesidade tem crescido no Brasil e no mundo, atingindo todas as faixas etárias e classes econômicas (**Schmidt et al., 2011; World Health Organization 2017**). Em 2010, a prevalência de sobrepeso e obesidade em homens e mulheres encontrava-se, respectivamente, na casa dos 57% e 43% e a previsão é que esses valores atinjam 95% e 52% em 2050 (**Rtveladze et al., 2013**). Recentemente, o Ministério da Saúde Nacional registrou aumento de 67,8% nos últimos treze anos (2006 a 2018) (**VIGITEL Brasil, 2018**). Obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, frequentemente associado a alterações metabólicas de elevada complexidade (**WHO, 1998**). Embora indivíduos com excesso de peso possam ser metabolicamente saudáveis, a obesidade aumenta expressivamente o risco de mortalidade por diferentes causas nessas pessoas (**Hruby et al., 2015**). O desenvolvimento de obesidade, associada à presença de síndrome metabólica (SM), é resultado da combinação de fatores genéticos e ambientais, como a inadequação alimentar e o sedentarismo. Este cenário colabora para o aparecimento de doenças como diabetes *mellitus* tipo II (DM-II), doenças cardiovasculares (DCV), câncer e doenças degenerativas (**Alberti et al., 2005**) e doença renal crônica (DRC) (**Declè et al., 2011**). Em conjunto, estas doenças são as principais causas de internações no sistema de saúde brasileiro, correspondendo ao elevado custo da saúde no país. Portanto, estudos que busquem novas estratégias de prevenção e tratamento da obesidade e de suas complicações são necessários.

A DRC é definida como anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com presença de marcadores de dano renal e/ou diminuição da taxa de filtração glomerular por mais de três meses (**Levey & Coresh, 2012**). A DRC corresponde a um problema de saúde pública e impõe enorme ônus econômico aos indivíduos afetados, às suas famílias e ao país como um todo. Estima-se que 30 milhões de adultos dos EUA tenham DRC e esta doença foi classificada como a 9ª causa de morte neste país em 2015 (**Ozieh et al., 2019**). Apesar de muitos fatores estarem associados à DRC, como idade, gênero, alcoolismo, inatividade física, DM-II e hipertensão arterial sistêmica (HAS), estudos evidenciam que a obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de DRC (**Francisqueti, 2018; Wickman & Kramer, 2013**).

A agressão renal desenvolvida na obesidade é similar a que ocorre no DM-II, ou seja, na fase inicial ocorre aumento da taxa de filtração glomerular (TFG), hipertrofia glomerular e microalbuminúria, que posteriormente evolui para proteinúria, injúria no túbulo intersticial e redução da TFG (**Maric-Bilkan, 2013; Thomson et al., 2004; Francisqueti, 2018**). A doença renal associada ao diabetes e à obesidade apresentam eventos iniciais comuns (incluem interações entre múltiplos fatores metabólicos e hemodinâmicos) que ativam vias de sinalização intracelular que, por sua vez, acionam a produção de citocinas e fatores de crescimento (**Maric-Bilkan, 2013; Francisqueti, 2018**). Resistência à insulina (RI), inflamação, disfunção endotelial renal, estresse oxidativo e fatores dietéticos correspondem a alguns elementos responsáveis por causar alterações renais. A expansão mesangial e lesão de podócitos, correspondem a lesão glomerular renal associada a RI e aumento nos níveis de citocinas (**Raimundo & Lopes, 2011; Francisqueti, 2018**). A RI e o aumento de insulina circulante parecem induzir inflamação renal, sendo evento determinante para a DRC (**Raimundo & Lopes, 2011; Francisqueti, 2018**). Além disso, a elevação dos níveis séricos de insulina pode resultar em aumento de filtração glomerular, da permeabilidade vascular e da disfunção endotelial, seguido de albuminúria (**Zeng et al., 2016; Francisqueti, 2018**).

O estresse oxidativo corresponde a um pilar importante na patogênese da obesidade e suas comorbidades, correspondendo a evento resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) ou do nitrogênio (RNS). Tal desequilíbrio resulta na oxidação de importantes biomoléculas, tais como: lipídios, proteínas, carboidratos e ácido desoxirribonucleico (DNA). Substâncias oxidantes e antioxidantes são geradas em um cenário de reações de óxido-redução, onde a oxidação implica em ganho de elétrons e a redução, em perda. Visto que a geração e a ação de substâncias oxidantes e antioxidantes dependem desse sistema de óxido-redução, muitos autores têm atualmente usado o termo desequilíbrio do sistema *redox* para se referir ao estresse oxidativo. As espécies reativas, que são geradas tanto por sistemas enzimáticos como não enzimáticos, têm sido implicadas não apenas em grande número de processos fisiológicos, mas também não fisiológicos, durante a iniciação e progressão de doenças. Essas moléculas são, também, denominadas radicais livres e incluem: peroxinitrito (ONOO⁻), hidroxil (•OH), superóxido (O₂⁻•), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), *singlet* oxigênio (¹O₂), óxido nítrico (•NO), ácido hipocloroso, radical hidroperóxil, radical alcóxil (LO•) e hidroperóxido

(L(R)OOH). As fontes geradoras de espécies reativas são: a mitocôndria (por redução incompleta do O₂); macrófagos, neutrófilos, endotélio, epitélio, sistemas enzimáticos (por mieloperoxidase; xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH-citocromo P450 redutase, ciclo-oxigenase, óxido nítrico sintetase); reações com metal (Ferro e Cobre) via reação de Fenton e de Haber-Weiss; reação não enzimática entre os radicais superóxido e óxido nítrico resultando na geração de peroxinitrito. Embora as espécies reativas sejam essenciais para uma variedade de mecanismos de defesa celular, as ROS e as RNS podem causar lesão oxidativa em biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) quando presentes em número superior à sua neutralização mediada pelo sistema de defesa antioxidante. O sistema de defesa antioxidante é constituído por vários componentes endógenos e exógenos. Os endógenos incluem: glutathiona reduzida (GSH), glutathiona-peroxidase (GSH-Px), glutathiona-redutase (GSH-Rd), superóxido dismutase (SOD), catalase, ácido úrico, albumina, hemoglobina, transferrina e bilirrubina. Os exógenos são formados por: quelantes de metal (desferoxamina), vitamina E (principalmente α -tocoferol), carotenoides (β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, astaxantina, cataxantina), vitamina C, flavonoides, manitol e amino-guanidina; existem outros como: taurina, melatonina, carnosina que são compostos endógenos, mas que podem ser administrados como suplementos. A dieta é importante fonte de antioxidantes, mesmo para os da categoria “antioxidantes endógenos”, desde que a função desses depende da ingestão de componentes importantes para o adequado funcionamento desses antioxidantes. Exemplos clássicos são os constituintes de pimentão vermelho (cisteína), castanha do Pará (selênio) e ostra (zinco), que são importantes para a função do GSH, GSH-Px e Zn-SOD, respectivamente. Como mencionado, o estresse oxidativo ocorre quando a magnitude da produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante o que resulta em oxidação de lipídios (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação e/ou nitração), carboidratos (carbonilação) e DNA (oxidação de bases nitrogenadas). A lesão desses importantes componentes celulares leva à alteração da estrutura química, da função e à morte celular (**Ferreira et al., 2011**). A lipoperoxidação corresponde à reação autolimitada composta por etapas de iniciação, propagação e terminação. Contudo, o excesso de espécies reativas pode reiniciar o processo resultando em descontrole e geração de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA). A lesão oxidativa em DNA pode ocorrer nas bases púricas e pirimídicas, na presença de \bullet OH o qual retirando um átomo de hidrogênio das ligações C-H (carboidrato-hidrogênio) gera falsas bases,

Há evidências de que o estresse oxidativo renal está associado à RI. Hiperglicemia e aumento nos níveis de ácidos graxos livres proporcionam a elevação na geração de ROS no endotélio renal, resultando em alterações estruturais de importantes biomoléculas (proteínas, lipídios, DNA) e disfunção renal. Como mencionado anteriormente, as ROS, também podem ser originadas do sistema enzimático NADPH oxidase (NOX). Tal sistema corresponde a uma família de enzimas, das quais NOX 1, 2 e 4 são altamente expressas nos rins. Fatores metabólicos aumentam a expressão das proteínas NOX e da geração de ROS nos podócitos, com consequente alteração estrutural e funcional renal (**Zhang & Lerman, 2016; Francisqueti et al, 2018**). A HAS corresponde a evento comum na obesidade e DRC, ambos associados ao estresse oxidativo. O aumento do peptídeo angiotensina tipo 2 (Ang-2) está associado à HAS e à RI. O aumento do peptídeo resulta em hiperatividade de NADPH-oxidase, diminuição da sinalização de insulina e incremento da produção de endotelina. De fato, tem sido identificado que a infusão de Ang-2 em animais compromete a sinalização à insulina e induz à RI. Esta afirmação pode ser confirmada pelo bloqueio farmacológico da Ang-2 que resulta em melhora da sensibilidade à insulina. Por sua vez, níveis elevados de endotelina inibem a sinalização da insulina e estimulam a NADPH-oxidase endotelial a produzir adicional radical superóxido (**Bahia et al., 2006; Ferreira et al., 2011**).

