

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

Damiana Tortolero Pierine

**Influência da suplementação com licopeno sobre estresse
oxidativo e processo inflamatório renal de animais com
sobrecarga nutricional**

BOTUCATU

2014

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

Damiana Tortolero Pierine

**Influência da suplementação com licopeno sobre estresse
oxidativo e processo inflamatório renal de animais com
sobrecarga nutricional**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista –
UNESP, para obtenção do título de Doutora em
Patologia.

Orientadora: Profª Dra Camila Renata Corrêa

Co-orientadora: Dra. Renata de Azevedo Melo Luvizotto

BOTUCATU

2014

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

Pierine, Damiana Tortolero.

Influência da suplementação com licopeno sobre estresse oxidativo e processo inflamatório renal de animais com sobrecarga nutricional / Damiana Tortolero
Pierine. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Camila Renata Corrêa

Coorientador: Renata de Azevedo Melo Luvizotto

Capes: 40105008

1. Rins - Inflamação. 2. Obesidade. 3. Stress oxidativo. 4. Licopeno. 5. Suplementos dietéticos.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo; Inflamação; Licopeno; Obesidade; Rim.

Dedicatória

*Dedico aos meus irmãos Felipe e Ulisses
por tornarem tudo possível.*

Agradecimientos

Agradeço...

Inicialmente à orientadora, Camila Renata Corrêa, por ter me aceitado como aluna mesmo com a minha falta de experiência em pesquisa experimental e por ter guiado todos os meus passos durante o doutorado. Ela me ensinou desde o básico nas técnicas de laboratório até padronizar métodos, me incentivou a fazer estágio no exterior e também me ajudou muito na vida pessoal, foi ela quem me apresentou ao meu atual namorado, Guilherme Biondo.

Às professoras da *TUFTS University*, Kyung-Jin Yeum e Guangwen Tang, por todo o suporte para a elaboração do estágio sanduíche e também por todo o carinho e amizade.

Aos amigos Renato Prado e Igor Minatel, doutorandos da Patologia, pela amizade e carinho com que me receberam quando cheguei no laboratório da *TUFTS University* e também me ajudaram muito no aprendizado e padronização de novas técnicas.

Às alunas de Iniciação Científica Natália Miranda, Paula Presti e Érika Imaizumi pela ajuda no manejo dos animais do biotério.

À coordenação do programa de pós graduação em Patologia Márcia Guimarães da Silva (triênio 2010-2012) e Denise Fecchio (triênio 2013-2015).

À Vania Soler, secretária do programa de pós graduação em Patologia, por ser sempre solícita e atenciosa.

À banca do exame geral de qualificação Denise Rangel da Silva Sartori (Depto Fisiologia, IBB-UNESP) e Luis Cuadrado Martin (Depto Clínica Médica, FMB-UNESP) pelas preciosas sugestões.

À Faculdade de Medicina, ao Programa de pós-graduação em Patologia e à UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) pelo suporte para a realização do doutorado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Doutorado no país e pela bolsa sanduíche (PDEE - Programa de Doutorado com Estágio no Exterior; Processo: BEX: 9847/11-1).

Às Doutoradas Ana Lúcia dos Anjos Ferreira e Renata de Azevedo Melo Luvizotto.

Às amigas do laboratório, Maria Eugênia Navarro (Iniciação Científica), Fabiane Francisqueti (Mestrado) e Sabrina Tfaile (Doutorado) por todo o tempo que passamos juntas no trabalho e no lazer. Vocês foram e continuarão sendo minhas companheiras!

Aos irmãos Felipe e Ulisses, à cunhada e irmã Andréa, ao Pai Devanir e à mãe Evani (*in memorian*). Vocês sempre foram importantes, e foi graças a vocês que eu consegui deixar tudo em Botucatu e ficar um ano em Boston para fazer o estágio. Ulisses e Andréa me deixaram muito tranquila adotando meu gatinho de estimação para que eu pudesse ir em paz.

À minha nova família – Família Biondo – que conheci durante o doutorado. Guilherme, Newton, Sueli (*in memorian*) Eduardo, Aline, Maria Luíza, Paulo e Maria Eduarda, agradeço a vocês por dividirem comigo os momentos bons e também os mais difíceis.

O Doutorado foi um trabalho em equipe e não seria possível sem vocês!

Epígrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King Jr

Resumo

Os mecanismos que relacionam a obesidade aos danos renais são desconhecidos. O rim é um órgão alvo para lesões causadas por AGEs. O receptor de AGEs (RAGE) tem estímulo pró inflamatório e parece desempenhar um papel na patogênese da doença renal. O estudo objetivou verificar o efeito da obesidade sobre o dano renal e o efeito do licopeno sobre essas complicações. Ratos *Wistar* machos foram randomicamente divididos para receberem dieta controle (C, n =7) ou hiperlipídica mais sacarose (DH+S, n =14) por 6 semanas. Após este período, os animais DH+S foram randomizados em 2 grupos: DH+S (n=7) e DH+S suplementado com licopeno (DH+S+L, n=7). Os animais receberam óleo de milho (C e DH+S) ou licopeno (DH+S+L, 10 mg/kg peso/5 vezes por semana) por 6 semanas. Ao final do período urina de 24hs foi coletada, os animais eutanasiados e amostras de sangue e rim foram obtidas para as análises. Foram avaliados parâmetros bioquímicos, hemodinâmico, função renal, marcadores de estresse oxidativo e inflamação. O índice de adiposidade aumentou nos grupos DH+S e DH+S+L (C: $5,8 \pm 1,8$ < DH+S: $9,4 \pm 1,6$ = DH+S+L: $9,7 \pm 1,7$ %; $p < 0,001$). Os animais DH+S e DH+S+L apresentaram resistência insulínica (Glicemia OGTT após 150 min.; C: $117,6 \pm 3,9$ < DH+S: $138,1 \pm 5,1$ = DH+S+L: $137,8 \pm 5,2$ mg/dL; $p = 0,01$), porém, sem alterações em glicemia de jejum, lipidemia, PAS e função renal. As concentrações renais de RAGE e TNF- α aumentaram no grupo DH+S e a suplementação de licopeno restaurou estes níveis aumentados para valores semelhantes ao grupo controle (RAGE - C: $3,1 \pm 0,3$ = DH+S+L: $3,1 \pm 0,3$ < DH+S: $3,6 \pm 0,4$ μ g/g; $p = 0,014$; TNF- α - C: $227,8 \pm 2,7$ = DH+S+L: $227,4 \pm 2,2$ < DH+S: $238,7 \pm 3,0$ μ g/mL; $p = 0,014$). O licopeno foi capaz de diminuir RAGE e TNF- α no rim. Assim, esse carotenóide pode ser benéfico para a prevenção e terapia do estresse oxidativo e inflamação nos rins decorrente da obesidade.

Palavras chave: Licopeno, obesidade, rim, estresse oxidativo, inflamação

Abstract

The mechanisms linking obesity to kidney damage are unknown. The kidney is a target organ lesions caused by AGEs. The receptor of AGEs (RAGE) has proinflammatory stimuli and appears to play a role in the pathogenesis of renal disease. The study aimed to verify the effect of obesity on renal damage and the effect of lycopene on these complications. Male Wistar rats were randomly assigned to receive control diet (C, n = 7) or high fat plus sucrose (HD+S, n = 14) for 6 weeks. After this period, the HD+S animals were randomized into two groups: HD+S (n = 7) and HD+S supplemented with lycopene (HD+S+L, n = 7). The animals received corn oil (C and HD+S+L) and lycopene (HD+S+L, 10 mg/kg/5 times per week) for 6 weeks. At the end of the period 24h urine was collected, the animals euthanized and samples of blood and kidney were obtained for analysis. Biochemical, hemodynamic parameters, renal function, markers of oxidative stress and inflammation were assessed. The adiposity index increased in groups HD+S and HD+S+L (C: 5.8 ± 1.8 < HD+S: 9.4 ± 1.6 = HD+S+L: $9.7 \pm 1.7\%$, $p < 0.001$). The HD+S and HD+S+L animals had insulin resistance (OGTT glucose levels after 150 min, C: 117.6 ± 3.9 < HD+S: 138.1 ± 5.1 = HD+S+L: 137.8 ± 5.2 mg / dL, $p = 0.01$), but no changes in fasting glucose, lipids, SBP and renal function. Renal concentrations of RAGE and TNF- α increased in the HD+S group and lycopene supplementation restored these increased levels similar to the control group (RAGE values - C: 3.1 ± 0.3 = HD+S+L: 3.1 ± 0.3 < HD+S: 3.6 ± 0.4 mg/g, $p = 0.014$; TNF- α - C: 227.8 ± 2.7 = HD+S+L: 227.4 ± 2 , 2 < HD+S: 238.7 ± 3.0 μ g/mL, $p = 0.014$). Lycopene was able to decrease TNF- α RAGE and kidney. Thus, this carotenoid can be beneficial for the prevention and therapy of oxidative stress and inflammation in the kidneys resulting from obesity.

Keywords: Lycopene, obesity, kidney, oxidative stress, inflammation

Sumário

Resumo	
Abstract	
Revisão de literatura	12
Obesidade aspectos gerais e danos renais	13
Estresse oxidativo, inflamatório e ação de antioxidantes na obesidade	15
Licopeno	16
Referências	18
Manuscrito	25
Introdução	27
Métodos	29
Resultados	38
Discussão	43
Referências	47
Manuscrito em inglês	54
Abstract	56
Introduction	57
Methods	59
Results	66
Discussion	68
Conflicts of interest statement	71
Acknowledgements	71
References	72

Revisão de Literatura

Obesidade aspectos gerais e danos renais

Obesidade é definida como um acúmulo excessivo ou anormal de gordura corporal que pode deteriorar a saúde (1). Incide em países desenvolvidos e em desenvolvimento, aumentando progressiva e alarmantemente nas últimas décadas (2). Sua etiologia é multifatorial, sendo a transição nutricional um dos principais fatores ambientais para explicar a condição epidêmica atual desde que o consumo de dietas ricas em gordura e açúcar aumentou drasticamente nos últimos anos (3, 4).

Nas sociedades ocidentais, misturas de nutrientes adipogênicos potentes são consumidas na forma de bebidas açucaradas e alimentos ricos em carboidratos e gorduras. Esses nutrientes estimulam o sistema lipogênico endócrino e/ou providenciam substrato para a formação de lipídeos *de novo*, permitindo que o balanço energético positivo possa ser estocado como triacilglicerol (TG) no tecido adiposo, um processo denominado lipogênese. Em contrapartida, a mobilização da gordura nos adipócitos ocorre por meio da lipólise, um processo de hidrólise do TG dependente da lipase hormônio sensível (HSL). No centro dessa relação – lipogênese e lipólise – encontra-se o hormônio insulina, a qual exerce um potente papel inibitório sobre a HSL, permitindo menores taxas de lipólise e, consequentemente, aumento nos índices de massa adiposa (5). Essa possibilidade de expansão permite reconhecer o tecido adiposo primordialmente como um neutralizador do excesso de substrato circulantes. Entretanto, quando há expansão da massa gordurosa, o adipócito hipertrofiado e hiperativo inicia a produção de adipocitocinas e fatores quimiotáticos para células do sistema imunológico, como por exemplo, a proteína quimio atraente de monócito (MCP-1), que atrai monócitos para o interior do tecido adiposo (6). Assim, ocorre uma interação sinérgica sobre a produção de adipocinas pró-inflamatórias – principalmente fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) – e antagonica sobre a adiponectina; essas substâncias conduzem à resistência à insulina, atenuando a ação lipogênica desse hormônio no adipócito, o que resulta em maiores taxas de lipólise no tecido adiposo (7, 8, 9). A incapacidade de estocar gordura associada à alteração no perfil das citocinas inflamatórias reflete um processo de disfunção do tecido adiposo (10), um reconhecido fator de risco para o desenvolvimento de desordens metabólicas associadas à obesidade.

A doença renal é uma comorbidade preocupante e está associada à alta taxa de mortalidade e complicações cardiovasculares em pessoas obesas (11). Esta doença está ligada à glomerulomegalia, mudanças hemodinâmicas oriundas da hiperinfiltração e aumento da albuminúria, sendo essas anormalidades reversíveis com a perda de peso (12). Correlação

positiva entre o aumento da albumina urinária e peso corporal tem sido mostrada tanto em indivíduos diabéticos como em indivíduos não diabéticos, estando essa alteração diretamente relacionada com o índice de massa corpórea (13-15).

Alguns fatores associados com a obesidade podem potencialmente prejudicar a função renal como excesso de nutrientes dentre eles os triglicerídeos e a glicose que podem contribuir diretamente ao dano renal promovendo a proliferação de células mesangiais e citocinas pró-inflamatórias (16), e também a inflamação decorrente ao aumento de massa adiposa (17-19).

A inflamação está fortemente associada ao estresse oxidativo o qual se origina do desbalanço entre a produção de espécies reativas e os níveis de antioxidantes (20). Em condições normais, existe um equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os antioxidantes; em contraste, quando a produção dessas espécies reativas excede a capacidade antioxidante local, prevalece uma situação de estresse oxidativo (18, 21). Frente a essa situação, ocorre a oxidação de lipídeos (lipoxidação) e glicose (glicação) gerando compostos como malondialdeído, glioxal, acroleína, 4-hidroxi-nonenal (HNE)- produtos da liporepoxidação - e o glioxal e metil glioxal - produtos da glicação. Esses compostos são altamente reativos e se ligam à parte amino dos aminoácidos, resultando em produtos finais de glicação (AGEs) (22). Em abundância na circulação esses produtos podem atingir diversos órgãos, entre eles, o rim, pelo fato de ser o órgão de excreção desses produtos. Essa exposição, dependendo da intensidade e duração, pode ser um importante fator de dano para o tecido renal (23).

Além dos danos que esses produtos causam, existe outro mecanismo que acarreta em prejuízo para o rim, os AGEs podem se ligar a receptores específicos denominados receptores de produtos finais de glicação (RAGE), os quais estão expressos em vários tecidos (24) dentre eles o rim (25). A ação desses produtos acontece à medida que ocorre a união AGEs/RAGE. Essa ligação, inicia a cascata de eventos de transdução de sinais envolvendo quinases, o que culmina na ativação dos fatores $\text{Ikk}\beta/\text{NF}\kappa\text{B}$, elementos transcricionais nucleares envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias (26), além disso, essa ligação estimula a síntese de componentes da matriz do colágeno tipo IV pelas células mesangiais glomerulares, resultando em espessamento da membrana basal e perda da função glomerular (27-29).

Inicialmente, a relação do receptor RAGE com a disfunção renal estava atribuída ao diabético (12), esses pacientes apresentavam aumento na expressão desse receptor nos podócitos. Por outro lado é interessante ressaltar que estudos experimentais com ratos *knokout* para RAGE mostraram melhora na hiperfiltração glomerular apesar de terem aumentado o

peso e os níveis de insulina. Também foram observadas melhoras estruturais e em parâmetros patológicos como diminuição do fator de migração para monócitos-1 (MCP) e superóxidos (30). Isso demonstra que o RAGE também está envolvido com a disfunção renal relacionada à obesidade independente do aumento da glicemia.

Estresse oxidativo, inflamatório e ação de antioxidantes nas complicações da obesidade

Dada a importância do estresse oxidativo na patogênese da obesidade e suas comorbidades, várias estratégias terapêuticas usando antioxidantes têm sido testadas com o objetivo de atenuar a superprodução das espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (31). Diversos estudos epidemiológicos observacionais têm mostrado que as dietas ricas em frutas e vegetais estão correlacionadas à redução dos riscos de aparecimento de doenças crônicas (32, 33). Desta maneira, é provável que nutrientes antioxidantes presentes nesses alimentos possam prevenir danos causados pelas ROS/RNS.

Estudos envolvendo suplementação de antioxidantes para prevenir a ação inflamatória e oxidativa em obesos também têm sido realizados. Hogan e colaboradores (34) examinaram a ação da casca da uva sobre parâmetros de estresse oxidativo e inflamatório em ratos obesos. Os resultados mostraram que a casca da uva melhorou os indicadores de estresse oxidativo e inflamação nos animais obesos quando comparados aos controles (35). Outros antioxidantes também podem interferir no estado inflamatório da obesidade. Uma revisão escrita por Alappat & Awad (36) destacou que a melhora dos estados de obesidade, inflamação e estresse oxidativo pode estar associados ao uso de cúrcuma, uma especiaria utilizada na cozinha oriental. Esse composto possui ação antiinflamatória e antioxidante, desde que é capaz de inibir o fator transcricional κ B (NF κ B) o qual pertence a um grupo de fatores transcricionais para citocinas que é acionado na resposta de estresse (37).

Aldini e colaboradores (22) utilizando carnosina, um aminoácido com propriedade antioxidante em ratos Zucker obesos, verificaram que esse antioxidante foi capaz de reduzir algumas comorbidades como dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção renal avaliada através da creatinina urinária e sérica e morfologia do rim, isso ocorreu através da destruição de espécies carbonil.

Foi observado em outro trabalho em que ratos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com curcumina apresentaram um significativo decréscimo nos níveis de peroxidação de proteína no rim quando comparados aos animais que ingeriram dieta controle (38).

Orsolic e colaboradores (39) estudaram o efeito do própolis e epigallocatequina galato, um componente do chá verde em ratos diabéticos e observaram que esses compostos reduziram os níveis de malondialdeído no rim desses animais.

Sendo assim, diversas estratégias têm sido abordadas para prevenir ou atenuar os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios das comorbidades que envolvem a obesidade.

Licopeno

É um carotenóide sem atividade pró-vitamina A encontrado no tomate e nas frutas vermelhas. O licopeno é considerado um dos melhores antioxidantes dentre os carotenóides devido ao seu grande número de duplas ligações conjugadas. Outro atributo do licopeno se refere à sua alta capacidade em se ligar ao oxigênio *singlet* (uma ROS) (40) sendo melhor do que o α -caroteno (2 vezes) e α -tocoferol (10 vezes) (41). Além do oxigênio *singlet* e radical peroxil (42), tem sido mostrada ocorrer uma forte interação entre o licopeno e outras ROS como o H_2O_2 (43), radical que pode mediar a geração de hidroxil, conhecido como importante ROS indutora de oxidação lipídica e de bases de DNA (44). Sua proteção contra a oxidação de bases de DNA foi recentemente demonstrada em cardiomiócitos de ratos Wistar submetidos à cardiotoxicidade e suplementados com licopeno na forma licopeno-oleoresina (21).

Diversos estudos têm mostrado que a ingestão de tomate e seus produtos estão associados com diminuição no risco em adquirir doenças crônicas como o câncer e doenças cardiovasculares (45, 46). Assim, importante estudo realizado com homens (≤ 70 anos) de 10 países da Europa mostrou associação inversa entre risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) e nível adipocítico de licopeno. Este estudo ainda mostrou que o licopeno foi o único carotenóide a apresentar associação independente para baixo risco de IAM (47). Outros autores identificaram concentração plasmática diminuída de licopeno em pacientes (homens e mulheres com idade média 55 anos) portadores de dislipidemia (≥ 240 mg/dL e de triglicérides ≥ 250 mg/dL) (48).

O efeito da suplementação com licopeno na atenuação de doenças já instaladas também tem sido examinado. Estudo clínico não mostrou efeitos benéficos da suplementação com licopeno sobre marcadores inflamatórios em portadores de obesidade grave (49). Por outro lado, homens (30 a 35 anos) suplementados com licopeno (60 mg/dia/3meses) apresentaram redução significativa nos níveis de LDL plasmático. O estudo também mostrou

que a adição de licopeno à cultura de macrófagos resultou em diminuição de uma co-enzima importante na síntese do colesterol [macrophage 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A (HMGCoA) reductase] (50). A suplementação com licopeno na forma de extrato de tomate (15 mg licopeno/dia/8 semanas) resultou em melhora da pressão sistólica e diastólica e da oxidação da LDL (induzida por CuSO₄) de pacientes (30 a 70 anos) portadores de hipertensão arterial sistêmica grau I (51). Collins et al. (52) mostraram que não houve nenhum efeito sobre o dano do DNA após a suplementação individualizada de carotenóides (15 mg/dia/12 semanas com (caroteno, luteína ou licopeno) em homens e mulheres (25-45 anos) quando comparado ao grupo placebo. No entanto, foi interessante notar uma correlação inversa entre os carotenóides no soro e as pirimidinas oxidadas. Outro estudo utilizando a mesma dose de carotenóides adotada por Collins et al. (53) mas por curto período (1 semana), mostrou significativo aumento no reparo do DNA em mulheres jovens (24-34 anos) após suplementação individualizada de luteína, caroteno e licopeno (54). Homens e mulheres com IMC considerado normal que fizeram uso do Lyco-o-Mato 6% oleoresina (250 mL contém 5-7 mg de licopeno) durante 26 dias apresentaram redução significativa no dano do DNA de linfócitos submetidos ao estresse oxidativo (55).

Recente estudo experimental verificou que o licopeno (nas doses de 10, 30, 60 e 90 mg/kg) administrado a ratos adultos *Sprague Dawley* hiperglicêmicos resultou em efeito dose-dependente com diminuição na concentração de glicose, aumento de insulina, diminuição na peroxidação lipídica e aumento de enzimas antioxidantes (56). Os resultados sugerem que a suplementação com licopeno pode contribuir com atenuação do estresse oxidativo nesse modelo. Ratos adultos *Sprague Dawley* hiperlipidêmicos suplementados com tomate em pó, pasta e ketchup (10 ou 20 mg de licopeno/kg de dieta) mostraram melhora em todos os parâmetros lipídicos. Além disso, este estudo demonstrou que a menor dose de licopeno (10mg/kg dieta) do tomate em pasta atingiu um melhor índice aterogênico e uma significativa elevação da lipoproteína de alta densidade do colesterol (HDL) nesses animais (57). Em modelo de isquemia e reperfusão no coração de ratos adultos Wistar foi observado que o licopeno diminuiu os danos causados pela peroxidação lipídica, aumentou a concentração de enzimas antioxidantes e melhorou parâmetros hemodinâmicos, suprimindo o estresse oxidativo e reduzindo injúria do miocárdio (58). Em camundongos hipercolesterolêmicos foi observado que o suco concentrado do tomate adicionado à dieta (20g de licopeno/100g da dieta) preveniu a aterosclerose, protegendo os lipídeos plasmáticos da oxidação (59).

O envolvimento de licopeno, inflamação e obesidade, recentemente foi abordado por Gouranton e colaboradores (60). Nesse estudo os autores observaram o efeito antiinflamatório do licopeno em adipócitos pela ação inibitória do fator transcricional kappa B na produção de citocinas próinflamatórias. Embora poucos trabalhos tenham abordado esse aspecto na obesidade, estudos avaliando outras doenças também relataram um efeito antiinflamatório do licopeno (61, 62).

Com base nesta revisão observamos que o licopeno tem sido bem empregado na prevenção de doenças e complicações da obesidade e pode ser indicado para atenuar estresse oxidativo e inflamação em doenças metabólicas (20,23-24). Até o momento, não verificamos estudos que investiguem o efeito do licopeno sobre as alterações oxidativas e inflamatórias que ocorrem nos rins em decorrência da obesidade. Assim, são necessárias investigações adicionais que verifiquem a efetividade do licopeno como antioxidante e antiinflamatório no tecido renal do indivíduo obeso.

Referências

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and Overweight. Geneva, 2004. Disponível em: http://whqlibidoc.who.int/trs/WHO_TRS_894.pdf. Acesso em 28 jan. 2010.
2. Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villarreal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. The American journal of the medical sciences. 2007;334(1):23-30. Epub 2007/07/17.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: análise da disponibilidade de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em agosto-2011.
4. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient intakes from food: mean amounts consumed per individual, one day, 2003-2004. 2007b. [Access in 02/02/2011] Available from: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/fsrg>.
5. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. European heart journal. 2008;29(24):2959-71. Epub 2008/09/09.
6. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of clinical investigation. 2003;112(12):1821-30. Epub 2003/12/18.

7. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(3):1023-33. Epub 2006/12/14.
8. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93: S64-S73.
9. Levine TB, Levine AB. *Metabolic syndrome and cardiovascular disease*. 1st ed Philadelphia: PA; 2006.
10. van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(10):2569-78. Epub 2009/09/17.
11. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Annals of internal medicine*. 2006;144(1):21-8. Epub 2006/01/04.
12. Eknoyan G. Obesity and chronic kidney disease. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2011;31(4):397-403. Epub 2011/05/31.
13. Valensi P, Assayag M, Busby M, Paries J, Lormeau B, Attali JR. Microalbuminuria in obese patients with or without hypertension. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1996;20(6):574-9. Epub 1996/06/01.
14. Savage S, Nagel NJ, Estacio RO, Lukken N, Schrier RW. Clinical factors associated with urinary albumin excretion in type II diabetes. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1995;25(6):836-44. Epub 1995/06/01.
15. Kohler KA, McClellan WM, Ziemer DC, Kleinbaum DG, Boring JR. Risk factors for microalbuminuria in black americans with newly diagnosed type 2 diabetes. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2000;36(5):903-13. Epub 2000/10/31.
16. Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2007;2(3):550-62. Epub 2007/08/19.
17. Qian Y, Feldman E, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC, 3rd. From fibrosis to sclerosis: mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2008;57(6):1439-45. Epub 2008/05/31.
18. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(6):1446-54. Epub 2008/05/31.

19. Guarnieri G, Zanetti M, Vinci P, Cattin MR, Pirulli A, Barazzoni R. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2010;20(5 Suppl):S19-23. Epub 2010/09/10.
20. Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, et al. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003;52(10):2570-7. Epub 2003/09/30.
21. Ferreira AL, Salvadori DM, Nascimento MC, Rocha NS, Correa CR, Pereira EJ, et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation research*. 2007;631(1):26-35. Epub 2007/05/15.
22. Aldini G, Orioli M, Rossoni G, Savi F, Braidotti P, Vistoli G, et al. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(6):1339-54. Epub 2010/06/04.
23. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney international*. 1997;51(4):1170-81. Epub 1997/04/01.
24. Vistoli G, Maddis De D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*. 2013. Epub 2013/06/19.
25. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(9):1656-66. Epub 2000/08/31.
26. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation*. 1997;96(7):2262-71. Epub 1997/10/23.
27. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *The American journal of pathology*. 2003;162(4):1123-37. Epub 2003/03/26.
28. Inagi R, Yamamoto Y, Nangaku M, Usuda N, Okamoto H, Kurokawa K, et al. A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by

megsin overexpression in RAGE/iNOS transgenic mice. *Diabetes*. 2006;55(2):356-66. Epub 2006/01/31.

29. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(11):876-86. Epub 2005/09/01.

30. Tomino Y, Hagiwara S, Gohda T. AGE-RAGE interaction and oxidative stress in obesity-related renal dysfunction. *Kidney international*. 2011;80(2):133-5. Epub 2011/07/02.

31. Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. Brief communication: The prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Annals of internal medicine*. 2005;143(2):116-20. Epub 2005/07/20.

32. Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(4):922-8. Epub 2000/09/30.

33. Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, et al. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(21):1577-84. Epub 2004/11/04.

34. Hogan, S.; Canning, C.; Sun, S.; Xiuxiu, S.; Zhou, K. Effects of Grape Pomace Antioxidant Extract on Oxidative Stress and Inflammation in Diet Induced Obese Mice. *J. Agric. Food Chem.* v. 58, p. 11250–11256, 2010

35. Hogan, S.; Canning, C.; Sun, S.; Sun, X.; Kadouh, H.; Zhou, K. Dietary Supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in diet-induced obese mice fed a western high fat diet. *J. Agric. Food Chem.* v 59, p. 3035-41, 2011.

36. Alappat L, Awad AB. Curcumin and obesity: evidence and mechanisms. *Nutrition reviews*. 2010;68(12):729-38. Epub 2010/11/26.

37. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997;46(9):1481-90. Epub 1997/09/01.

38. *J Asian Nat Prod Res*. 2013 Aug;15(8):905-15. doi: 10.1080/10286020.2013.802687. Epub 2013 Jun 19.