Comum nos pacientes obesos, a SM pode ser fator importante na causa da DRC constituindo fator de risco para doença renal terminal e morte prematura (**Chen et al., 2004**). Estudo prévio, usando modelo experimental de SM (ratos Zucker), mostrou aumento da carbonilação renal, dislipidemia e hipertensão, seguido de melhoria de tais parâmetros com a administração de carnosina, agente com capacidade anti-carbonilação (**Aldini et al., 2011**).

Alterações histológicas renais têm sido associadas à obesidade, por exemplo, o desenvolvimento de glomerulosclerose, a lesão do túbulo intersticial (microscopia ótica comum), edema e hipertrofia da membrana basal glomerular (microscopia eletrônica) correspondem a lesões renais identificadas em modelo animal de obesidade (**Aldini et al., 2011**). Autores utilizando dieta rica em gordura observaram aumento glomerular, expansão mesangial, incremento de infiltração por macrófagos nos rins e albuminúria em camundongos C57BI/6J (**Deji et al., 2009**). Estudo prévio constatou depósito de gordura em seio renal de coelhos obesos por dieta (**Dwyer et al., 1995**). Como o acúmulo de gordura (lipidose) preenche o seio renal, a compressão de várias

estruturas pode ocorrer neste órgão. Pode ocorrer a compressão da medula interna, visto que esta não é protegida pela cápsula fibrosa que protege tal órgão. Curiosamente, o conteúdo hialurônico intersticial, substância de preenchimento do espaço interno da medula renal, aumentou acentuadamente em cães e coelhos obesos. Além disso, o acúmulo de gordura no seio renal comprime a veia e sistema linfático o que resulta em aumento da pressão intersticial local (Montani et al., 2004). Estudo clínico com elevado número de indivíduos, mostrou lipidose renal em 30% dos casos; além disso, os indivíduos portadores de lipidose apresentavam também alto índice de HAS e DRC, mesmo após ajustes para índice de massa corporal e acúmulo de gordura visceral. O estudo mostrou que lipidose renal é uma condição comum e que está associada a regulação e ao aumento de risco de hipertensão arterial e DRC (Foster et al., 2011). Examinando correlação entre acúmulo de gordura renal e lesão tubular, recente estudo mostrou lipidose, por coloração oil red e imuno-histoquímica, no compartimento tubular proximal em rins de indivíduos diabéticos portadores de DRC, onde o grau de gravidade da lesão renal foi positivamente correlacionado com a intensidade verificada na análise imuno-histoquímica da proteína relacionada à diferenciação de adipócito (ADRP) e da proteína de ligação reguladora de esteróis (SREBP-1), a qual regula a síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicérides (Yang, 2018).

Dada a importância do desequilíbrio redox e da inflamação na patogênese da obesidade, várias estratégias terapêuticas usando antioxidantes com propriedades anti-inflamatórias têm sido testadas com o objetivo de atenuar o desenvolvimento desta doença. O licopeno é um carotenoide sem atividade provitamina A, lipossolúvel, responsável pela coloração vermelho-alaranjada de tomate, melancia, uva, mamão dentre outras frutas e vegetais, sendo principalmente encontrado em tomates (Mangels et al., 1993). Os carotenoides hidrocarbonetos, como é o caso do licopeno, são compostos por carbono e hidrogênio. Geometricamente o licopeno pode apresentar-se na forma *cis*- e *trans*-, fator influente na sua biodisponibilidade (Figura 2) (Sies & Stahl, 1998). A capacidade antioxidante dos carotenoides está relacionada ao seu número de duplas ligações conjugadas. Tal relação torna o licopeno o antioxidante mais potente dentre os carotenoides, apresentando especial habilidade em se ligar ao oxigênio *singlete* H_2O_2 (Stahl & Sies, 2003). Somado ao caráter antioxidante, o licopeno tem se mostrado um agente anti-inflamatório que contribui para o controle de diversas doenças (Rao & Agarwal, 1999). Mais recentemente o carotenoide tem sido associado a

Objetivo

O objetivo geral do presente estudo será o de verificar a influência da suplementação com licopeno sobre o comprometimento bioquímico, funcional e morfológico renal em modelo experimental de obesidade induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos simples e gordura saturada.

Os objetivos específicos são:

- 1) Caracterizar a obesidade e doenças correlatas.
- 2) Verificar a biodisponibilidade renal do licopeno.
- 3) Avaliar a influência da suplementação com licopeno sobre: parâmetros nutricionais e bioquímicos gerais; morfologia, função e marcadores da oxidação lipídica/proteica no tecido renal.

Material e Métodos

1. Protocolo Experimental

Foram utilizados ratos *Wistar* (n=40), com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu-Unesp, os quais foram mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental-Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram randomizados inicialmente em dois grupos com diferentes tratamentos dietéticos *ad libitum*: grupo controle (C, n=20) - dieta padrão + água ou grupo obeso (Ob, n=20) - dieta hipercalórica rica em carboidrato simples e gordura saturada (alto teor de carboidrato simples e gordura + água acrescida de sacarose - 25% (total de carboidratos: 78%, total de gordura: 16,54%) por 20 semanas. A composição nutricional das dietas está apresentada no Quadro 1. Após a 20^a semana, momento de detecção do comprometimento renal via proteinúria nos animais obesos (**Maric-Bilkan, 2013; Francisqueti, 2018**), ambos os grupos foram redistribuídos em quatro grupos: Controle (C, n=10); Controle + licopeno (C+Li, n=10); Obeso (Ob, n=10) e Obeso + licopeno (Ob+Li, n=10). O licopeno foi fornecido via gavagem na dose de 10mg/kg/dia por 10 semanas (**Luvizotto, 2015**) foi misturado com óleo de milho e administrado via gavagem. Os animais dos grupos C e Ob receberam diariamente, via gavagem, óleo de milho em volume similar aos animais suplementados com licopeno (Figura 3).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura (24±2°C), umidade (55±5%) e ciclo claro-escuro (12-12hs) controlado. O consumo das dietas e a ingestão de bebida foram mensurados diariamente e o peso corporal aferido semanalmente. Após 30 semanas os animais foram anestesiados com tiopental (dose de 120 mg/kg/i.p.). Os animais foram decapitados após verificação da ausência dos reflexos palpebral, podal, interdigital e caudal. Foi coletado o sangue, os rins e o tecido adiposo. Todo procedimento que envolveu coleta de amostras foi realizado em ambiente protegido da luz. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, sob o número 1147/2015 e seguiu as recomendações do “Improving Bioscience Research Reporting : The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research”.

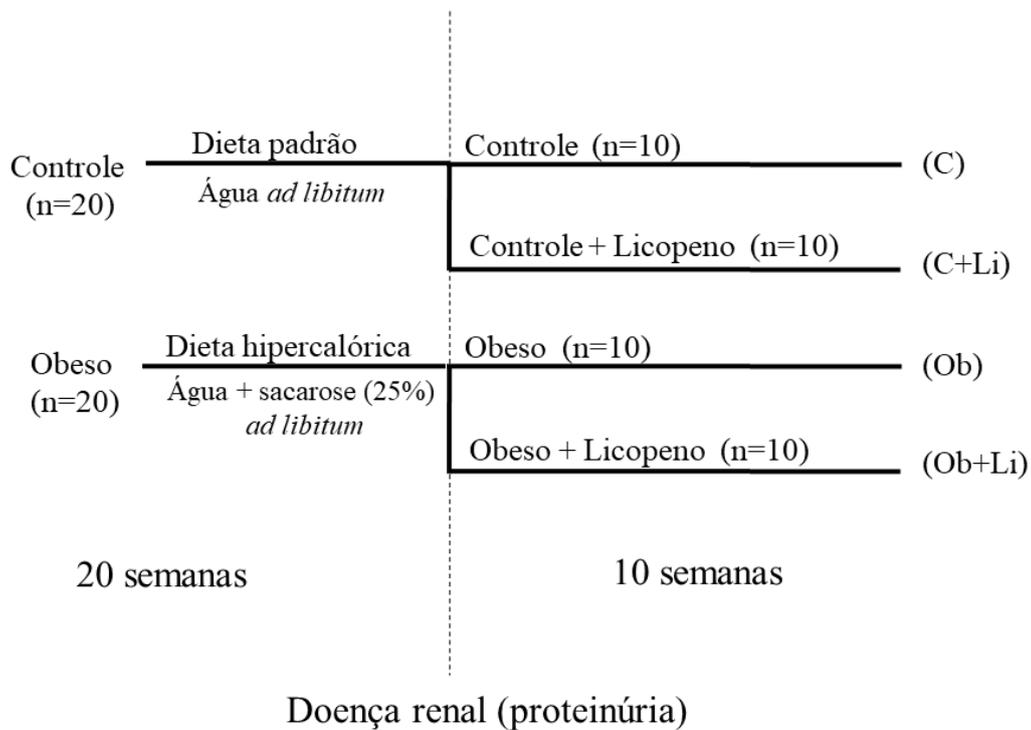


Figura 3. Protocolo Experimental.