Curcumin decreases oxidative stress in mitochondria isolated from liver and kidneys of high-fat diet-induced obese mice.

Martínez-Morúa A, Soto-Urquieta MG, Franco-Robles E, Zúñiga-Trujillo I, Campos-Cervantes A, Pérez-Vázquez V, Ramírez-Emiliano J.

39. Orsolic N, Sirovina D, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Jazvinscak Jembrek M, Kosalec I. Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: Effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG). *Mutation research*. 2013. Epub 2013/07/19.
40. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1989;274(2):532-8. Epub 1989/11/01.
41. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2000;163(6):739-44. Epub 2000/10/07.
42. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*. 2003;24(6):345-51. Epub 2003/10/31.
43. Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(24):25535-43. Epub 2004/04/01.
44. Lu, Y.; Etoh, H.; Watanabe, N.; Ina, K.; Ukai, N.; Oshima, S. A new carotenoid, hydrogen peroxide oxidation products from lycopene. *Biosci Biotech Biochem*.v.59, p. 2153-2155, 1995.
45. Rao AV, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000;19(5):563-9. Epub 2000/10/07.
46. Minorsky PV. Lycopene and human health. *Plant physiology*. 2002;130(3):1077-8. Epub 2002/12/05.
47. Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinaal AF, et al. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *American journal of epidemiology*. 1997;146(8):618-26. Epub 1997/11/05.
48. Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla DS. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 1995;117(1):61-71. Epub 1995/09/01.
49. Markovits N, Ben Amotz A, Levy Y. The effect of tomato-derived lycopene on low carotenoids and enhanced systemic inflammation and oxidation in severe obesity. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2009;11(10):598-601. Epub 2010/01/19.
50. Fuhrman B, Elis A, Aviram M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;233(3):658-62. Epub 1997/04/28.

51. Engelhard YN, Gazer B, Paran E. Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *American heart journal*. 2006;151(1):100. Epub 2005/12/22.
52. Collins AR, Olmedilla B, Southon S, Granado F, Duthie SJ. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 9: 2159-2162, 1998.
53. Collins AR, Olmedilla B, Southon S, Granado F, Duthie SJ. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 9: 2159-2162, 1998.
54. Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, et al. Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(1):163-9. Epub 2006/01/10.
55. Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *The British journal of nutrition*. 2005;93(1):93-9. Epub 2005/02/12.
56. Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozocin induced diabetes mellitus oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 2009; 69: 371-379.
57. Ibrahim HS, Ahmed LA, El-din MM. The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats. *Journal of medicinal food*. 2008;11(3):551-9. Epub 2008/09/20.
58. Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, et al. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006;289(1-2):1-9. Epub 2006/04/08.
59. Suganuma H, Inakuma T. Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1999;63(1):78-82. Epub 1999/03/03.
60. Gouranton E, Thabuis C, Riollot C, Malezet-Desmoulins C, El Yazidi C, Amiot MJ, et al. Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011;22(7):642-8. Epub 2010/10/19.
61. Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, Eduardo-Figueira M, Pinto R, Chaud M, et al. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *The British journal of nutrition*. 2009;102(1):126-33. Epub 2009/02/11.

62. Hung CF, Huang TF, Chen BH, Shieh JM, Wu PH, Wu WB. Lycopene inhibits TNF- α -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *European journal of pharmacology*. 2008;586(1-3):275-82. Epub 2008/04/29.

Manuscrito

O licopeno é capaz de reduzir TNF- α via RAGE em rins de ratos obesos

**Damiana Tortolero Pierine^{1,3}, Maria Eugênia Lopes Navarro¹, Igor Otávio Minatel^{1,3},
Renata Azevedo Melo Luvizotto^{2,3}, André Ferreira Nascimento^{2,3}, Ana Lúcia Anjos
Ferreira², Kyung-Jin Yeum^{3,4}, Camila Renata Corrêa¹**

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Botucatu, SP, Brasil;

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Botucatu, SP, Brasil;

³ *Jean Mayer – Human Nutrition Research Center – United States Department of Agriculture, Tufts University, Boston, MA, USA;*

⁴ *Food and Nutrition Major, Division of Food Bioscience, College of Biomedical and Health Sciences, Konkuk University, Glocal Campus, South Korea.*

Palavras Chave: Licopeno, obesidade, rim, estresse oxidativo, inflamação

Introdução

A obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode prejudicar a saúde, afeta indivíduos de todas as idades, sexo e classe social. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1), no ano de 2011, 1,5 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso; destes, aproximadamente 500 milhões eram obesos. Baseado nessas informações, a obesidade é atualmente reconhecida como um problema de saúde pública e fator de risco para doenças crônicas como resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo II e doenças cardiovascular e renal (2).

A causa fundamental da obesidade é o desequilíbrio entre consumo calórico e gasto energético, os quais podem ser influenciados por fatores genéticos, estilo de vida e mudanças de comportamento alimentar (3).

Diversos fatores podem desencadear a doença renal em pessoas obesas, entre eles, a hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial e o estresse oxidativo (4, 5). Em condições normais, existe um equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os antioxidantes; em contraste, quando a produção dessas espécies reativas excede a capacidade antioxidante local, prevalece uma situação de estresse oxidativo (6, 7). O consumo alimentar excessivo favorece a oxidação de lipídeos (lipoxidação) e glicose (glicação) gerando produtos como malondialdeído (MDA), glioxal, acroleína e 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) que são produtos da lipoperoxidação e o glioxal e metil glioxal como produtos da glicação. Esses compostos são altamente reativos quando se ligam à parte amino dos aminoácidos, resultando em outros produtos sendo os ALEs quando oriundos dos produtos de lipoxidação (ALEs) e AGEs quando oriundos dos produtos de glicação (8).

A literatura relata que os AGEs estão envolvidos em eventos comuns da obesidade, resistência insulínica, diabetes *mellitus* II e inflamação (9-11), e podem ser fatores desencadeantes de lesões renais em obesos (12, 13).

Os AGEs que permanecem na circulação são eliminados principalmente pelos rins (14) e dependendo da intensidade e duração da exposição pode ser um importante fator de dano ao tecido renal (15). Os AGEs contribuem para o dano tecidual por meio da ligação com receptores específicos localizados na membrana celular, o receptor de AGEs (RAGE), um membro da superfamília Ig, os quais são expressos também no rim (16, 17). Quando ocorre a ligação AGEs / RAGE inicia-se uma cascata de eventos envolvendo transdução de quinases que culminam com a ativação de fator de transcrição nuclear kappa β (Ikk β) / fator nuclear kappa B (NF-kB), fatores de transcrição que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias (18) como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator quimioatraente de monócitos (MCP-1/CCL2). Assim, a ligação AGEs / RAGE representa uma das interfaces entre estresse oxidativo e inflamação.

Dada a importância do estresse oxidativo na patogênese de várias doenças, muitas estratégias terapêuticas usando antioxidantes têm sido testadas a fim de atenuar a superprodução de espécies reativas de nitrogênio (ROS) e de oxigênio (RNS) (19).

Licopeno é um potente antioxidante e recentemente foi demonstrado que a suplementação pode contribuir na atenuação de estresse oxidativo em doenças metabólicas (20-23). Além disso, tem sido demonstrado que o licopeno é capaz de inibir a ativação do NF-kB e a produção de TNF- α , sugerindo sua utilidade como terapia para doenças inflamatórias (24). Até o momento, não encontramos trabalhos que investiguem o efeito da suplementação com licopeno sobre os rins, por isso, são necessários estudos que avaliem os efeitos do licopeno sobre o estado próoxidativo e próinflamatório renal que acontece em decorrência da

obesidade. Portanto, o objetivo foi verificar a ação do licopeno sobre indicadores inflamatórios e oxidativos nos rins de ratos obesos.

Métodos

Animais e protocolo experimental

Ratos *Wistar* machos (10 semanas de vida, pesando aproximadamente 350 g), providos pelo biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Botucatu, SP, Brasil), foram inicialmente divididos para receberem dieta comercial padrão (C, n=7) ou dieta hiperlipídica mais sacarose 30% na água de beber (DH+S, n=14), por 6 semanas. A dieta hiperlipídica foi elaborada em nosso laboratório e continha como base a ração comercial moída – NUVILAB CR-1 (Nuvital®; Sogorb Indústria e Comércio Ltda), bolacha *wafer*, leite condensado, óleo de palma, vitaminas e minerais. Os ingredientes foram homogeneizados e peletizados. O consumo energético dos animais foi calculado pelo produto do consumo de ração (gramas) pelo valor energético da ração (dieta padrão: 3,77 kcal; dieta hiperlipídica: 5,25 kcal), e no caso dos animais que consumiram água com sacarose, foi multiplicado o consumo da bebida (ml) pelo valor energético (1,2 kcal). A indução de obesidade por dieta foi usada para mimetizar obesidade por hábitos da dieta ocidental. A composição das dietas é apresentada na Tabela 1. Após 6 semanas com dieta controle (C) e dieta hiperlipídica mais sacarose (DH+S), os ratos DH+S foram randomicamente divididos em 2 grupos: DH+S (n=7) e DH+S suplementado com licopeno (DH+S+L). O licopeno foi homogeneizado com óleo de milho para atingir a concentração de 5 mg/mL. Os animais receberam 10 mg licopeno/kg peso/5 vezes por semana (20, 22) *via* gavagem por 6 semanas (25, 26). Para evitar diferenças na energia fornecida, todos os grupos receberam o mesmo volume de óleo de milho

(aproximadamente 2 mL/kg/5 vezes por semana). Os animais foram mantidos em caixas individuais no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, em ambiente com controle de temperatura (22–26°C) e luminosidade (12 horas claro – 12 horas escuro). O consumo dietético foi mensurado diariamente e o peso corporal avaliado semanalmente. A urina de 24 horas foi coletada com o animal em caixa metabólica uma semana antes da eutanásia. Os animais foram eutanasiados por decaptação sob anestesia (50 mg/kg, injeção intraperitoneal). Plasma e rim foram coletados e estocados a -80°C até as análises. O experimento foi conduzido em acordo com o *Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals* e as dietas seguiram as especificações do *Nutrient Requirements of the Laboratory Rat*. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (protocolo nº. 920-2012).

Tabela 1. Composição Nutricional das dietas

Componentes	Dieta	
	Controle	Hiperlipídica
Proteína (%)	25	21
Carboidrato (%)	58	45*
Gordura (%)	5	29
% Energético de protein	26,5	16,0
% Energético de carboidrato	61,5	34,3*
% Energético de gordura	12,0	49,7
% Energético de gordura saturada	2,1	24,7
% Energético de gordura insaturada	9,9	25,0
Energia (kcal/g)	3,77	5,25
Composição de ácidos graxos (%)		
Palmitico (16 : 0)	14,0	40,6
Stearico (18 : 0)	2,7	6,2
Oleico (18 : 1n-9c)	23,4	36,5
Linoleico (18 : 2n-6)	53,1	11,3
Outros	6,8	5,4
Vitaminas/minerais †	-	Adicionado

* Sacarose na água de beber (300 g/l) não foi incluída.

† Baseado na quantidade de vitaminas/minerais da dieta controle, para cada kg de dieta hipercalórica, os seguintes nutrientes foram adicionados: Ferro, 25,2 mg; Potássio, 104,8 mg; Selênio, 73,1mg; Sulfato de Molibdênio, 150,0mg; vitamina B12, 34,5mg; vitamina B6, 6 mg; biotina, 0,12 mg; vitamina E, 32,6 mg; vitamina D, 61,2mg; vitamina A, 4,6 mg.

Preparação do licopeno

O Licopeno óleo-resina (Lyc-O-Mato 6 % dewaxed; LycoRed Natural Products Industries) foi adicionado ao óleo de milho e estocado a 4°C protegido da luz até o uso como

descrito anteriormente (27). A mistura licopeno e óleo de milho foi agitada por 20 minutos em banho maria a 37°C antes de ser administrado aos animais.

Índice de Adiposidade

O índice de adiposidade (IA) foi calculado pela soma dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, dividida pelo peso corporal e multiplicada por 100 (28).

Taxa de filtração glomerular

Os animais foram mantidos em caixas metabólicas por 24 horas para a coleta de urina. Amostras de urina foram mantidas a -20°C até as análises. Para o cálculo da taxa de filtração glomerular (TFG) foram utilizadas as concentrações plasmáticas e urinárias de creatinina [TFG: creatinina urinária (mg/dL) x fluxo urinário (mL/min.) / creatinina plasmática (mg/dL)].

Concentrações plasmática e renal de licopeno

Alíquotas de 400 µL de plasma ou 100 µL de rim homogeneizado (100 mg/ mL salina 0,85%) foram utilizadas para análise de licopeno como descrito previamente (27). Em suma, as amostras foram extraídas com 3 ml de clorofórmio:metanol (2:1) seguido por 3 ml de Hexano. As amostras foram colocadas em N₂ para a evaporação dos solventes e então ressuspendidas em 80 µL de etanol, deste conteúdo, 25 µL foram injetados no HPLC.

Foi utilizado o método relatado anteriormente (29) com pequenas modificações. Um sistema de HPLC de fase reversa Waters 2695 Alliance system (Waters Co, Milford, MA,

USA), coluna C30 *semibore* para carotenoides (3 μ m, 150 x 3.0 mm, YMC, Wilmington, NC, USA) e detector Waters 2996 *photodiode array* ajustado para 450 nm. A fase móvel consistiu em solvente A [metanol: éter metil-terc-butílico:água (85:12:3, v/v/v), com 1,5 % de acetato de amônia em água] e solvente B [metanol: éter metil-terc-butílico:água (8:90:2, v/v/v), com 1% de acetato de amônia em água]. O fluxo foi de 0,4 mL/min. começando com 100% do solvente A seguido por 21 minutos de gradiente linear para 45% de solvente A e mantido a 45 % por 1 minuto. Foi seguido mais 11 minutos de gradiente linear para 5% de solvente A e mais 4 minutos mantido a 5% de solvente A. Finalmente, por 2 minutos de gradiente linear o fluxo vai para 5% de solvente A e 4 minutos mantidos a 5% de solvente A e 2 minutos de gradiente linear para 100% de solvente A. Então, por 8 minutos o sistema é mantido a 100% de solvente A para voltar às condições iniciais. O licopeno foi quantificado por determinação da área dos picos nos cromatogramas em relação à uma curva padrão com concentrações conhecidas. Os resultados foram ajustados pelo padrão interno equinenona. A recuperação do padrão interno adicionado na amostra foi >90%. Todas as análises foram feitas sob luz vermelha para não haver degradação do licopeno, que é sensível à luz.

Parâmetros bioquímicos

As concentrações plasmáticas de glicose e colesterol total foram analisadas pelo método enzimático colorimétrico utilizando kits (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brasil) e aparelho automatizado (BS-200 Mindray, China) utilizando como amostra o plasma que foi colhido da decaptação dos animais durante a eutanásia.

Teste de tolerância oral à glicose (OGTT)

Para teste de tolerância oral à glicose (OGTT) foi administrada aos animais, com jejum prévio de 6 horas, solução de glicose via gavagem (3 gramas/kg) e coletado sangue capilar da cauda imediatamente antes, aos 30, 60, 90 e 150 minutos após a ingestão de glicose (30, 31). Com o sangue total foram dosadas as concentrações de glicose (glicosímetro Accu-Chek Go Kit, Roche, Brasil) e estimada a área abaixo da curva (AUC) pelo método trapezoidal (32, 33).

Pressão arterial sistólica (PAS)

A pressão arterial sistólica foi aferida por plestimografia de cauda, utilizando-se esfigmomanômetro (electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System®, modelo 709-0610, International Biomedical, Inc, USA), este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira forrada com maravalha. Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. O pulso arterial foi registrado em polígrafo (Gould RS 3200, Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

Marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo

Como marcador inflamatório foi analisado o TNF- α em plasma e rim homogeneizado (130 mg de tecido / mL de PBS) por kit comercial ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis,

MN, USA). Em cada *well* da microplaca foram adicionados 100 μ L de amostra (plasma ou rim) ou padrão (concentrações: 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 μ g/mL).

A concentração do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) foi quantificada em plasma e rim homogeneizado (50 mg de tecido / mL de PBS; após homogeneizado, diluído a 1:200 em PBS) por kit comercial ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Em cada *well* da microplaca foram adicionados 100 μ L de amostra (plasma ou rim) ou padrão (concentrações: 31,2; 62,3; 125; 250; 500; 1000 e 2000 μ g/mL).

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) foram quantificados na urina por kit comercial ELISA (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Em cada *well* da microplaca foram adicionados 100 μ L de urina ou padrão (concentrações: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 μ g/mL).

A 8-Hidroxideoxiguanosina, indicador de dano oxidativo de DNA, foi quantificada por kit comercial ELISA (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Em cada *well* da microplaca foram adicionados 50 μ L de urina ou padrão (concentrações: 0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e μ g/mL).

Todas as dosagens foram feitas de acordo com as orientações pré-determinadas do fabricante. A quantificação foi feita por determinação da absorbância das amostras em relação à absorbância da curva padrão com concentrações conhecidas. Todas as análises foram feitas usando leitor de microplaca (Spectra Max 190; Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

Expressão gênica de RAGE

O RNA total foi extraído do tecido renal usando o reagente TRIzol (Invitrogen, USA). O kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, USA) foi utilizado para a síntese de 20 μ L de DNA complementar a partir de 1.000 μ g de RNA total. A concentração de RAGE mRNA foi determinada por PCR em tempo real (Applied Biosystems,

USA). A análise quantitativa foi feita com kit comercial (TaqMan qPCR; Applied Biosystems, USA) com auxílio de sistema de detecção (StepOne Plus, Applied Biosystems, USA). Os ciclos foram os seguintes: ativação enzimática a 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos, produtos complementares de DNA foram amplificados em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Expressão gênica foi quantificada em relação aos valores do grupo controle após normalizados pelo controle interno (Ciclofilina; Applied Biosystems, USA).

Quantificação de Malonildialdeído (MDA)

Alíquotas de 100 µL de urina foram usadas para análise de MDA como descrito previamente (34). Em suma, foram adicionados à amostra 700 µL de ácido ortofosfórico (1 %), 200 µL de ácido tiobarbitúrico (42 mM) e aquecidos por 60 minutos a 100°C e logo após resfriados em gelo. 200 µL da solução anterior foram transferidos para tubo de 2 mL contendo 200 µL de hidróxido de sódio : metanol (1:12 v/v), vortexado por 10 segundos e centrifugado por 13 minutos a 13.000 g. O sobrenadante foi transferido para um *vial* de vidro de 300 µL e deste volume, injetados 50 µL no HPLC. O HPLC usado foi o Shimadzu LC-10AD (Shimadzu Corporation, Japan), coluna C18 Luna (5 µm, 150 x 4,60 mm, Phenomenex Inc., USA) e detector Shimadzu RF-535 *fluorescence detector* (excitação: 525, emissão 551 nm), fluxo de 0,5 mL/min., com tampão fosfato (KH₂PO₄ 1mM, pH 6,8) como fase móvel isocrática. O MDA foi quantificado por determinação da área dos picos nos cromatogramas em relação a uma curva padrão com concentrações conhecidas.

Capacidade antioxidante total (TAP)

A capacidade antioxidante total foi quantificada comparando a AUC relativa à cinética de oxidação do BODIPY. O método TAP foi aplicado para aferição do estado antioxidante (dos compartimentos lipofílico e hidrofílico) utilizando a fosfatidilcolina (PC) como referência de matriz lipofílica (35). Alíquotas de 100µL de plasma ou 100µL de rim homogenizado (100 mg/mL) foram usados para aferir o TAP. Após adicionar 300µL de PBS, o BODIPY^{581/591} (100µL) foi incorporado (concentração final de 2 µM) vortexando por 10 segundos a baixa velocidade seguida por incubação em banho-maria a 37°C. Após incubação, foi adicionado PBS (50 mM, Ph 7,4) gelado (485 µL) e a solução vortexada por 10 segundos à baixa velocidade. O iniciador de radical, MeO-AMVN (15 µL, concentração final de 2 mM), adicionado na mistura e vortexado usando pequena esfera magnética. A seguir, alíquotas de 200 µL de cada amostra final foram transferidas para microplaca. A oxidabilidade da amostra foi monitorada por meio de produto de oxidação de fluorescência verde do BODIPY^{581/591} (λ_{ex} = 500, λ_{em} = 520 nm, fenda 10 nm) usando um contador (Wallac Vitor 2, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

Análise estatística

O teste *Kolmogorov-Smirnov* foi usado para verificar a normalidade dos dados. Os resultados são mostrados em medida de tendência central (média) e dispersão (erro padrão) e comparação entre os grupos foram calculadas por ANOVA-*one way*. Para a correlação entre as variáveis foi utilizada a correlação de Pearson. O programa utilizado foi o SigmaStat 3.5 para Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) e a significância adotada foi $p < 0,05$.

Resultados

Peso corporal, consumo alimentar e o índice de adiposidade estão representados na Tabela 2. O índice de adiposidade foi maior no grupo DH+S e DH+S+L em relação ao grupo C ($p<0,001$). Não apresentaram diferença entre os grupos as variáveis peso e consumo calórico. O consumo de ração foi maior no grupo controle ($p<0,001$) e o consumo de bebida foi menor no grupo DH+S+L em relação ao DH+S ($p=0,036$).

Tabela 2. Índice de adiposidade, peso, consumo calórico e consumo alimentar (n=21)

Variáveis	Grupos						p†
	C		DH+S		DH+S+L		
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	
Índice de adiposidade (%)	5,8 ^a	0,7	9,4 ^b	0,6	9,7 ^b	0,6	<0,001
Peso inicial (g)	344,0	17,3	345,0	15,7	347,5	11,3	0,986
Peso final (g)	507,5	31,1	568,2	26,8	564,2	22,7	0,235
Consumo de ração (g/dia)	27,3 ^a	1,8	11,8 ^b	0,6	12,6 ^b	0,7	<0,001
Consumo de bebida (mL/dia)	36,3 ^{a,b}	2,6	38,6 ^a	2,0	30,2 ^b	1,7	0,036
Consumo energético (kcal/dia)*	105,8	6,8	109,6	3,8	103,6	3,9	0,695

C: controle; DH+S: dieta hipercalórica mais sacarose; DH+S+L: dieta hipercalórica mais sacarose com suplementação de licopeno. * Consumo energético inclui energia da sacarose na água de beber. † ANOVA *One-Way*. EP: Erro padrão da média; a,b: letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$, ANOVA *One-Way* com *post hoc* Holm-Sidak)

A concentração plasmática de licopeno no tecido renal e no plasma foi detectada apenas no grupo DH+S+L (tabela 3).

Tabela 3. Concentrações plasmática e renal de licopeno (n=21)

Variáveis	Grupos			
	C	DH+S	DH+S+L	
			Média	EP
Licopeno plasmático (ηM)	ND	ND	28,7	6,3
Licopeno renal (ηM/g proteína)	ND	ND	1,49	0,27

C: controle; DH+S: dieta hipercalórica mais sacarose; DH+S+L: dieta hipercalórica mais sacarose com suplementação de licopeno. EP: Erro padrão da média; ND: não detectado.

A tabela 4 mostra os parâmetros bioquímicos, pressão arterial e taxa de filtração glomerular dos animais. Não foi observada diferença significativa nestes parâmetros.

Tabela 4. Parâmetros bioquímico, hemodinâmico e filtração glomerular (n=21)

Variáveis	Grupos						p†
	C		DH+S		DH+S+L		
	Média	EP	Média	EP	Média	E	
Colesterol total (mg/dL)	34,9	3,1	29,6	1,2	34,3	1,3	0,219
Glicemia de jejum (mg/dL)	112,6	2,0	124,6	3,9	117,0	3,9	0,062
Pressão arterial sistólica (mmHg)	125,2	4,1	131,5	6,2	127,1	3,2	0,628
Taxa de filtração glomerular (ml/min)	1,27	0,24	1,02	0,15	1,28	0,14	0,561

C: controle; DH+S: dieta hipercalórica mais sacarose; DH+S+L: dieta hipercalórica mais sacarose com suplementação de licopeno. EP: Erro padrão da média; † ANOVA *One-Way*.

Como indicador de resistência insulínica, o teste de tolerância oral a glicose (OGTT) não mostrou diferença entre os grupos quanto à área sob a curva (AUC), mas os grupos DH+S e DH+S+L apresentaram maiores valores de glicemia ($p=0,010$) em relação ao grupo C após 150 minutos da administração de glicose (figura 1).

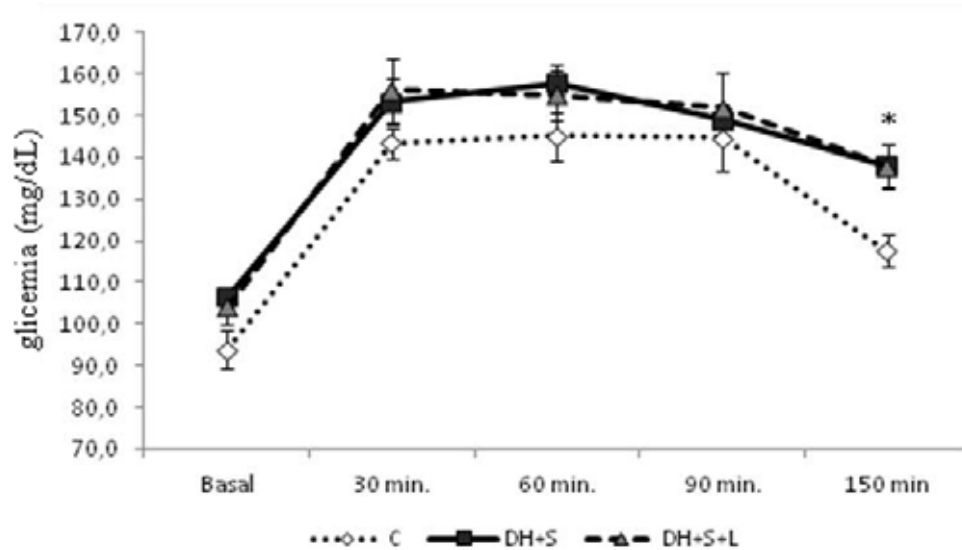


Figura 1. Teste de tolerância oral à glicose (OGTT, n=21)

C: controle; DH+S: dieta hipercalórica mais sacarose; DH+S+L: dieta hipercalórica mais sacarose com suplementação de licopeno. *: Comparação dos grupos DH+S e DH+S+L com o grupo C (ANOVA *One-way* com *post hoc* de Tukey, $p=0,010$). Área sob a curva (AUC): C: $11714,9 \pm 341,2$; DH+S: $12812,4 \pm 221,5$; DH+S+L: $12902,4 \pm 493,6$ mg/dL/150 min. (ANOVA *One-Way*, $p=0,064$).

A tabela 5 representa os marcadores de estresse oxidativo em rins, plasma e urina. Não houve diferença entre os grupos quando comparada a capacidade antioxidante em plasma e rim. Na urina, os níveis de MDA aumentaram nos animais DH+S ($p=0,002$), e os animais DH+S+L apresentaram valores semelhantes aos animais C ($p=0,093$). Enquanto que os níveis de AGEs ($p=0,005$) e 8-OHdG ($p<0,001$) estavam aumentados nos animais DH+S e DH+S+L.

Tabela 5. Marcadores de estresse oxidativo no rim, plasma e urina (n=21)

Variáveis	Grupos						p†
	C		DH+S		DH+S+L		
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	
Rim							
TAP (%/g proteína)	54,6	3,8	59,3	2,4	59,4	3,4	0,243
Plasma							
TAP (%)	40,4	3,1	42,6	4,4	49,3	3,5	0,498
Urina							
MDA (µM)	2,17 ^a	0,67	5,6 ^b	0,55	4,08 ^{a,b}	0,60	0,003
AGEs (µg/mL)	0,21 ^a	0,004	0,24 ^b	0,006	0,24 ^b	0,006	0,005
8-OHdG (ng/mL)	7,91 ^a	0,54	12,24 ^b	0,58	12,92 ^b	0,44	<0,001

C: controle; DH+S: dieta hipercalórica mais sacarose; DH+S+L: com suplementação de licopeno. †ANOVA

One-Way. a,b: letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$, ANOVA *One-Way* com *post hoc* Holm-Sidak)

A figura 2A mostra a relação direta entre o índice de adiposidade e lesão oxidativa de DNA (8-OHdG) e a figura 2B mostra a relação direta entre o índice de adiposidade e o MDA .