2. Indução da obesidade

O modelo escolhido para a indução da obesidade foi dieta hipercalórica rica em carboidratos simples (sacarose e frutose) e gordura saturada (banha de porco), conforme descrito previamente (Francisqueti et al., 2017).

Quadro1. Composição da dieta padrão e obeso

Ingredientes	DP	DO
Farelo de Soja (g/kg)	335	340
Sorgo (g/kg)	278	80
Casca de Soja (g/kg)	188	117
Dextrina (g/kg)	146	20
Açúcar Refinado (g/kg)	-	80
Frutose (g/kg)	-	180
Óleo de Soja (g/kg)	24	-
Banha de Porco (g/kg)	-	154
Premix Vitamínico e Mineral (g/kg)	25	25
Sal (g/kg)	4	4
Composição de macronutrientes		
Proteínas (g/kg)	200	180
Carboidratos (g/kg)	600	535
Gorduras (g/kg)	40	165
Fibras (g/kg)	90	61
Cinzas (g/kg)	70	59
Energia(kcal/g)	3,59	4,35

DP: dieta padrão; DO: dieta obeso. Aos animais dos grupos Ob e Ob+Li, foi fornecido uma solução de sacarose à 25% como fonte hídrica.

3. Suplementação com licopeno

O licopeno utilizado foi o licopeno óleo-resina misturado com óleo de milho na dose de 10mg/kg/dia e foi administrado via gavage aos animais, (C+Li e Ob+Li) por 10 semanas. Para evitar diferenças na energia oferecida, durante o mesmo período, os animais dos grupos não suplementados (C e Ob) receberam óleo de milho via gavage em volume equivalente ao oferecido aos grupos licopeno (C+Li e Ob+Li) (~0,5mL/kg peso/dia). A dose de 10mg/kg/dia de licopeno foi selecionada com base em prévios estudos (Ibrahim, 2008; Ali & Agha, 2009; Luvizotto et al., 2013 e 2015) e foi conferida por espectrofotometria de acordo com estudos do nosso grupo (Luvizotto et al., 2013 e 2015).

4. Caracterização da obesidade

O índice de adiposidade foi utilizado como indicador de obesidade, pois permite avaliar a quantidade de gordura corporal dos animais (Jacobsen, et al., 2017). Após a eutanásia foram dissecados os depósitos de gordura epididimal, visceral e retroperitoneal dos animais. A soma dos depósitos foi normalizada pelo peso corporal [(epididimal+retroperitoneal+visceral) /peso corporal x 100] sendo considerado o índice de adiposidade.

5. Doenças associadas à obesidade

5.1 Hipertensão arterial sistólica

Neste estudo foi realizada a análise da pressão arterial sistólica caudal por meio da técnica de plestimografia, utilizando-se eletroesfigmomanômetro *NarcoBio-System*® PE 300, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, Houston, TX, USA). Este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica (Vileigas, 2015). Os animais foram aquecidos à 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal. Em seguida, manguito conectado a transdutor de pulso foi acoplado à cauda do animal, sendo posteriormente insuflado (200 mmHg) e desinsuflado, respectivamente, para registro das pulsações arteriais. Os registros foram obtidos com o auxílio de sistema de aquisição de dados computadorizado (*AcqKnowledge*®MP36, Biopac Systems, Santa Barbara, USA). Os animais foram avaliados na 20ª e 30ª semana do período experimental.

5.2 Alterações Bioquímicas Metabólicas e Renais

As dosagens bioquímicas foram realizadas ao término do período experimental. Para tal, animais foram submetidos a jejum de 8 horas. Para obtenção do plasma, amostras de sangue foram coletadas em tubos tipo *Falcon*, contendo anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na proporção de 0,1 mL para cada 5mL de sangue. A seguir os tubos foram centrifugados a 3000rpm por 10 minutos (*Eppendorf*® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e o sobrenadante foi armazenado a -80°C para realização das análises. Foram aferidas as concentrações plasmáticas de glicose, proteínas totais, ureia, creatinina e ácido úrico. A urina foi coletada durante 24 horas, com os animais alocados em gaiolas metabólicas, para a aferição de creatinina,

albumina e proteína total. Todas essas mensurações do plasma e urina foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico utilizando kits comerciais (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brasil) em equipamento bioquímico automatizado (BS-200 Mindray, China). Com o objetivo de avaliar a resistência à insulina decorrente da obesidade, foi avaliado o teste do HOMA-IR. Para isso foram dosados a glicose (vide acima) e a insulina via técnica de ELISA, utilizando kit comercial (Linco Research Inc., R&D Systems®, Millipore e B-BrigdeInternational Inc.). O HOMA-IR foi calculado pela seguinte fórmula: $\text{insulina jejum } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glicose jejum } (\text{mmol/L}) / 22,5$. A função renal foi avaliada por medidas no plasma e na urina, sendo calculadas as seguintes razões: albumina/creatinina e proteína/creatinina (**Herman, 2019**).

6. Biomarcadores do Dano Oxidativo

6.1 Malondialdeído

A dosagem de Malondialdeído (MDA) foi realizada em homogenato de tecido renal (1:10 em PBS) com técnica rotineiramente utilizada em nosso laboratório (**Nielsen et al., 1997**). Para a quantificação do MDA foram utilizados 250 μL de homogenato para 750 μL de ácido tricloroacético à 10%, para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 5 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ao sobrenadante ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% na proporção de 1:1 e as amostras aquecidas por 15 minutos a 100°C. O MDA reagiu com o TBA na proporção 1:2, respectivamente e após resfriamento foi realizada a leitura a 535 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de MDA foi obtida através do coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e das absorbâncias das amostras, sendo o resultado final expresso em nmol/g de proteína (**Samarghandian et al., 2016**). A proteína total do tecido renal foi analisada por meio de *kit* comercial colorimétrico (Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brasil) e aferida em espectrofotômetro a 545nm.

6.2 Carbonilação de proteínas

A carbonilação foi determinada por método adaptado de Mesquita, 2014 (**Mesquita et al., 2014**) em 100 μL de homogenato para 100 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As amostras ficaram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente adicionado 50 μL de

NaOH(6 M) e incubadas novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e o resultado obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado final expresso em nmol/mg de proteínas. A proteína total do tecido renal foi analisada por meio de *kit* comercial colorimétrico (Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brasil) e aferida em espectrofotômetro a 545nm.

7. Análise do licopeno no tecido renal

O tecido renal foi pesado e analisado após a saponificação, conforme descrito anteriormente (Ferreira et al., 2007). Resumidamente, as amostras (150–200 g) foram cortadas em pequenas fatias antes da adição de 100 μl (0,095 mol / l) de pirogalol em etanol, 300 μl (0,5 mol / l) de KOH em H_2O e 1 ml de etanol. A mistura foi agitada no vórtex e incubada a 37°C durante 2 horas enquanto os tubos estavam cobertos com parafilme. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, foi adicionado 1 ml de H_2O e a mistura foi submetida a vórtex. Foi adicionada equinenona em etanol (100 μl) como padrão interno. Esta mistura foi agitada com 3 ml de éter anidro/hexano (2:1, estabilizado com 1% de etanol v/v), depois foi agitada em vórtex e centrifugada a $800 \times g$ a 4°C durante 5 min. A camada superior foi removida, a extração repetida e as camadas superiores foram combinadas. Foi adicionado H_2O (2ml), a solução foi agitada no vórtex e foram adicionados 2 ml de etanol antes da centrifugação a $800 \times g$ durante 5 min. A camada de hexano foi evaporada completamente sob N^2 , e o resíduo foi redissolvido em 100 μl de etanol, agitado no vórtex e sonificado duas vezes durante 30 segundos, e centrifugado a $800 \times g$ a 4°C por 2 min. Foi utilizada alíquota de 50 μl para análise por HPLC. Todas as análises das amostras foram feitas em duplicado. Todo o processamento foi realizado sob luz vermelha. A recuperação do padrão interno adicionado foi consistentemente > 90%.

O sistema HPLC utilizado foi o Waters Alliance 2695 (Waters, Wilmington, MA, EUA) que consiste em bomba e cromatografia ligada a um detector de matriz de fotodíodo (modelo 2996), uma coluna de carotenoide C30 (3 mm, 150 \times 4,6 mm, YMC, Wilmington, MA, EUA) e software Empower. O detector de arranjo de fotodíodo foi ajustado em 475 nm para a aferição do licopeno. A fase móvel do HPLC foi metanol/éter metil-terc-butílico/água (83: 15: 2, v/v/v, 15 g/l de acetato de amônio na água, solvente A) e metanol/éter metil-terc-butílico/água (8: 90: 2, v/v/v, 10 g/l de

acetato de amônio na água, solvente B). O procedimento de gradiente, a uma taxa de fluxo de 1 ml/min a 16°C, foi como se segue: (i) foi utilizado 100% de solvente A durante 2 min, seguido de 6 min de gradiente linear para 70% de solvente A; (ii) 3 min de espera seguida por 10 min de gradiente linear para 45% do solvente A; (iii) a 2 min de espera, depois 10 min de gradiente linear para 5% de solvente A; (iv) 4 min de espera e depois 2 min de gradiente linear a 100% de solvente A. O licopeno *all-trans* foi quantificado pela determinação das áreas do pico (*all-trans*) dos cromatogramas calibrados por meio de quantidade conhecida do licopeno padrão (sigma-Aldrich). Os valores foram corrigidos pela recuperação do padrão interno (Echinenona).