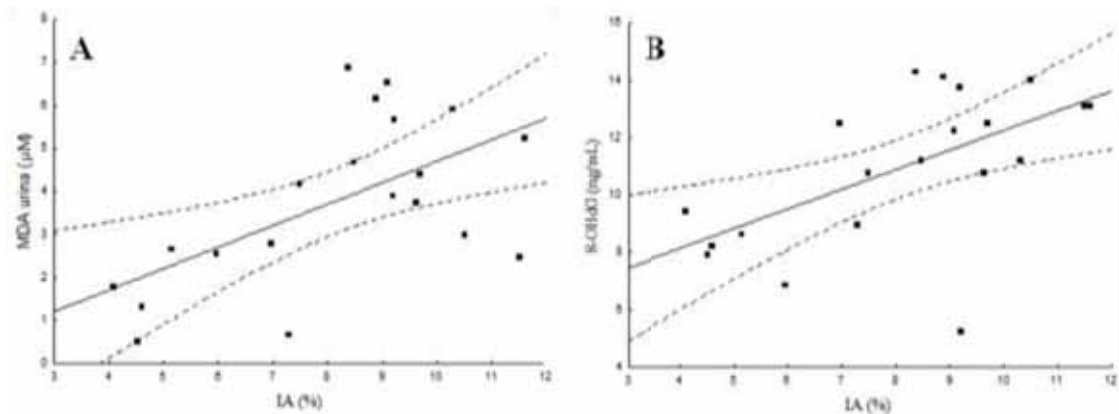


Figura 2. Correlação do Índice de adiposidade (IA) com 8-OHdG e MDA (n=21)

Correlação de Pearson entre IA e 8-OHdG: $r=0,60$, $p=0,005$; IA e MDA: $r=0,59$, $p=0,006$.

O RAGE nos rins aumentou nos ratos DH+S ($p=0,005$) e diminuiu nos ratos DH+S+L (DH+S+L vs DH+S, $p=0,023$; DH+S+L vs C, $p=0,523$), retornando aos níveis do grupo C (Figura 3A). A figura 3B, mostra o mesmo comportamento para o TNF- α no tecido renal. A concentração de RAGE solúvel no plasma não apresentou diferença significativa entre os grupos (figura 3C). Com relação ao TNF- α no plasma, foi observado aumento ($p=0,003$) nos grupos DH+S e DH+S+L (Figura 3D). A análise da expressão gênica do receptor RAGE nos rins não mostrou diferença ($p=0,063$) entre os grupos (figura 3E).

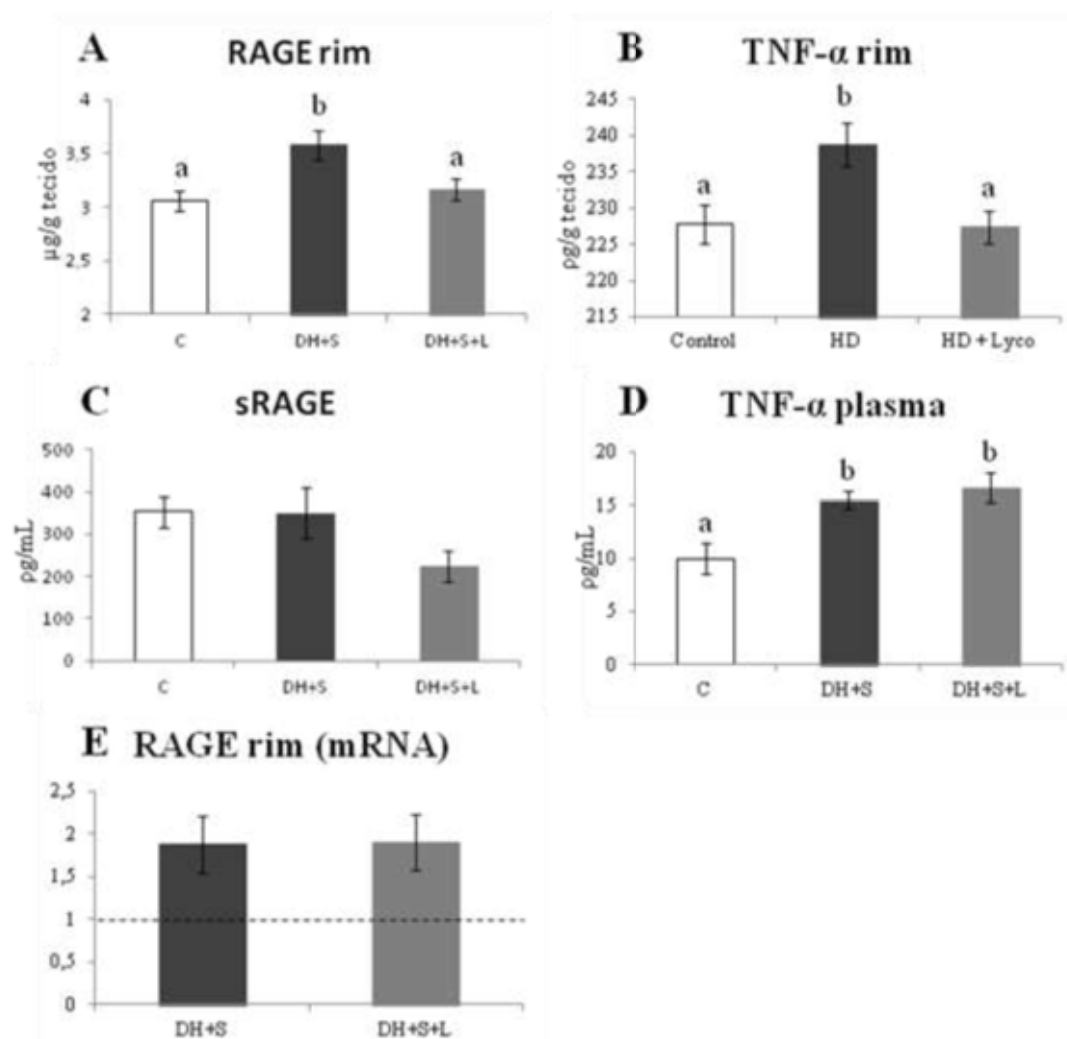


Figura 3. Concentração renal e plasmática de RAGE e TNF- α (n=21)

C: controle; DH+S: dieta hipercalórica; DH+S+L: com suplementação de licopeno. a,b: letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$, ANOVA *One-Way* com *post hoc* Holm-Sidak). Figura 3E (RAGE rim mRNA), unidade expressa em valores relativos ao controle; Linha tracejada: valor do grupo controle (média: 1,00 e erro padrão: 0,13).

Discussão

No presente estudo, a obesidade foi induzida em ratos Wistar com dieta hiperlipídica e sacarose na água de beber com intuito de caracterizar uma sobrecarga energética. Uma das primeiras complicações da obesidade é o aumento da massa adiposa, que traz como consequência complicações metabólicas, inflamação e estresse oxidativo. Essas alterações

refletem na lesão de tecidos, podendo acometer diversos órgãos dentre eles os rins (36, 37). Diversos trabalhos induzem obesidade por dieta, porém não existe ainda homogeneidade no período de manifestação dos parâmetros metabólicos bem como o aumento do índice de adiposidade devido à diversidade da composição e o tempo de exposição a essas dietas (38, 39).

Nossos resultados mostraram que os ratos DH+S tiveram aumento da massa adiposa, porém em um grau que ainda não foi suficiente para acarretar alterações de glicemia, colesterol, hipertensão arterial e função renal, apenas na resistência insulínica, a qual não foi revertida com a intervenção do licopeno. Esses dados estão de acordo com a literatura que mostra que a dieta ocidental, rica em gordura e açúcar, é considerada o fator mais importante para aumento de gordura visceral e desenvolvimento de resistência insulínica (40) e que o licopeno não tem influência sobre esses dois parâmetros (25).

O estresse oxidativo envolve moléculas reativas que são compostas por oxigênio ou oxigênio e hidrogênio (41). Em nosso estudo a sobrecarga energética (DH+S) não teve influência sobre a capacidade total antioxidante tanto no plasma como nos rins, o que pode ser justificado pela ausência de comorbidades. Venturini e colaboradores (42) demonstraram em trabalho clínico que indivíduos com menor capacidade antioxidante são portadores de síndrome metabólica, ou seja, apresentam além da obesidade, aumento de glicemia, triglicerídeos e pressão arterial. Outro trabalho clínico relata que ocorre uma alteração da capacidade antioxidante quando a obesidade está acompanhada de complicações metabólicas (43). Entretanto podemos observar aumento significativo do indicador de lesão oxidativa de DNA, a 8-Hidroxi-deoxi-guanosina (8-OHdG) e MDA na urina dos ratos DH+S. Hofer e colaboradores (44), em humanos, apontam que o IMC está diretamente associado com aumento do risco do dano de DNA devido ao estresse oxidativo. Com relação ao MDA trabalhos relatam que este também está relacionado ao aumento do peso corporal e dieta

hipercalórica (39, 45, 46). Esses trabalhos estão de acordo com nossos dados, pois nossos animais (DH+S) não apresentaram comorbidades, sendo assim, podemos atribuir o aumento desses componentes ao aumento da massa adiposa. Diante da correlação positiva encontrada em nosso trabalho, 8-OHdG e MDA estão diretamente relacionados com aumento de massa adiposa, tornando-se assim, indicador particular do estresse oxidativo na obesidade.

Os mecanismos pelos quais a obesidade predispõe o dano renal ainda são investigados (47-49). A ligação AGEs / RAGE é um fato que pode contribuir para a patogênese da disfunção renal relacionada à obesidade (50). A ligação (AGEs/RAGE) também pode ser promovida pelo estado pró-oxidante desencadeando inflamação através da ativação do fator nuclear kB (NF-kB) e produção de citocinas pró-inflamatórias (51, 52).

Como referido anteriormente, a ligação AGEs / RAGE está associada aos fenômenos oxidativo e inflamatório que resultam em aumento de citocinas (53). No presente estudo foi observado que a dieta hiperlipídica mais sacarose promoveu o aumento de TNF- α e do RAGE no tecido renal. Esse resultado sugere que o presente modelo de indução de obesidade resultou em ativação das vias oxidativa e inflamatória por meio da ligação AGEs / RAGE.

Nosso trabalho mostrou também, que a suplementação com licopeno diminuiu a concentração de RAGE no tecido renal dos ratos DH+S+L, o mesmo comportamento foi observado para o MDA urinário. Com relação ao AGE, também urinário, a suplementação com o carotenóide não interferiu na sua concentração. Deve ser enfatizado que esse metabólito já estava sendo formado desde o momento da instalação da obesidade (13), que ocorreu na sexta semana. Como o estímulo alimentar continuou concomitante à suplementação de licopeno, essas espécies não foram capazes de serem inativadas pelo antioxidante. Ao contrário do MDA que é um produto que pode ser neutralizado por antioxidantes, os AGEs são irreversíveis em decorrência da irreversibilidade da carbonilação (54).

Estes resultados permitem inferir que o licopeno possui ação direta no receptor RAGE o qual faz com que diminua a inflamação bem como nos produtos de lipoperoxidação. Assim, podemos observar efeito antiinflamatório do licopeno nesse órgão, via estresse oxidativo, o que pode ser confirmado devido à presença de licopeno no plasma e nos rins dos ratos tratados.

O receptor RAGE solúvel (sRAGE) é encontrado na circulação, a concentração elevada de sRAGE tem sido associada com doenças inflamatórias crônicas, incluindo aterosclerose e diabetes (55, 56). Nossos dados não mostraram alteração nesse receptor solúvel com a indução da obesidade. Esse fato pode ser justificado devido ao tempo de 12 semanas de estudo, um período em que o grau de obesidade não foi suficiente para causar alterações importantes nos níveis de glicose. Brix e colaboradores (57) apontam que o aumento de RAGE solúvel é mais comum em diabéticos e em casos mais graves de obesidade.

Com relação à inflamação sistêmica, pudemos confirmar pelo aumento plasmático de TNF- α nos ratos obesos e que esses níveis não diminuíram com o tratamento de licopeno. Esse fato pode ter ocorrido devido ao tempo de administração do carotenoide (6 semanas), pois um estudo com ratos diabéticos com tempo similar a nosso, 4 semanas mostraram que suplementação com licopeno também não foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α (58). Além disso, a literatura relata que as dietas ricas em carotenóides resultam em resposta rápida desses componentes no plasma, mas o efeito delas sobre a inflamação é mais demorado, sugerindo acúmulo lento de carotenóides intracelulares (59). Outros pesquisadores também não encontraram diminuição plasmática de TNF- α com administração de licopeno em indivíduos obesos (60, 61). Isso pode ainda ser explicado pelo fato de que os níveis circulantes de TNF- α sejam oriundos de outros órgãos (62-64), também afetados pela

obesidade e que talvez não respondam tão bem ao tratamento do licopeno como os rins, uma vez que esse órgão não é o único a ser comprometido nessa condição (65, 66).

Em suma, foi observado que a dieta hiperlipídica mais sacarose levou à mudança na composição corporal desencadeando a obesidade, resistência insulínica, porém sem alterações bioquímicas e hemodinâmicas e perda de função renal, contudo promoveu aumento sistêmico de peroxidação lipídica, inflamação e lesão oxidativa de DNA, juntamente com inflamação e estresse oxidativo nos rins. O licopeno foi capaz de diminuir MDA, RAGE e também o TNF- α nos rins. Assim, esse carotenóide pode ser benéfico para a prevenção e terapia da toxicidade induzida pelo estresse oxidativo nos rins decorrente da obesidade.