8. Morfologia Renal

Fragmentos do tecido renal (3mm de espessura) foram fixados por 48h em formalina tamponada a 10% e emblocados em parafina. Posteriormente, o bloco foi submetido a cortes histológicos de 5micras, seguidos de coloração com Hematoxilina & Eosina (HE). As amostras foram analisadas por microscopia óptica, sendo as lesões classificadas e registradas com auxílio de analisador de imagens. O nível de gravidade identificado e graduado (sob supervisão de patologista especializada) à partir de escala: 1(normal) a 4 (anormalidade), sendo esta análise semi quantitativa. A graduação (*score*) da extensão da lesão resultou da análise de 10 campos, escolhidos aleatoriamente, com área de análise de aproximadamente 2,5mm². A análise considerou: nefrite intersticial, esclerose glomerular, lipidose tubular, degeneração hidrópica e necrose tubular aguda. O critério para identificar nefrite intersticial foi a presença de inflamação (neutrófilo, linfócito, macrófago). O critério para identificar esclerose glomerular foi pela presença de espessamento uniforme difuso de alças capilares, incluindo parede da cápsula de Bowman. O critério para identificar lipidose tubular foi a presença de imagens negativas macro e micro goticulares. O critério para identificar necrose tubular aguda foi a presença de linfócitos e macrófagos na luz dos capilares da região medular. As imagens foram capturadas com o microscópio óptico Carl zeiss, LAb A1, Germany, nas objetivas 10X e 40X, utilizando o software AxioVision 4.8.

9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando Sigma Stat versão 2.0 (JandelScientific Software, San Rafael, CA, USA). Os dados paramétricos foram apresentados como

média \pm desvio-padrão e as comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e complementado com o teste *post-hoc* de Tukey. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e intervalos interquartis (p25 e p75) e o teste utilizado foi o Kruskal-Wallis, complementado pelo teste *post-hoc* de Dunn. As diferenças foram discutidas com $P < 0,05$.

Resultados

Os resultados mostraram que ao final de 30 semanas o modelo adotado promoveu obesidade caracterizada pelo aumento do índice de adiposidade em relação aos grupos controle (Tabela 1). A obesidade ocorreu mesmo com menor consumo de ração e semelhante ingestão calórica em relação aos animais controles. Contudo a suplementação com licopeno não modificou o índice de adiposidade, a ingestão calórica total e eficiência alimentar (Tabela 1). O aumento da pressão arterial sistólica foi associado à dieta, mas não foi modificado pela suplementação com licopeno (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil nutricional e pressão arterial sistólica

Variáveis	Grupos				Efeito		
	C	C+Li	Ob	Ob+Li	Dieta	Tratamento	Interação
PCI(g)	207±6	215±6	212±6	200±7	0,465	0,761	0,15
PCF (g)	507±21	514±22	535±21	536±22	0,259	0,838	0,887
Ganho de peso (g)	320±40	299±42	344±40	322±40	0,568	0,608	0,998
DGE (g)	7±1	7±1	13±1*	13±1	0,001	0,809	0,975
DGR (g)	7±1	9±1	21±1*	23±1	0,001	0,303	0,813
DGV (g)	4,8±0,8	5,2±0,9	9,2±0,8*	10±0,9	0,001	0,533	0,795
GCT (g)	20±3	21±3	44±3*	47±3	0,001	0,513	0,85
Índice de adiposidade (%)	3,9±0,4	4,3±0,4	8,0±0,4*	8,7±0,4	0,001	0,222	0,715
PAS (mmHg)	121±3	119±4	137±3*	146±4	0,001	0,398	0,223
Ingestão alimentar (g)	23±5	24±5	11±3*	11±3	0,001	0,001	0,001
Ingestão hídrica (ml)	32±8	32±9	40±12*	43±13	0,001	0,001	0,001
Ingestão calórica (kcal)	83±9	86±10	88±9*	91±9	0,048	0,004	0,002
Eficiência alimentar (%)	0,0044± 0,0006	0,0027± 0,0006	0,0013± 0,0006*	0,0012± 0,0006	0,001	0,184	0,237

Dados expressos como média ± desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; PCI, peso corporal inicial; PCF, peso corporal final; DGE, depósito de gordura epididimal; DGR, depósito de gordura retroperitoneal; DGV, depósito de gordura visceral; GCT, gordura corporal total; PAS, pressão arterial sistólica; Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foi usado para comparar grupos, $p < 0,05$ (*, diferente de C).

Os resultados mostraram que ao final de 30 semanas, o modelo de dieta adotado foi eficiente em induzir hiperinsulinemia e resistência à insulina (HOMA-IR). A

suplementação com licopeno diminuiu os níveis plasmáticos de insulina assim como a resistência à insulina (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil glicídico

Variáveis	Grupos				Efeito		
	C	C+Li	Ob	Ob+Li	Dieta	Tratamento	Interação
Glicemia (mg/dL)	77±4	90±5	97±4	105±6	0,002	0,051	0,613
Insulina (UI/mL)	0,9±0,2	1,3±0,2	5,6±0,2*	1,4±0,2 [#]	0,001	0,001	0,001
HOMA-IR	0,15±0,07	0,30±0,08	1,37±0,07*	0,29±0,08 [#]	0,001	0,001	0,001

Dados expressos como média ± desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase; Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foi usado para comparar grupos, $p < 0,05$ (*, diferente de C; [#], diferente de Ob).

A Figura 4 apresenta o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre os marcadores plasmáticos da função renal. Ausência de diferença entre os grupos pode ser observada.

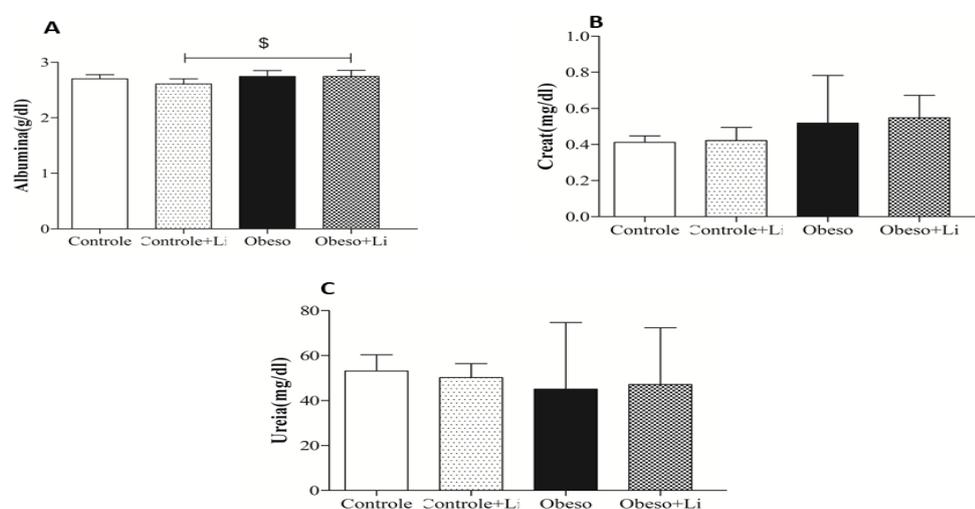


Figura 4. Marcadores plasmáticos da função renal. A: Albumina; B: Creatinina; C:Ureia. Dados expressos como média ± desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foi usado para comparar grupos, $p < 0,05$ (\$, diferença entre C+Li e Ob+Li).

A Figura 5 apresenta o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre os marcadores urinários da função renal. A dieta no grupo obeso promoveu aumento da relação proteína/creatinina (C vs.Ob) e a suplementação com licopeno reduziu tal

parâmetro (Obvs.Ob+Li). Os outros marcadores não mostraram diferença entre os grupos.