Referências

1. World Health Organization. Obesity and overweight [internet]. Geneva: WHO; 2011 [acesso 9 abr 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009 [internet]. Brasília: IBGE; 2009 [acesso 9 abr 2011]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/
3. Haslam DW, James WP. Obesity. Lancet. 2005;366(9492):1197-209. Epub 2005/10/04.
4. Guarnieri G, Zanetti M, Vinci P, Cattin MR, Pirulli A, Barazzoni R. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation. 2010;20(5 Suppl):S19-23. Epub 2010/09/10.
5. Vaziri ND. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease. Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation. 2010;20(5 Suppl):S35-43. Epub 2010/09/10.
6. Ferreira AL, Salvadori DM, Nascimento MC, Rocha NS, Correa CR, Pereira EJ, et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. Mutation research. 2007;631(1):26-35. Epub 2007/05/15.

7. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(6):1446-54. Epub 2008/05/31.
8. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Medicinal research reviews*. 2007;27(6):817-68. Epub 2006/10/18.
9. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular research*. 1998;37(3):586-600. Epub 1998/07/11.
10. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20. Epub 2001/12/14.
11. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25. Epub 2005/05/28.
12. Uribarri J, Peppia M, Cai W, Goldberg T, Lu M, Baliga S, et al. Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003;42(3):532-8. Epub 2003/09/05.
13. Sebekova K, Faist V, Hofmann T, Schinzel R, Heidland A. Effects of a diet rich in advanced glycation end products in the rat remnant kidney model. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003;41(3 Suppl 1):S48-51. Epub 2003/03/04.
14. Tuohy KM, Hinton DJ, Davies SJ, Crabbe MJ, Gibson GR, Ames JM. Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota--implications for health. *Molecular nutrition & food research*. 2006;50(9):847-57. Epub 2006/05/04.
15. Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes*. 2005;54(8):2314-9. Epub 2005/07/28.
16. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14998-5004. Epub 1992/07/25.
17. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14987-97. Epub 1992/07/25.

18. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997;46(9):1481-90. Epub 1997/09/01.
19. Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. Brief communication: The prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Annals of internal medicine*. 2005;143(2):116-20. Epub 2005/07/20.
20. Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2009;69(3):371-9. Epub 2009/01/17.
21. Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, et al. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006;289(1-2):1-9. Epub 2006/04/08.
22. Ibrahim HS, Ahmed LA, El-din MM. The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats. *Journal of medicinal food*. 2008;11(3):551-9. Epub 2008/09/20.
23. Suganuma H, Inakuma T. Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1999;63(1):78-82. Epub 1999/03/03.
24. Bae JW, Bae JS. Barrier protective effects of lycopene in human endothelial cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2011;60(8):751-8. Epub 2011/04/14.
25. Bahcecioglu IH, Kuzu N, Metin K, Ozercan IH, Ustundag B, Sahin K, et al. Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. *Veterinary medicine international*. 2010;2010. Epub 2010/10/19.
26. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;126(8):1788-96. Epub 2009/06/25.
27. Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: An echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol*. 2007;101(1):16-24.

28. Swartz TD, Duca FA, Covasa M. Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain research*. 2010;1308:79-86. Epub 2009/10/28.
29. Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;64:594-602.
30. Clemmensen C, Smajilovic S, Smith EP, Woods SC, Brauner-Osborne H, Seeley RJ, et al. Oral L-arginine Stimulates GLP-1 Secretion to Improve Glucose Tolerance in Male Mice. *Endocrinology*. 2013. Epub 2013/08/21.
31. Xiao ZQ, Wang YL, Gan SR, Chen JC. Polysaccharides from *Liriope Radix* ameliorates hyperglycemia via various potential mechanisms in diabetic rats. *Journal of the science of food and agriculture*. 2013. Epub 2013/08/14.
32. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes care*. 1994;17(2):152-4. Epub 1994/02/01.
33. de Campos KE, Sinzato YK, Pimenta Wde P, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. *Life sciences*. 2007;81(19-20):1473-8. Epub 2007/10/27.
34. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical chemistry*. 1997;43(7):1209-14. Epub 1997/07/01.
35. Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Analytical biochemistry*. 2006;354(2):290-8. Epub 2006/05/30.
36. Woo MN, Bok SH, Lee MK, Kim HJ, Jeon SM, Do GM, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (S&S PWH) in rats fed high-fat diets. *Journal of medicinal food*. 2008;11(1):169-78. Epub 2008/03/26.
37. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2595-600. Epub 2004/06/08.
38. Picchi MG, Mattos AM, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini Mde A, Portari GV, et al. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2011;26 Suppl 2:25-30. Epub 2011/11/02.

39. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2011;3(1):17. Epub 2011/08/05.
40. Higashida K, Fujimoto E, Higuchi M, Terada S. Effects of alternate-day fasting on high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. *Life sciences*. 2013;93(5-6):208-13. Epub 2013/06/21.
41. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2003;17(1):24-38. Epub 2003/03/05.
42. Venturini D, Simao AN, Sripes NA, Bahls LD, Melo PA, Belinetti FM, et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(12):2361-6. Epub 2012/05/18.
43. Karamouzis I, Pervanidou P, Berardelli R, Iliadis S, Papassotiriou I, Karamouzis M, et al. Enhanced oxidative stress and platelet activation combined with reduced antioxidant capacity in obese prepubertal and adolescent girls with full or partial metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2011;43(9):607-13. Epub 2011/08/09.
44. Hofer T, Karlsson HL, Moller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free radical research*. 2006;40(7):707-14. Epub 2006/09/21.
45. Liu X, Wang F, Li Y, Sun C. [Oxidative stress and the susceptibility to obesity in rats]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*. 2011;40(4):420-2. Epub 2011/08/25.
46. Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(7):1118-23. Epub 2006/08/11.
47. Manson JE, Skerrett PJ, Greenland P, VanItallie TB. The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians. *Archives of internal medicine*. 2004;164(3):249-58. Epub 2004/02/11.
48. Iseki K, Ikemiya Y, Kinjo K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney international*. 2004;65(5):1870-6. Epub 2004/04/17.
49. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Annals of internal medicine*. 2006;144(1):21-8. Epub 2006/01/04.

50. Tomino Y, Hagiwara S, Gohda T. AGE-RAGE interaction and oxidative stress in obesity-related renal dysfunction. *Kidney international*. 2011;80(2):133-5. Epub 2011/07/02.
51. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(3):1395-403. Epub 1995/09/01.
52. Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(19):8807-11. Epub 1994/09/13.
53. Yamamoto Y, Yamamoto H. RAGE-Mediated Inflammation, Type 2 Diabetes, and Diabetic Vascular Complication. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:105. Epub 2013/08/24.
54. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(2):389-406. Epub 2006/06/27.
55. Lindsey JB, de Lemos JA, Cipollone F, Ayers CR, Rohatgi A, Morrow DA, et al. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes care*. 2009;32(7):1218-20. Epub 2009/04/16.
56. Humpert PM, Kopf S, Djuric Z, Wendt T, Morcos M, Nawroth PP, et al. Plasma sRAGE is independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2006;29(5):1111-3. Epub 2006/04/29.
57. Brix JM, Hollerl F, Kopp HP, Schernthaner GH, Schernthaner G. The soluble form of the receptor of advanced glycation endproducts increases after bariatric surgery in morbid obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(11):1412-7. Epub 2012/07/26.
58. Yegin SC, Yur F, Ceylan E. Effect of lycopene application in rats with experimental diabetes using lipoprotein, paraoxonase and cytokines. *The Journal of membrane biology*. 2013;246(8):621-6. Epub 2013/06/20.
59. Watzl B, Bub A, Briviba K, Rechkemmer G. Supplementation of a low-carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men. *Annals of nutrition & metabolism*. 2003;47(6):255-61. Epub 2003/10/02.

60. Markovits N, Ben Amotz A, Levy Y. The effect of tomato-derived lycopene on low carotenoids and enhanced systemic inflammation and oxidation in severe obesity. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2009;11(10):598-601. Epub 2010/01/19.
61. Jacob K, Periago MJ, Bohm V, Berrueto GR. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *The British journal of nutrition*. 2008;99(1):137-46. Epub 2007/07/21.
62. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*. 2011;29:415-45. Epub 2011/01/12.
63. Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonja TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, et al. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(5):932-7. Epub 2008/02/23.
64. Ishimoto T, Lanaspa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, et al. High fat and high sucrose (western) diet induce steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology*. 2013. Epub 2013/07/03.
65. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007;21(12):1443-55. Epub 2007/06/19.
66. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*. 2010;2010. Epub 2010/08/14.

Manuscrito em Inglês

Lycopene supplementation reduces TNF- α via RAGE in kidney of obese rats.

Lycopene reduces TNF- α via RAGE in kidney

Damiana Tortolero Pierine^{1,3}, Maria Eugênia Lopes Navarro¹, Igor Otávio Minatel^{1,3}, Renata Azevedo Melo Luvizotto^{2,3}, André Ferreira Nascimento^{2,3}, Ana Lúcia Anjos Ferreira², Kyung-Jin Yeum^{3,4}, Camila Renata Corrêa¹

¹ Patology Departament, Botucatu Medical School – São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brasil;

² Internal Medicine Departament, Botucatu Medical School – São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brasil;

³ Jean Mayer – Human Nutrition Research Center – United States Department of Agriculture, Tufts University, Boston, MA, USA;

⁴ Food and Nutrition Major, Division of Food Bioscience, College of Biomedical and Health Sciences, Konkuk University, Glocal Campus, South Korea.

Key words: Lycopene, obesity, kidney, oxidative stress, inflammation

Corresponding Author: Camila Renata Corrêa

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Phone: *55 (14) 3880-1618

email: ccorrea@fmb.unesp.br

Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista *Obesity (Silver Spring)*, FI: 3,922.

Abstract

Kidney is a target organ to injuries caused by AGEs. The receptor of AGEs (RAGE) has proinflammatory stimuli and appears to play a role in the pathogenesis of renal disease. The aim was to verify the effect of obesity on renal damage and the effect of lycopene on these complications. Male Wistar rats were randomly assigned to receive a control diet (C, n=7) or a high-fat diet plus sucrose (HD+S, n=14) for 6 weeks. After this period, the HD+S animals were randomized into two groups: HD+S (n=7) and HD+S supplemented with lycopene (HD+S+ L, n=7). The animals received maize oil (C and HD+S) or lycopene (HD+S+L) for a 6-week period. The HD+S and HD+S+L animals had insulin resistance (OGTT glucose after 150 min.; C: 117.6 ± 3.9 < HD+S: 138.1 ± 5.1 = HD+S+L: 137.8 ± 5.2 mg/dL; $p=0.01$) however, no changes in fasting glucose, plasma lipids, blood pressure and renal function. Renal concentrations of RAGE and TNF- α increased in the HD+S group and lycopene supplementation restored to similar to control group values (RAGE: C: 3.1 ± 0.3 = DH+S+L: 3.1 ± 0.3 < DH+S: 3.6 ± 0.4 μ g/g; $p=0.014$; TNF- α : C: 227.8 ± 2.7 = DH+S+L: 227.4 ± 2.2 < DH+S: 238.7 ± 3.0 μ g/mL; $p=0.014$). Lycopene can be beneficial to prevention and treatment of oxidative stress and inflammation in the kidney due to obesity.

Introduction

Obesity is an excessive accumulation of body fat that may impair health, affects individuals of all ages, gender and social class. According to the World Health Organization (WHO) [1], in 2011, 1.5 billion adults were overweight, of these, approximately 500 million were obese. Based on this information, obesity is now recognized as a public health problem and a risk factor for chronic diseases such as insulin resistance, type II diabetes mellitus and cardiovascular and renal diseases [2].

The fundamental cause of obesity is an imbalance between caloric intake and energy expenditure, which may be influenced by genetic factors, lifestyle and changes in eating behavior [3].

Several factors can trigger kidney disease in obese individuals, among them, hyperglycemia, dyslipidemia, hypertension and oxidative stress [4, 5]. Under normal conditions, there is a balance between reactive oxygen and nitrogen species and antioxidants, in contrast, when the production of reactive species exceeds local antioxidant capacity, prevails a situation of oxidative stress [6, 7]. Excessive food intake lead to oxidation of lipid (lipoxidation) and glucose (glycation) generating lipoxidation products (malondialdehyde – MDA; glyoxal; acrolein and 4-hydroxy-nonenal - 4-HNE) and glycation products (glyoxal and methyl glyoxal). These compounds are highly reactive when bind to part of the amino acids resulting in amino glycation products (AGEs) and lipoxidation products (ALEs) [8].

It is described that AGEs are involved in common events in the obesity and insulin resistance, diabetes *mellitus II* and inflammation [9-11] and that may correspond to an important activator of renal injury in obesity [12, 13].

The AGEs remain in circulation are eliminated by the kidney [14] and depending on the intensity and duration of exposure may be an important factor for

kidney damage [15]. AGEs contribute to tissue damage by binding to specific receptors located on the cell membrane receptor of AGEs (RAGE), a member of the Ig superfamily, which are also expressed in the kidney [16, 17]. When the binding occurs AGEs / RAGE triggers a cascade of events involving transduction of kinases that culminate in the activation of nuclear transcription factor kappa β (I κ k β) / nuclear factor kappa B (NF-kB), transcription factors that lead to production of proinflammatory cytokines [18] such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and monocyte chemoattractant factor (MCP-1/CCL2). Thus, the AGE / RAGE binding is one of the interfaces between oxidative stress and inflammation.

Given the importance of oxidative stress in the pathogenesis of several diseases several therapeutic strategies using antioxidants have been tested in order to mitigate overproduction of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) [19].

Lycopene is a potent antioxidant and recently was demonstrated that the supplementation may contribute to attenuation of oxidative stress in metabolic diseases [20-23]. Furthermore, it has been shown that lycopene is able to inhibit NF-kB activation and production of TNF- α , suggesting its utility as a therapy for inflammatory diseases [24]. So far, we found no studies that investigate the effect of supplementation with lycopene on the kidneys. Therefore, studies are needed to assess the effects of lycopene on the pro-oxidative state and renal pro-inflammatory that occurs due to obesity. Therefore, the aim of the study was to investigate the effect of obesity on renal damage and the possible effect of lycopene in ameliorate those complications.

Methods

Animals and experimental protocol

Male Wistar rats (10 weeks old, weighing approximately 350 g), from the Animal Center of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP (Botucatu, SP, Brazil), were initially divided to receive either a commercial chow diet (C, n=7; 12 % energy from fat) or a high-fat diet (49.7 % energy from fat) and 30% of sucrose in the drinking water (300 g/l) (HD+S, n=14), for 6 weeks.

The high-fat diet was designed in our laboratory to contain a powdered commercial chow diet – NUVILAB CR-1 (Nuvital®; Sogorb Indústria e Comércio Ltda), wafer biscuit, condensed milk, palm oil, vitamins and minerals. The ingredients were homogenized and pelletized. The energy intake of the animals was calculated by the product of food intake (grams) and energy content of the diet (standard diet: 3.77 kcal; high-fat diet: 5.25 kcal), and in the case of animals that consumed water with sucrose, was multiplied beverage intake (ml) by the energy value (1.2 kcal). The diet-induced obesity was used to mimic obesity from Western occidental dietary habits. The nutritional composition of the diets is presented in Table 1. After 6 weeks under a high-fat diet plus sucrose, HD+S rats were randomly assigned into two groups: HD+S (n=7) and HD+S supplemented with lycopene (HD+S+L, n=7). Lycopene was mixed with maize oil equivalent to 10 mg lycopene / kg body weight (BW) / 5 days per week [20, 22] and given orally every morning for a 6-week period [25, 26]. To avoid differences in the energy provided, all groups received the same maize oil volume (approximately 2 ml/kg BW per day). Rats were housed in individual cages in Animal Experimental Facility (UNIPLEX) at the Botucatu Medical School, UNESP, under a controlled ambient temperature (22–26°C) and lighting (12 h light–12 h dark cycle) condition. Dietary

consumption was measured daily, and BW was assessed weekly. The 24-hour urine was collected in metabolic cages a week before euthanasia. The animals were killed by decapitation under deep sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, intraperitoneal injection). Plasma and kidney were collected and stored at -80°C until ready for analysis. The experiment was conducted in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and the diets followed the specifications from Nutrient Requirements of the Laboratory Rat. The protocol was approved by the local Ethical Committee for Animal Research of Botucatu Medical School – UNESP (protocol no. 920-2012).

(Table 1)

Lycopene preparation

The lycopene (Lyc-O-Mato 6 % dewaxed; LycoRed Natural Products Industries) was mixed with maize oil and stored at 4°C in the dark until used as described previously [27]. The tomato oleoresin–maize oil mixture was stirred for 20 min in a water-bath at 37°C before being fed to the animals. Each millilitre of the solution contained 5 mg of total lycopene.

Total body fat

The adiposity index (AI: %) was measured as the sum of epididymal, retroperitoneal and visceral fat pads and divides by weight and multiplied by 100 [28].

Glomerular filtration rate

Rats were housed in metabolic cages for 24 h and the urine was collected. To calculate the glomerular filtration rate (GFR) were used creatinine concentrations in plasma and urine [GFR: urine creatinine (mg/dL) x urinary flow (mL/min.) / plasma creatinine (mg/dL)].

Plasma and kidney lycopene analysis

A 400 μ L aliquot of plasma or 100 μ L of kidney homogenate (100 mg of tissue / 1 mL of PBS) was used for lycopene analysis, as described previously [27]. Briefly, samples were extracted with 3 ml chloroform–methanol (2:1) followed by 3 ml hexane. The samples were dried under N₂ and resuspended in 100 μ L ethanol, of which 25 μ L were injected into HPLC.

Previously reported HPLC method [29] was used with slight modification. A reverse phase HPLC system consisting of a Waters 2695 Alliance system (Waters Co., Milford, MA), C30 semibore carotenoid column (3 μ m, 150 x 3.0 mm, YMC, Wilmington, NC) and Waters 2996 photodiode array detector set at 450 nm. The HPLC mobile phase solvent A was MeOH/MBTE/water (85:12:3, v/v/v, with 1.5% of ammonium acetate in the water), and the mobile phase solvent B was MeOH/MBTE/water (8:90:2, v/v/v, with 1% of ammonium acetate in the water). The gradient was set up for 0.4 mL/min begin at 100% solvent A followed by 45% solvent A over a 21 min linear gradient and hold at 45% A for 1 min. This is followed by an 11 min linear gradient to 5% solvent A and 4 min hold at 5% solvent A, finally a 2 min linear gradient back to 100% solvent A. The system is held at 100% solvent A for 8 min for equilibration back to initial conditions. Lycopene was quantified by determining peak areas in the HPLC chromatograms calibrated against known amounts of standards.

The results were adjusted by internal standard containing echinenone. The recovery of the added internal standard was consistently >90 %.

Biochemical parameters

Plasma concentrations of glucose and total cholesterol were analyzed by enzymatic colorimetric method using kits (Bioclin ®, Belo Horizonte, MG, Brazil) and automated apparatus (Mindray BS-200, China).

Oral glucose tolerance test (OGTT)

For oral glucose tolerance test (OGTT) glucose solution was administered by gavage (3 g / kg) to animals with 6 hours of fasting. Capillary blood was collected from the tail immediately before, 30, 60, 90 and 150 minutes after glucose intake [30, 31]. With whole blood were measured concentrations of glucose (Accu-Chek Go glucometer kit, Roche, Brazil) and estimated the area under the curve (AUC) by trapezoidal method [32, 33].

Systolic blood pressure (SBP)

Systolic blood pressure was measured by tail plethysmography, using sphygmomanometer (electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System ®, Model 709-0610, International Biomedical, Inc, USA). To trigger the vasodilatation of caudal artery, rats were previously heated at 40°C for 5 minutes. After heating, the sensor was attached around the tail of the animal. The cuff was inflated to 200 mmHg pressure, and subsequently deflated. The arterial pulse was registered on polygraph (Gould RS 3200, Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

Inflammatory and oxidative stress markers

TNF- α was analyzed as inflammatory marker in plasma and kidney homogenate (130 mg tissue / mL PBS) by commercial ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Aliquots of 100 μ L of sample (plasma or kidney) or standard (concentrations: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 and 800 μ g / mL) were added to each well of the plate.

The concentration of receptor for advanced glycation end products (RAGE) was quantified in plasma and kidney homogenate (50 mg tissue / mL PBS, diluted 1:200 in PBS) for commercial ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Aliquots of 100 μ L of sample (plasma or kidney) or standard (concentrations: 31.2, 62.3, 125, 250, 500, 1000 and 2000 μ g / mL) were added to each well of the plate.

The advanced glycation end products (AGEs) in urine were quantified by commercial ELISA kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Aliquots of 100 μ L of sample (urine) or standard (concentrations: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8 μ g/mL) were added to each well of the plate.

The 8-hydroxydeoxyguanosine, an indicator of oxidative DNA damage, was measured in urine by ELISA commercial kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Aliquots of 100 μ L of urine or standard (concentrations: 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 μ g/mL) were added to each well of the plate.

In all the analysis, after the sample is placed on the plate, we followed the guidelines predetermined by the manufacturer. The quantification was done by determining the absorbance of the samples relative to the absorbance of the standard curve with known concentrations. All analyzes were performed using a microplate reader (Spectra Max 190; Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

RAGE gene expression

Total RNA was extracted from kidney using the reagent TRIzol (Invitrogen). The SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) kit was utilised for the synthesis of 20 µl of complementary DNA from 1000 ng of total RNA. The mRNA levels of RAGE (Applied Biosystems) were determined by real-time PCR. Quantitative measurements were made with a commercial kit (TaqMan qPCR; Applied Biosystems) in a detection system (StepOne Plus; Applied Biosystems). Cycling conditions were as follows: enzyme activation at 50°C for 2 min, denaturation at 95°C for 10 min, complementary DNA products were amplified for forty cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Gene expression was quantified in relation to the values of the control group after normalization by an internal control (cyclophilin; Applied Biosystems).

Malondialdehyde (MDA) analysis

A 100 µL aliquot of urine was used for MDA analysis, as described previously [34]. Briefly, we add 700 µL of 1% orthophosphoric acid and 200 µL of tiobarbituric acid (42 mM) to the sample and then heat it for 60 min. in a water bath at 100 °C and cooled on ice immediately after. Two hundred µL was transferred to a 2 mL tube containing 200 µL of sodium hydroxide : methanol (1:12 v/v). The sample was vortex-mixed for 10 s and centrifuged for 3 min at 13000 g. We transferred 200 µL of the supernatant to a 300 µL glass vial, and injected a 50 µL on to the column. The HPLC system used was Shimadzu LC-10AD (Shimadzu Corporation, Japan), C18 Luna column (5 µm, 150 x 4,60 mm, Phenomenex Inc., USA), Shimadzu RF-535 fluorescence detector (excitation: 525, emission 551 nm), 0,5 mL/min flow of phosphate buffer (KH₂PO₄ 1mM, pH 6,8). The MDA was quantified by area

determination of the peaks in chromatograms relative to a standard curve of known concentrations.

Total antioxidant performance (TAP)

The total antioxidant performance in plasma and kidney was quantified by comparing the AUC on the oxidation kinetics of BODIPY^{581/591} (Invitrogen, California, US). The TAP method was applied to measure the antioxidant status (lipophilic and hydrophilic compartments) using phosphatidylcholine (PC) as reference [35]. Were added aliquots of 100 μ L of plasma or kidney homogenate (100 mg / mL), 300 μ L of PBS and 100 μ L of BODIPY^{581/591} (2 μ M) and the samples incubated in a water bath at 37 °C for 10 minutes. After incubation, was added 485 μ L of ice-cold PBS. Fifteen μ L of the radical initiator MeO-AMVN (2 mM) were added and the mixture vortexed using small magnetic sphere. Then, 200 μ L aliquots of each sample were transferred to the microplate. The oxidizability of the sample was monitored by the oxidation product of BODIPY^{581/591} green fluorescence (excitation: 500; emission: 520 nm) using a counter (Wallac Victor 2, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normality of the data. Results are expressed as means and standard error (SE), and significance was calculated by one-way ANOVA followed by post hoc test. For the correlation between variables, the Pearson correlation was used. The software used was SigmaStat version 3.5 for Windows (Systat Software, Inc.). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Body weight, food intake and adiposity index are shown in Table 2. The adiposity index was higher in HD+S and HD+S+L groups ($p < 0.001$). There was no difference between groups for weight and calorie intake. Chow intake was higher in the C group ($p < 0.001$) and beverage consumption was lower in HD+S+L group compared to HD+S ($p = 0.036$).

(Table 2)

The plasma and kidney concentration of lycopene was detected only in HD+S+L group (Table 3).

(Table 3)

Table 4 shows the biochemical parameters, blood pressure and glomerular filtration rate of animals. No significant difference was observed in these parameters.

(Table 4)

As indicator of insulin resistance, oral glucose tolerance test (OGTT) showed no difference between groups regarding the area under the curve (AUC), however the groups HD+S and HD+S+L showed higher glucose ($p < 0.05$) than C group after 150 minutes of glucose administration (figure 1).

(Figure 1)

Table 5 shows oxidative stress markers in kidney, plasma and urine. There was no difference between groups when compared the antioxidant performance in plasma and kidney. In urine, the levels of MDA increased in HD+S animals ($p=0.002$), and HD+S+L animals showed similar values to the C animals ($p=0.093$). While the levels of AGEs ($p=0.005$) and 8-OHdG ($p<0.001$) were increased in HD+S and HD+S+L groups.

(table 5)

Figure 2A shows a positive correlation between the index of adiposity and oxidative DNA damage (8-OHdG) and Figure 2B shows a positive correlation between AI and MDA.

(figure 2)

Kidney RAGE increased in HD+S rats ($p=0.005$) and decreased in HD+S+L rats (HD+S+L vs. HD+S, $p=0.023$; HD+S+L vs C, $p=0.523$) and returned to control levels (Figure 3A). Figure 3B shows the same pattern as for TNF- α in the kidney. The concentration of soluble RAGE (s-RAGE) in plasma was not significantly different between groups (Figure 3C). The plasma TNF- α increased ($p = 0.003$) in HD+S and HD+S+L groups compared to C group (Figure 3D). The analysis of gene expression of RAGE receptor in kidney showed no difference ($p = 0.063$) between the groups (Figure 3E).

(figure 3)

Discussion

In the present study, obesity was induced in Wistar rats by high-fat diet plus 30% sugar in drink water aiming to characterize energy overload. One of the first changes with obesity is increase in fat mass, which brings as consequence of metabolic disorders, inflammation and oxidative stress. These alterations reflect tissue damage that affect various organs among them kidney [36, 37]. Several studies induce obesity by diet, but there is still no uniformity in the period of manifestation of metabolic parameters as well as increased adiposity index due to the diversity of composition and exposure to these diets [38, 39].

Our results showed that HD+S rats had increased fat mass, but a obesity degree was not enough to cause changes in glucose, cholesterol, blood pressure and renal function, only insulin resistance increased with obesity, which was not reversed by lycopene supplementation. These data are consistent with the literature showing that the Western diet, rich in fat and sugar, is considered the most important increase in visceral fat and the development of insulin resistance [40] and factor that lycopene has no influence on these two parameters [25].

Oxidative stress involves reactive molecules that are composed of oxygen or hydrogen [41]. In our study, the nutritional overload had no effect on total antioxidant performance in both plasma and kidney, which can be justified by absence of comorbidities. Venturini and colleagues [42] demonstrated in clinical work that individuals with lower antioxidant performance are suffering from metabolic syndrome, ie, present in addition to obesity, increased blood sugar, triglycerides and blood pressure. Another clinical study reports change in antioxidant capacity occurs when obesity is accompanied by metabolic complications [43]. However, we observed significant increase in oxidative indicator of DNA damage, 8-hydroxy-deoxy-guanosine

(8-OHdG), and MDA in urine of HF+S rats. Hofer and colleagues [44], in humans, indicate that the BMI is directly associated with increased risk of DNA damage due to oxidative stress. Regarding MDA, papers report that this is also related to increased body weight and hyper-caloric diet [39, 45, 46]. These works are in agreement with our data, because our animals (HD+S) had no comorbidities, so we can attribute the increase of these components to increased fat mass. Given the positive correlation found in our study, 8-OHdG and MDA are directly related to increased fat mass, thus becoming particular indicator of oxidative stress in obesity.