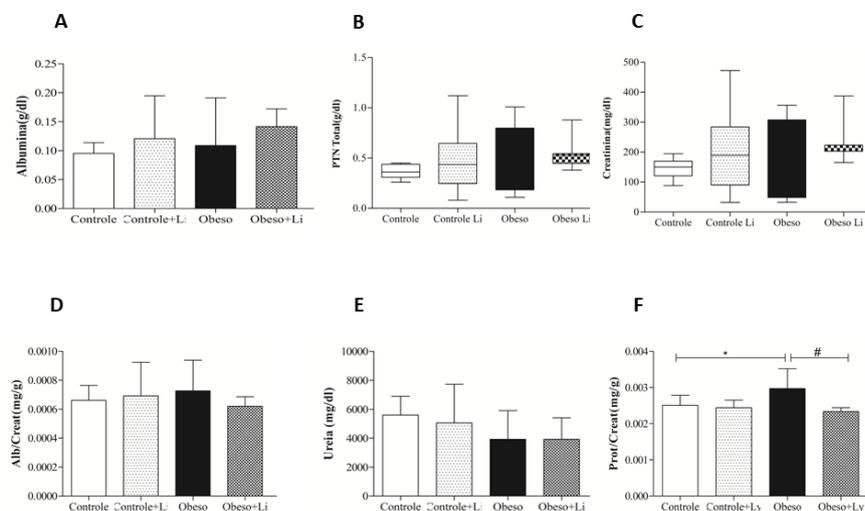


Figura 5. Marcadores urinários da função renal.A: Albumina; B: PTN Total; C: Creatinina; D: Alb/Creat; E: Ureia; F: Prot/Creat; Dados expressos como média ± desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foi usado para comparar grupos, $p < 0,05$ (*, diferença entre C vs.Ob; #, diferença entre Ob vs. Ob+Li)

A Figura 6 apresenta o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre os biomarcadores do dano oxidativo do tecido renal (Carbonilação de Proteínas e MDA). A administração da dieta obeso foi associada ao aumento da carbonilação (Ob vs. C) e a suplementação com licopeno foi capaz de reduzir tal aumento da carbonilação (Ob+Li vs. Ob). Por outro lado, o MDA não foi modificado pela dieta. A suplementação com licopeno reduziu o MDA (C vs. C+Li; Ob vs. Ob+Li).

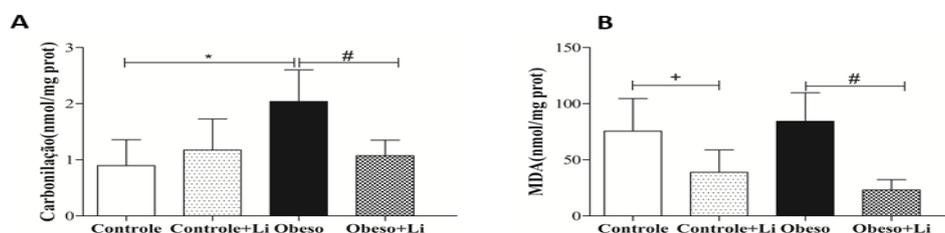


Figura 6. Biomarcadores do dano oxidativo. A: Carbonilação de proteínas; B: MDA; Dados expressos como média ± desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foi usado para comparar grupos, $p < 0,05$ (*, diferença entre C vs.Ob; #, diferença entre Ob vs. Ob+Li; +, diferença entre C vs. C+Li)

Os dados da biodisponibilidade do licopeno no tecido renal estão apresentados na Tabela 3. Após 10 semanas de suplementação com licopeno, os níveis renais ($\mu\text{g}/100\text{g}$) de licopeno alcançaram 13,24 no grupo C+Li e 11,43 no grupo Ob+Li.

Tabela 3. Concentração de licopeno no tecido renal

Variável	Grupos			
	C	C+Li	Ob	Ob+Li
Licopeno ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	nd	13,24 \pm 0,02*	nd	11,43 \pm 0,01*

Dados expressos como média \pm desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; nd, não detectado; Teste t de *Student* foi usado para comparar grupos, *, p=0,001, significativamente diferente do grupo C ou Ob.

A Tabela 4 apresenta as diferenças entre os grupos em relação às lesões histológicas renais. As lesões foram caracterizadas por lipidose tubular, esclerose glomerular, nefrite intersticial, degeneração hidrópica e necrose tubular aguda (NTA). Os rins dos animais do grupo controle e grupo C+Li não apresentaram alterações histológicas. Contudo, o tratamento com dieta obeso foi seguido por lesões de distribuição multifocal. A maioria das áreas era consistente e gravemente afetada. A suplementação com o licopeno recuperou parcialmente as lesões induzidas pela dieta rica em carboidrato. Tais alterações renais foram identificadas em tecido de animais tratados com a dieta obeso e suplementados com licopeno. Contudo, tais alterações foram atenuadas com a suplementação com o carotenoide. A análise semi-quantitativa revelou aumento da lipidose no grupo Obeso C vs Ob; p=0,004) e significativa diminuição de tal alteração com a suplementação com licopeno (Ob vs Ob+Li; p=0,014). Similar resultado foi observado para as outras lesões, contudo, sem diferença significativa entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Morfologia renal

Variáveis (Lesões)	Grupos				Efeito		
	C	C + Li	Ob	Ob + Li	Dieta	Tratamento	Interação
Lipidose Tubular	1,25±0,46	1,80±0,45	2,13±0,64*	1,25±0,50 [#]	0,004	0,014	0,004
Esclerose Glomerular	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	NS	NS	NS
Nefrite Intersticial	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	NS	NS	NS
Degeneração Hidrópica	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	NS	NS	NS
Necrose Tubular Aguda	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	NS	NS	NS

Dados expressos como média ± desvio padrão; Grupos: C, controle; C+Li, controle+licopeno; Ob, grupo obeso; Ob+Li, obeso+licopeno; n=10 animais/grupo; NS, não significante; Two-way ANOVA com post-hoc Tukeyfoi usado para comparar grupos, p < 0,05 (*, diferente de C; [#], diferente de Ob).

A Figura 7 apresenta imagens representativas das alterações histológicas renais. O grupo controle apresentou discreto acúmulo de lipídios próximo ao citoplasma de suas células, ausência de pigmento acastanhado (hemossiderina), bem como infiltrado inflamatório (A). No grupo C+Li, foi verificado depósito de lipídio, em pequena quantidade, em túbulos; além de aspecto normal do núcleo. Também foi observado discreto infiltrado inflamatório, relevante quantidade de hemácias íntegras e degeneradas (por vezes aderidas à parede do vaso) (B). O grupo Ob exibiu disposição desorganizada de túbulos pelo aumento de volume, em consequência ao acúmulo de lipídios (lipidose). Tal deformação tubular corresponde à vacuolização citoplasmática que resulta em afastamento do núcleo da sua posição normal. Além disso, há infiltrado inflamatório focal. Por fim nota-se pigmento acastanhado no citoplasma da maioria dos túbulos que lembram hemossiderina (C). O grupo Ob+Li apresentou recuperação expressiva das alterações tubulares com diminuição da quantidade de vacuolização, além da ausência de hemossiderina e de processo inflamatório (D).

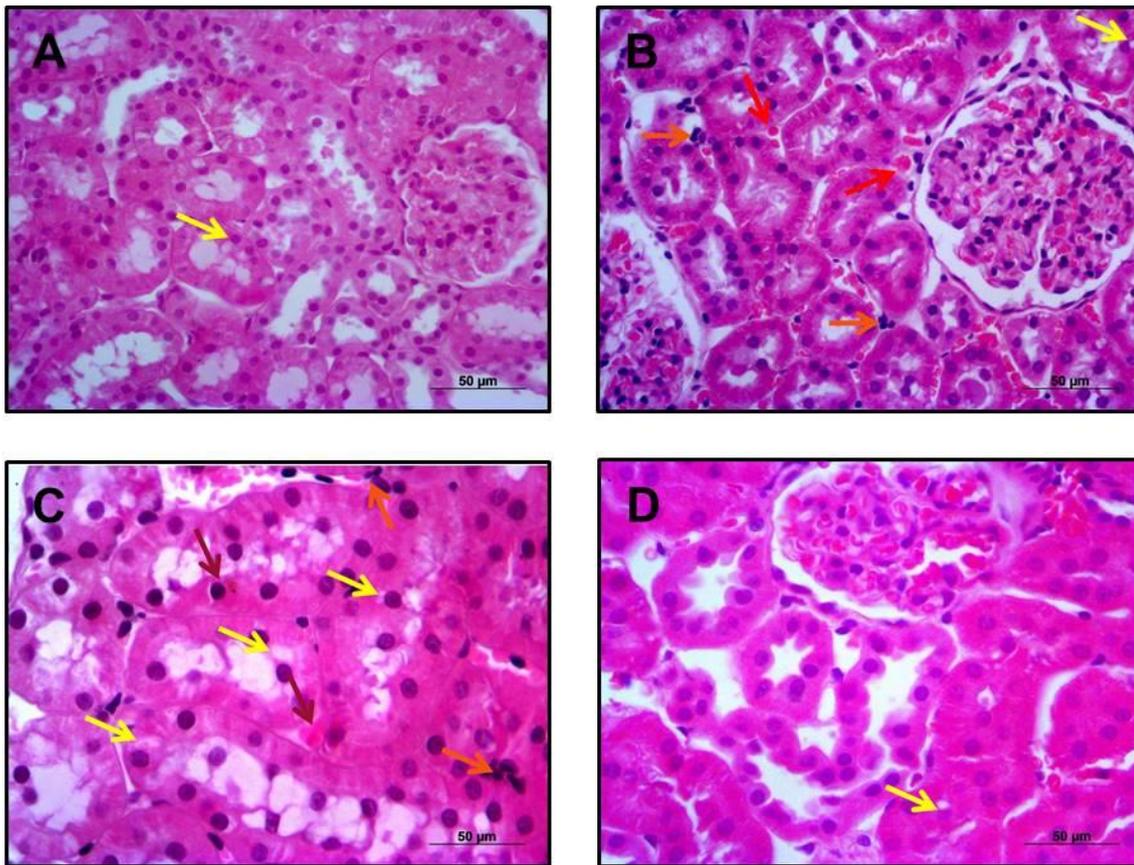


Figura 7. Morfología renal. A: grupo C; B: grupo C+Li; C: grupo Ob; D: grupo Ob+Li; C: controle; C+Li: controle+licopeno; Ob: obeso; Ob+Li:obeso+licopeno; \rightarrow (yellow):lipidose tubular; \rightarrow (red): hemorragia; \rightarrow (orange): infiltrado inflamatório; \rightarrow (red): hemácias.

Discussão

No presente estudo, o modelo experimental para indução de obesidade foi bem sucedido. Hiperadiposidade, hipertensão arterial e grave resistência à insulina foram detectadas nos animais do grupo Ob. Paralelamente, o tecido renal destes animais apresentou comprometimento morfológico, danos oxidativos e alteração da função. O objetivo do presente estudo foi verificar a influência da suplementação com licopeno sobre este modelo. O tratamento com licopeno (confirmado pela presença do carotenoide no tecido renal) mostrou-se eficaz, resultando na melhora do perfil glicídico, marcado pela melhora da resistência à insulina; de parâmetros morfológicos dos rins como menor número de focos de lipidose; atenuação de danos oxidativos, marcada pelas menores concentrações de proteínas carboniladas no tecido renal; e melhora da função renal, marcada pelos valores menores da relação prot/creat urinária.

Disfunções renais associadas à obesidade

O estilo de vida moderno, caracterizado pelo consumo de dietas desequilibradas, ricas em açúcar e gordura, é fator desencadeante para o desenvolvimento da obesidade e de doenças relacionadas (Hall, 2018). Em modelos experimentais com animais, a indução da obesidade por meio de dieta hipercalórica mimetiza os hábitos alimentares de humanos em regiões industrializadas e reproduz as alterações teciduais em diversos órgãos (Moreno-Fernández et al., 2018). Os mecanismos pelos quais a obesidade induz DRC não estão totalmente esclarecidos, entretanto, a presença de resistência à insulina parece ser uma das comorbidades da obesidade diretamente associado ao desenvolvimento de doenças renais de várias causas (Liao et al., 2012). Em estudo longitudinal com mais de dez mil sujeitos, Kurella e colaboradores (Kurella et al., 2005) demonstraram que a resistência à insulina esteve associada aos menores valores de taxa de filtração glomerular de maneira independente. Nestas condições, a resistência à insulina acarretaria maiores concentrações de glicose circulante e resultaria em glicotoxicidade renal. Embora sem diferença significativa, os valores de glicemia dos animais obesos estiveram acima de 100mg/dL, enquanto os valores de glicemia dos animais controles estiveram abaixo de 100mg/dL.

Outros componentes da obesidade fortemente associados ao desenvolvimento de doenças renais são a hiperadiposidade e dislipidemia (**Francisqueti et al, 2017**). A hiperadiposidade do tipo abdominal, característica de condições de consumo exacerbado de açúcares, é responsável pela liberação de grandes quantidades de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) na corrente sanguínea. NEFA são transportados no sangue associados à albumina e captados pelo fígado (**Björntorp, 1990**). Paralelamente, quantidades exacerbadas de açúcares provenientes da dieta também são captadas pelo fígado onde são convertidas em NEFA. No fígado, grandes quantidades de NEFA estimulam a síntese de VLDL, cuja função é distribuir os lipídeos na forma de triglicerídeos e colesterol para tecidos periféricos (**De Bosch et al., 2014**). O acúmulo lipídico nos rins pode ocorrer de maneira externa (lipomatose) ou interna (degeneração gordurosa ou esteatose) (**Unger & Orci, 2000**). Na degeneração gordurosa dos rins, os lipídeos são captados e estocados na forma de gotículas intracelulares contendo triglicerídeos e ésteres de colesterol. Este acúmulo interno ocorre de maneira primária e caracteriza-se morfológicamente pela presença de gotículas lipídicas principalmente nas células dos túbulos renais e nas células mesangiais e podócitos (**Montaniet al., 2004**). No presente estudo, os animais do grupo Ob apresentaram maior número de focos de lipidose nas células dos túbulos renais em comparação ao grupo C. A evolução patológica da degeneração gordurosa dos rins caracteriza-se pela formação de células mesangiais esponjosas e glomerulomegalia, que impacta de forma substancial a função de filtração glomerular. Alterações morfológicas de células mesangiais e glomérulos não foram observadas nos animais do grupo Ob, entretanto, a função glomerular destes animais apresentou prejuízo, marcado pelos valores maiores de prot/creat urinário.

O acúmulo intracelular de lipídeos promove sérios danos oxidativos ao tecido renal. Metabólitos lipídicos tóxicos como diacilgliceróis e ceramidas promovem desequilíbrio redox do ambiente celular favorecendo acúmulo de moléculas oxidadas e oxidantes (**Savage et al., 2007**). Este estado pró-oxidante desencadeia o desenvolvimento de disfunção mitocondrial e conseqüentemente menor oxidação de NEFA, contribuindo para a progressão da degeneração gordurosa. A disfunção mitocondrial também é caracterizada pela produção exacerbada de radicais livres do oxigênio (**Murphy, 2013**). Como já abordado na introdução, estes radicais livres podem causar danos oxidativos em biomoléculas funcionais do organismo como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. No presente estudo, as maiores concentrações de

proteínas carboniladas foram observadas nos animais do grupo Ob em comparação aos do grupo C. As concentrações de MDA foram semelhantes entre os grupos Ob e C, entretanto, um componente alimentar presente na ração dos animais do grupo C pode, em parte, ter influenciado este resultado. A fonte lipídica na dieta padrão era constituída por óleo de soja, enquanto na dieta controle era constituída por banha de porco. Óleos vegetais são mais susceptíveis à lipoperoxidação e conseqüentemente resultam em maior formação de MDA (Al-Orf, 2011; Liu et al., 2014).

Tratamento com licopeno sobre alterações induzidas pela obesidade

O licopeno é um carotenoide conhecido por sua atividade antioxidante e anti-inflamatória. Contribui para o controle da homeostase redox e estudos têm demonstrado importante efeito modulatório do metabolismo lipídico (Evans & Magelsdorf, 2014; Caris-Veyrat et al., 2016). A capacidade antioxidante deste carotenoide está relacionada à presença de duplas ligações na sua estrutura molecular. O licopeno apresenta habilidade especial na extinção do radical superóxido (Ferreira et al., 2011).

O consumo de dietas ocidentais ricas em açúcares e gorduras impactam negativamente no consumo de fibras alimentares provenientes de frutas e verduras, principais fontes de pigmentos como os carotenoides, dentre os quais figura licopeno (Mecca et al., 2012). Assim, a suplementação de licopeno, bem como o conhecimento de suas funções, se faz importante. Ademais, os efeitos do licopeno sobre a degeneração gordurosa renal não são claros. No presente estudo, após indução de obesidade com danos ao tecido renal foi realizado tratamento com licopeno. A suplementação com licopeno impactou no aumento da sensibilidade à insulina pelo menor dano oxidativo e melhora da função renal no grupo Ob+Li em comparação ao grupo Ob.

A suplementação de licopeno parece melhorar a sensibilidade à insulina. Este efeito parece estar associado ao potencial anti-inflamatório do licopeno. Estudos demonstraram que o licopeno é eficaz na redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (Pierine et al., 2014; Costa et al., 2019). O TNF- α é um dos principais bloqueadores intracelulares do estímulo insulínico. Recentemente, um estudo associou o efeito do licopeno sobre a melhora da sensibilidade à insulina a um importante mediador molecular do metabolismo lipídico: a proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1c) (Zeng et al., 2017). Esta proteína é fundamental para a síntese de “de novo” de NEFA e esteróis em tecidos como fígado e

rins (**Sun et al., 2002**). O licopeno parece modular a ativação deste componente refletindo na menor taxa de síntese de lipídeos (**Palozza et al., 2012; Zeng et al., 2017**). Apesar dos efeitos sistêmicos do licopeno resultarem em melhor sensibilidade insulínica possivelmente associada às ações anti-inflamatória e modulatória do metabolismo lipídico, os dados do presente estudo também sugerem efeitos locais deste composto. Foram observadas grandes concentrações de licopeno no tecido renal dos animais suplementados em comparação aos não suplementados. Além disso, o tecido renal dos animais suplementados apresentou menores concentrações de produtos de danos oxidativos. As concentrações de MDA foram menores em ambos os grupos suplementados com licopeno, C+Li e Ob+Li. Este efeito demonstra o potencial protetor do licopeno contra lipoperoxidação mesmo na ausência da doença, isto porque as concentrações de MDA estiveram aumentadas no grupo Controle devido a um componente alimentar, como já discutido anteriormente. Um estudo recente utilizando este modelo de indução de obesidade detectou o mesmo comportamento no tecido hepático (**Costa et al., 2019**). Paralelamente, a suplementação de licopeno também impactou em menores concentrações de proteínas carboniladas nos grupos Controle, C+Li e Ob+Li em comparação ao grupo Ob. A formação de grupos carbonila em sítios nucleofílicos de proteínas pode ocorrer de forma primária ou secundária. A forma primária pode ser catalisada por metais e é desencadeada por radicais livres como superóxido e radical hidroxil. Já a secundária é desencadeada principalmente por produtos da lipoperoxidação como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (**Mol et al., 2017**). As menores concentrações de proteínas carboniladas nos grupos suplementados podem ser atribuídas à atividade queladora de radicais livres do licopeno, impactando principalmente no processo primário de adição de grupos carbonila nas proteínas do tecido renal (**Aldini et al., 2015**). No grupo controle, as concentrações de proteínas carboniladas foram, como esperado, numericamente menores do que as dos demais grupos, não seguindo o padrão de concentrações aumentadas de MDA. Este comportamento, também observado em outros estudos que adotaram modelo semelhante (**Francisqueti et al., 2017; Costa et al., 2019**), permanece sem explicação e pode ser alvo de estudos futuros para esclarecer se o MDA é de fato um determinante para a carbonilação de proteínas em comparação à demais espécies carbonila reativas (ECRs).

No presente estudo foram observados menores números de focos de lipidose no grupo Ob+Li em comparação ao grupo Ob. A ação antioxidante do licopeno, aliada à melhora da oxidação de lipídeos via modulação da SREBP-1c, pode promover melhor função mitocondrial nas células renais. Com isso, menor deposição ectópica de lipídeos e menor lipotoxicidade são esperados. Dessa forma, o licopeno parece contribuir para a prevenção de eventos patológicos que resultam na disfunção renal associada à obesidade. Além de menor número de focos de lipidose nas células dos túbulos renais, os animais do grupo Ob+Li apresentaram menores valores de prot/creat em comparação ao grupo Ob, caracterizando a presença de normalidade da função glomerular em animais obesos suplementados com licopeno. Com menor lipotoxicidade, menores concentrações de ceramidas e diacilgliceróis (principais agentes lipotóxicos) são observadas e, com isso, espera-se menor estímulo inflamatório (**Bellini et al., 2015**). Estudo anterior demonstrou importante efeito anti-inflamatório do licopeno no tecido renal (**Pierine et al., 2014**), resultando em menores concentrações de TNF- α via por meio da menor ativação do receptor para produtos finais da glicação (RAGE). Neste sentido, o presente estudo complementa o rol de atividades funcionais do licopeno no tecido renal, demonstrando efeito protetor contra a lipotoxicidade e, assim, contribuindo para menor processo inflamatório neste tecido. É importante salientar que não podemos excluir a contribuição potencial de outros compostos da tomate óleo-resina para as observações do presente estudo, já que existem pequenas quantidades de γ -tocoferol, α -tocoferol, β -caroteno, fitoflueno e fitoeno no tomate óleo-resina (**Richelle et al., 2002**; **Luvizotto, 2015**). Tem sido observado que o sinergismo entre diferentes compostos antioxidantes resulta em efeitos benéficos quando comparado ao efeito isolado de determinado composto (**Yeum et al., 2009**). Considerando a agressividade da dieta ocidental na indução de hiperadiposidade, o tratamento com licopeno demonstrou importante atividade modulatória sobre mecanismos que conduzem o agravamento de condições patológicas decorrentes. Além do potencial anti-inflamatório já conhecido, o tratamento com licopeno demonstrou efeito protetor contra resistência à insulina, degeneração gordurosa renal, danos oxidativos e promoveu melhora da função glomerular (Figura 8).

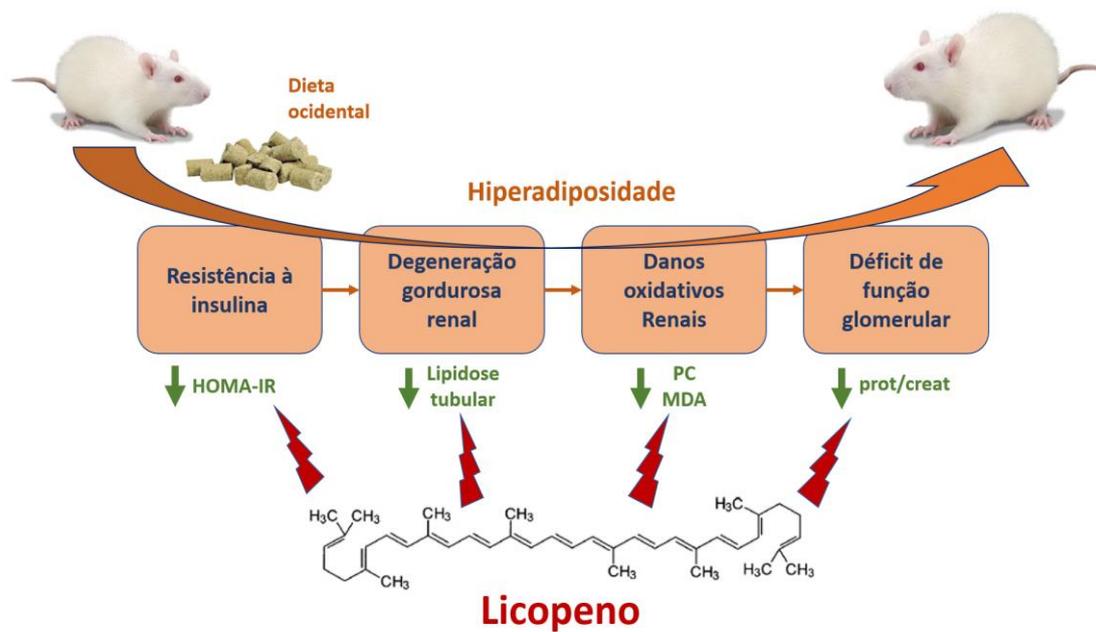


Figura 8. Desenvolvimento de alterações metabólicas e renais associadas à obesidade induzida por dieta ocidental e efeitos do tratamento com licopeno. Homa-IR: modelo de avaliação da homeostase de glicose; PC: Carbonilação de Proteína; MDA: malondialdeído; prot/creat: relação proteína por creatinina.

Conclusão

Em conclusão, o modelo de dieta adotado promoveu obesidade, aumento de pressão arterial, e de albumina plasmática sem influência da suplementação com o carotenoide. Por outro lado, o aumento de insulina sérica, índice HOMA-IR, índice urinário proteína/creatinina, carbonilação de proteínas de tecido renal e depósito de gordura renal (lipidose) verificado no grupo Obeso foram reduzidos com a suplementação com licopeno. Embora o desenho experimental adotado tenha mimetizado a situação clínica, ele não fornece informações sobre se esses achados são aplicáveis ou não a seres humanos. No entanto, destaca alguns benefícios importantes ao usar terapia não farmacológica adicional baseada em compostos naturais no tratamento da obesidade humana. Além disso, o presente estudo representa uma contribuição sobre o papel do licopeno na inflamação relacionada à obesidade. Esses dados sugerem que o licopeno pode representar uma estratégia terapêutica na atenuação da doença renal crônica e de alterações metabólicas associadas à obesidade.

Referências

- AL-ORF, S. M. Effect of oxidized phosphatidylcholine on biomarkers of oxidative stress in rats. **Indian J Clin Biochem**, v.26, p.154-60, 2011.
- ALBERTI, K. G. M. M., ZIMMET, P. & SHAW, J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. **Lancet**, v.366, n. 9491, p. 1059-62, 2005.
- ALDINI, G. et al. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 6, p. 1339-54, 2011.
- ALDINI, G. et al. Protein lipoxidation: Detection strategies and challenges. **Redox Biology**, v.5, p253-66, 2015.
- ALI, M. M.; AGHA, F. G. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v.69,n.3, p. 371-9, 2009.
- BAHIA L, et al. The endothelium in the metabolic syndrome. **ArqBrasEndocrinolMetabol**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006.
- BELLINI L, et al. Targeting sphingolipid metabolism in the treatment of obesity/type 2 diabetes. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.19, n.8, p.1037-50, 2015.
- BJÖRNTORP, P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. **Arteriosclerosis**, v.10, p.493-6, 1990.
- CARIS-VEYRAT, C. et al. Review about lycopene-induced nuclear hormone receptor signalling in inflammation and lipid metabolism via still unknown endogenous Apo-10'-lycopenoids. **Int J VitamNutr Res**, v.86, p.62-70, 2016.
- CHEN, J., et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. **Ann Intern Med**, v. 140, n. 3, p. 167-74, 2004.
- COSTA, M. R. et al. Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. **Antioxidants**, article 8080276, 2019.
- DEBOSCH, B. J. et al. Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. **J Biol Chem**, v.289, p.10989-98, 2014.
- DECLÈ A-E, et al., AMPK Mediates the Initiation of Kidney Disease Induced by a High-Fat Diet. **J Am Soc Nephrol**, v.22, n. 10, p.1846-55, 2011.
- DEJIN, et al. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, 296, n.1, p.118-26, 2009.
- DOBRIAN, A.D. et al. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. **Hypertension**, v.37, n. 2, pt. 2, p. 554-60, 2001.

DWYER, T.M. et al. Renal sinus lipomatosis and body composition in hypertensive, obese rabbits. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 19, n. 12, p. 869-74, 1995.

EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors, RXR & the big bang. **Cell**, v.157, p.255–66, 2014.

FERREIRA, A.L. et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. **MulatRes.**, v.631, n. 1, p.26-35, 2007.

FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Rev Bras Clin Med**, v.9, n. 1, p. 54-61, 2011.

FOSTER, M. C. et al. Fatty kidney, hypertension, and chronic kidney disease: the Framingham Heart Study. **Hypertension**, v.58, n. 5, p. 784-90, 2011.

FRANCISQUETI, F. V. et al. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1299, 2017.

FRANCISQUETI, F. V. **Inter-relação do Gama-oryzanol e ativação dos receptores Adipo-R1 e Adipo-R2: possível efeito na melhora da função renal associada à obesidade**. 2018. Tese (Doutora em Patologia) -Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, 2018.

HALL, K. D. Did the food environment cause the obesity epidemic? **Obesity**, v.26, p.11-3, 2018.

HERMAN, N. et al. Urinalysis and determination of the urine protein-to-creatinine ratio reference interval in healthy cows. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.33, p.999-1008, 2019.

HRUBY, A. et al. The epidemiology of obesity: a big picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673-89, 2015.

IBRAHIM, W. H. Effect of Ramadan fasting on markers of oxidative stress and serum biochemical markers of cellular damage in healthy subjects. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 53, p. 3-4, p. 175-81, 2008.

JACOBSEN, B.B. et al. Perfis cardíaco, metabólico e molecular de ratos sedentários no Momento inicial da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 109(5):432-9, 2017.

KURELLA, M.; LO, J. C. & CHERTOW G.M. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. **J Am Soc Nephrol**, v.16, p 2134-40, 2005.

LEVEY, A.S.; CORESH, J. Chronic kidney disease. **The lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165-180, 2012.

LEVIN, A. et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int**, v.3, p. 1–150, 2013.

LI, W. Lycopene ameliorates renal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. **International journal of clinical and experimental pathology**, v.7, n. 8, 2014.

LIAO, M. T. et al. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. **BioMed Research International**, article 691369, 2012.

LIU, P. et al. Influence of thermally oxidized vegetable oils and animal fats on intestinal barrier function and immune variables in young pigs. **Journal of Animal Science**, v.92, p.2971-9, 2014.

LUVIZOTTO, R. A. M. Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose tissue of obese rats. **Human & experimental toxicology**, v.34, n.6, p. 612-9, 2015.

LUVIZOTTO, R. D. A. M. et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 10, p. 1803-9, 2013.

MANGELS AR, et al. Carotenoid content of fruits and vegetables:an evaluation of analytic data. **J Am Diet Assoc**, v. 93, n.3, p. 284-96, 1993.

MARIC-BILKAN, C. Obesity and diabetic kidney disease. **Med Clin North Am**, v. 97, n. 1, p.59–74, 2013.

MECCA, M. S. et al. Ten-week lifestyle changing program reduces several indicators for metabolic syndrome in overweight adults. **Diabetol Metab Syndr**, v.19, p.1-7, 2012.

MESQUITA, C. S. et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Anal Biochem**, v. 458, n.1, p. 69–71, 2014.

MOL, M. et al. Enzymatic and non-enzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: Methodological aspects and biological consequences. **Free Rad Biol Med**, v.111, p.328-44, 2017.

MONTANI, J. P. et al. Ectopic fat storage in heart, blood vessels and kidneys in the pathogenesis of cardiovascular diseases. **Int J ObesRelatMetabDisord**, v. 28, suppl. 4, S4-S58, 2004.

MORENO-FERNÁNDEZ, S. et al. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p.1502, 2018. (doi.org/10.3390/nu10101502)

- MURPHY, M. P. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. **Cell Metab**, v.16, p.145-6, 2013.
- NAKAGAWA, T. et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. American journal of physiology Renal physiology. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 3, p. 625-31, 2006.
- NIELSEN, F. et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clin Chem**, v.43, p.1209-14, 1997.
- OLFERT E. D. CROSS B. M. MCWILLIAMS A. A. (eds.). **Guide to the care and use of experimental animals** . 2 ed. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario, Canada. 1993, 298p.
- OZIEH, M. N. et al. Creating a 13-year National Longitudinal Cohort of veterans with chronic kidney disease. **BMC Nephrology**, v. 20, n. 241, p. 1-6, 2019.
- PALANISAMY, N.; VENKATARAMAN ANURADHA, C. Soy protein prevents renal damage in a fructose-induced model of metabolic syndrome via inhibition of NF-kB in male rats. **Pediatr Nephrol**, v.26, n. 10, p. 1809-21, 2011.
- PALOZZA, P. et al. Effect of Lycopene and Tomato Products on Cholesterol Metabolism. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.61, p.126-34, 2012.
- PIERINE, D. T. et al. Lycopene supplementation reduces TNF- α via RAGE in the kidney of obese rats. **Nutrition & diabetes**, v.4, n.11, e142, 2014.
- RAIMUNDO, M.; LOPES, J.A. Metabolic syndrome , chronic kidney disease , and cardiovascular disease : a dynamic and lifethreatening triad. **Cardiol Res Pract.**, 2011.
- RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutr Res**, v.19, p.305-23, 1999.
- RICHELLE, M. et al. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. **J Nutr**, v.132, p.404-8, 2002.
- RTVELADZE, K. et al. Health and Economic Burden of Obesity in Brazil. **PLoS One**, v.8, n.7, e68785 p. 1-10, 2013.
- SAMARGHANDIAN, S. et al. Protective effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochem Res Int**, 2016. doi.org/10.1155/2016/2645237
- SAVAGE, D. B. et al. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol Rev**, v.87, p.507-20, 2007.
- SCHMIDT, M.I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**. v.377, n. 9781, p. 1949–61. doi:10.1016/S0140-6736(11)60135-9, 2011.

SIES, H.; STAHL, W. Lycopene: Antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. **Exp Biol Med**, v.218, p.121-4, 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activities of carotenoids. *Mol Aspects Med*, v.24, p.345-51, 2003.

SUN, L. et al. Role of sterol regulatory element-binding protein-1 in renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. **J Biol Chemistry**, v.277, p.18919-27, 2002.

TAHERI, Z.; GHAFARI, M.; AMIRI, M. Lycopene and kidney; future potential application. **Journal of Nephro pharmacology**, v.4, n.2, p. 49-51, 2015.

THOMSON, S. C.; VALLON, V.; BLANTZ R,C. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 1, p. 8–15, 2004.

UNGER, R. H.; ORCI, L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. **Int J ObesRelatMetabDisord**, v.24 (suppl 4), S28-32, 2000.

VIGITEL Brasil, 2018: Brasileiros atingem maior índice de obesidade nos últimos treze anos. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: **Ministério da Saúde**.<http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>

VILEIGAS, D. F. **Influência da obesidade induzida por dieta hiperlipídica saturada sobre o comportamento da via beta-adrenérgica miocárdica em ratos Wistar**. 2015. Dissertação (Mestra em Fisiopatologia em Clínica Médica) -Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, 2015.

WICKMAN, C.; KRAMER, H. Obesity and kidney disease: potential mechanisms, **Seminars in Nephrology**, v. 33, n. 1, p. 14–22, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 3-5 June 1997. Geneva: World Health Organization, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Geneva:WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 25 mar.2017.

YANG, W. Ectopic lipid accumulation: potential role in tubular injury and inflammation in diabetic kidney disease. **Clinical Science**, v.132, n. 22, p. 2407-22, 2018.

YEUM, K. J. et al. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. **Nutrition**, v.25, p.839-46, 2009.

YEUM, K. J. et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 4, p. 594-602, 1996.

YIN, Y.; ZHENG, Z.; JIANG, Z. Effects of lycopene on metabolism of glycolipid in type 2 diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.109, p. 2070-77, 2019.

ZENG, Z. et al. Lycopene improves insulin sensitivity through inhibition of STAT3/Srebp-1c-mediated lipid accumulation and inflammation in mice fed a high-fat diet. **ExpClinEndocrinol Diabetes**, v.125, p.610-17, 2017.

ZHANG, X.; LERMAN, L.O. The metabolic syndrome and chronic kidney disease. **Translacional Res**, v.183, p.14-25, 2017.