The mechanisms by which obesity predisposes to renal damage are still investigated [47-49]. The AGE/RAGE binding may contribute to the pathogenesis of obesity-related renal impairment [50]. The AGE/RAGE can also be promoted by the pro-oxidant state triggering inflammation through activation of nuclear factor κ B (NF- κ B), and production of proinflammatory cytokines [51, 52].

As noted above, the AGEs/RAGE binding is associated with oxidative and inflammatory phenomena that result in increased cytokine [53]. In this study we observed that the high fat diet plus sucrose promoted the increase of TNF- α and RAGE in renal tissue. This result suggests that this induction model of obesity resulted in activation of inflammatory and oxidative pathways through AGEs/RAGE binding.

Our study also showed that supplementation with lycopene decreased the concentration of RAGE in renal tissue of rats HF+S+L, the same behavior was observed for urinary MDA. Regarding AGE, also urinary, with carotenoid supplementation did not interfere with your concentration. It must be emphasized that this metabolite was being formed since the time of installation of obesity [13], which occurred in the sixth week. As the feed stimulus continued concomitant supplementation of lycopene, these species were not able to be inactivated by antioxidant. Unlike the MDA is a product that

can be neutralized with antioxidants, AGEs are irreversible due to the irreversibility of the carbonylation [54].

These results suggests that lycopene has a direct action on the RAGE receptor which causes decrease inflammation as well as in products of lipid peroxidation. Thus, we observe an anti-inflammatory effect of lycopene in the kidney via oxidative stress, which can be confirmed by the presence of lycopene in plasma and kidneys of the supplemented rat.

The soluble receptor RAGE (sRAGE) is found in the circulation, the high concentration of sRAGE has been associated with chronic inflammatory diseases, including atherosclerosis and diabetes [55, 56]. Our data showed no change in soluble receptor to induced obesity. This can be explained due to the time of 12 weeks of study early time of obesity, which also was not enough to cause changes in glucose levels. Brix and colleagues [57] suggest that the increase in soluble RAGE is more common in diabetics and in more severe cases of obesity.

With regards to systemic inflammation, we confirmed the increase in plasma TNF- α in obese rat and that these levels did not decrease with treatment of lycopene. This may be due to the time of administration of the carotenoid (6 weeks), for a study with diabetic rats with similar time to our, 4 weeks showed that supplementation with lycopene also was not able to reduce the levels of TNF- α [58]. Moreover, the literature reports that diets rich in carotenoids result in rapid response of these components in plasma, but their effect on inflammation is slower, suggesting slow intracellular accumulation of carotenoids [59]. Other researchers also found no decrease in plasma levels of TNF- α with administration of lycopene in obese individuals [60, 61]. This can also be explained by the fact that circulating levels of TNF- α are from other organs [62-

64], also affected by obesity and that might not respond as well to treatment of lycopene as the kidney, since this organ is not the one to be affected in this condition [65, 66].

In summary, it was observed that the high-fat diet plus sucrose led to change in body composition triggering obesity, insulin resistance, but without biochemical, hemodynamic and renal function changes. However, promoted systemic increase in lipid peroxidation, inflammation and oxidative damage to DNA, along with inflammation and oxidative stress in the kidney. Lycopene was able to decrease the MDA, RAGE and TNF- α in kidney. Thus, this carotenoid can be beneficial for the prevention and treatment of toxicity induced by oxidative stress in kidney due to obesity.

Conflicts of interest statement

None of the authors had a personal or financial conflict of interest.

Acknowledgements

We thank LycoRed Natural Products Industries (Beer-Sheva, Israel) for supplying the lycopene. We also thank CAPES for financial support (022/11 and BEX: 9847/11-1). The authors' contributions were as follows: A. L. A. F., K-J. Y. and C. R. C. designed the research; D. T. P., M. E. L. N., I. O. M, R. A. M. L. e A. F. N. conducted the research; D. T. P. analysed the data; D. T. P., I. O. M. e C. R. C. wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript. None of the authors had a personal or financial conflict of interest.

References

- [1] World Health Organization. Obesity and overweight [internet]. Geneva: WHO; 2011 [acesso 9 abr 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>
- [2] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008- 2009 [internet]. Brasília: IBGE; 2009 [acesso 9 abr 2011]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/
- [3] Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005 Oct 1;366(9492):1197-209.
- [4] Guarnieri G, Zanetti M, Vinci P, Cattin MR, Pirulli A, Barazzoni R. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2010 Sep;20(5 Suppl):S19-23.
- [5] Vaziri ND. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2010 Sep;20(5 Suppl):S35-43.
- [6] Ferreira AL, Salvadori DM, Nascimento MC, Rocha NS, Correa CR, Pereira EJ, et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation research*. 2007 Jul 10;631(1):26-35.
- [7] Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1446-54.
- [8] Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Medicinal research reviews*. 2007 Nov;27(6):817-68.
- [9] Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular research*. 1998 Mar;37(3):586-600.
- [10] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
- [11] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.
- [12] Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, Baliga S, et al. Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003 Sep;42(3):532-8.
- [13] Sebekova K, Faist V, Hofmann T, Schinzel R, Heidland A. Effects of a diet rich in advanced glycation end products in the rat remnant kidney model. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003 Mar;41(3 Suppl 1):S48-51.
- [14] Tuohy KM, Hinton DJ, Davies SJ, Crabbe MJ, Gibson GR, Ames JM. Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota--implications for health. *Molecular nutrition & food research*. 2006 Sep;50(9):847-57.
- [15] Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotxin intake. *Diabetes*. 2005 Aug;54(8):2314-9.

- [16] Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1992 Jul 25;267(21):14998-5004.
- [17] Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 1992 Jul 25;267(21):14987-97.
- [18] Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997 Sep;46(9):1481-90.
- [19] Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. Brief communication: The prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Annals of internal medicine*. 2005 Jul 19;143(2):116-20.
- [20] Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2009;69(3):371-9.
- [21] Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, et al. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006 Sep;289(1-2):1-9.
- [22] Ibrahim HS, Ahmed LA, El-din MM. The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats. *Journal of medicinal food*. 2008 Sep;11(3):551-9.
- [23] Sukanuma H, Inakuma T. Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1999 Jan;63(1):78-82.
- [24] Bae JW, Bae JS. Barrier protective effects of lycopene in human endothelial cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2011 Aug;60(8):751-8.
- [25] Bahcecioglu IH, Kuzu N, Metin K, Ozercan IH, Ustundag B, Sahin K, et al. Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. *Veterinary medicine international*. 2010;2010.
- [26] Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010 Apr 15;126(8):1788-96.
- [27] Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: An echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol*. 2007 Jul;101(1):16-24.
- [28] Swartz TD, Duca FA, Covasa M. Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain research*. 2010 Jan 13;1308:79-86.
- [29] Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;64:594-602.
- [30] Clemmensen C, Smajilovic S, Smith EP, Woods SC, Brauner-Osborne H, Seeley RJ, et al. Oral L-arginine Stimulates GLP-1 Secretion to Improve Glucose Tolerance in Male Mice. *Endocrinology*. 2013 Aug 19.

- [31] Xiao ZQ, Wang YL, Gan SR, Chen JC. Polysaccharides from *Liriodendron Radix* ameliorates hyperglycemia via various potential mechanisms in diabetic rats. *Journal of the science of food and agriculture*. 2013 Aug 12.
- [32] Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes care*. 1994 Feb;17(2):152-4.
- [33] de Campos KE, Sinzato YK, Pimenta Wde P, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. *Life sciences*. 2007 Oct 27;81(19-20):1473-8.
- [34] Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical chemistry*. 1997 Jul;43(7):1209-14.
- [35] Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Analytical biochemistry*. 2006 Jul 15;354(2):290-8.
- [36] Woo MN, Bok SH, Lee MK, Kim HJ, Jeon SM, Do GM, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (S&S PWH) in rats fed high-fat diets. *Journal of medicinal food*. 2008 Mar;11(1):169-78.
- [37] Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jun;89(6):2595-600.
- [38] Picchi MG, Mattos AM, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini Mde A, Portari GV, et al. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2011;26 Suppl 2:25-30.
- [39] Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2011;3(1):17.
- [40] Higashida K, Fujimoto E, Higuchi M, Terada S. Effects of alternate-day fasting on high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. *Life sciences*. 2013 Aug 14;93(5-6):208-13.
- [41] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2003;17(1):24-38.
- [42] Venturini D, Simao AN, Sripes NA, Bahls LD, Melo PA, Belinetti FM, et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Dec;20(12):2361-6.
- [43] Karamouzis I, Pervanidou P, Berardelli R, Iliadis S, Papassotiriou I, Karamouzis M, et al. Enhanced oxidative stress and platelet activation combined with reduced antioxidant capacity in obese prepubertal and adolescent girls with full or partial metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2011 Aug;43(9):607-13.
- [44] Hofer T, Karlsson HL, Moller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free radical research*. 2006 Jul;40(7):707-14.
- [45] Liu X, Wang F, Li Y, Sun C. [Oxidative stress and the susceptibility to obesity in rats]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*. 2011 Jul;40(4):420-2.
- [46] Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Jul;14(7):1118-23.

- [47] Manson JE, Skerrett PJ, Greenland P, VanItallie TB. The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians. *Archives of internal medicine*. 2004 Feb 9;164(3):249-58.
- [48] Iseki K, Ikemiya Y, Kinjo K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney international*. 2004 May;65(5):1870-6.
- [49] Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Annals of internal medicine*. 2006 Jan 3;144(1):21-8.
- [50] Tomino Y, Hagiwara S, Gohda T. AGE-RAGE interaction and oxidative stress in obesity-related renal dysfunction. *Kidney international*. 2011 Jul;80(2):133-5.
- [51] Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 1995 Sep;96(3):1395-403.
- [52] Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Sep 13;91(19):8807-11.
- [53] Yamamoto Y, Yamamoto H. RAGE-Mediated Inflammation, Type 2 Diabetes, and Diabetic Vascular Complication. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:105.
- [54] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006 Apr-Jun;10(2):389-406.
- [55] Lindsey JB, de Lemos JA, Cipollone F, Ayers CR, Rohatgi A, Morrow DA, et al. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes care*. 2009 Jul;32(7):1218-20.
- [56] Humpert PM, Kopf S, Djuric Z, Wendt T, Morcos M, Nawroth PP, et al. Plasma sRAGE is independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2006 May;29(5):1111-3.
- [57] Brix JM, Hollerl F, Kopp HP, Schernthaner GH, Schernthaner G. The soluble form of the receptor of advanced glycation endproducts increases after bariatric surgery in morbid obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Nov;36(11):1412-7.
- [58] Yegin SC, Yur F, Ceylan E. Effect of lycopene application in rats with experimental diabetes using lipoprotein, paraoxonase and cytokines. *The Journal of membrane biology*. 2013 Aug;246(8):621-6.
- [59] Watzl B, Bub A, Briviba K, Rechkemmer G. Supplementation of a low-carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men. *Annals of nutrition & metabolism*. 2003;47(6):255-61.
- [60] Markovits N, Ben Amotz A, Levy Y. The effect of tomato-derived lycopene on low carotenoids and enhanced systemic inflammation and oxidation in severe obesity. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2009 Oct;11(10):598-601.
- [61] Jacob K, Periago MJ, Bohm V, Berrueto GR. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *The British journal of nutrition*. 2008 Jan;99(1):137-46.
- [62] Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*. 2011;29:415-45.

- [63] Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonja TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, et al. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 May;16(5):932-7.
- [64] Ishimoto T, Lanaspa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, et al. High fat and high sucrose (western) diet induce steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology*. 2013 Jun 28.
- [65] Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007 Jun 15;21(12):1443-55.
- [66] Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.

Table 1. Nutritional composition of the diets

Components	Diet	
	Control	Hyperlipidic
Protein (%)	25	21
Carbohydrate (%)	58	45*
Fat (%)	5	29
% Energy from protein	26.5	16.0
% Energy from carbohydrate	61.5	34.3*
% Energy from fat	12.0	49.7
% Energy from saturated fat	2.1	24.7
% Energy from unsaturated fat	9.9	25.0
Energy (kcal/g)	3.77	5.25*
Fatty acid composition (%)		
Palmitic (16 : 0)	14.0	40.6
Stearic (18 : 0)	2.7	6.2
Oleic (18 : 1 <i>n</i> -9c)	23.4	36.5
Linoleic (18 : 2 <i>n</i> -6)	53.1	11.3
Others	6.8	5.4
Vitamin/mineral mixture†	-	Added

* Sucrose in the drinking water (300 g/l) was not included.

† Based on the vitamin/mineral amounts of the chow diet, for each kg of the high-fat diet, the following nutrients were added: Fe, 25.2 mg; K, 104.8 mg; Se, 73.1mg; molybdenum sulphate, 150.0mg; vitamin B12, 34.5mg; vitamin B6, 6 mg; biotin, 0.12 mg; vitamin E, 32.6 mg; vitamin D, 61.2mg; vitamin A, 4.6 mg.

Table 2. Adiposity index (AI), body weight (BW) and chow intake (n=21)

Variáveis	Groups						p†
	C		HD+S		HD+S+L		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Adiposity index (%)	5.8 ^a	0.7	9.4 ^b	0.6	9.7 ^b	0.6	<0.001
Inicial BW (g)	344.0	17.3	345.0	15.7	347.5	11.3	0.986
Final BW (g)	507.5	31.1	568.2	26.8	564.2	22.7	0.235
Chow intake (g/day)	27.3 ^a	1.8	11.8 ^b	0.6	12.6 ^b	0.7	<0.001
Drink intake (mL/day)	36.3 ^{a,b}	2.6	38.6 ^a	2.0	30.2 ^b	1.7	0.036
Energy intake (kcal/day)*	105.8	6.8	109.6	3.8	103.6	3.9	0.695

C, control; HD+S, animals subjected to diet-induced obesity; HD+S+L, HD+S supplemented with lycopene. a,b: mean values with unlike superscript letters were significantly different ($P<0.05$); † One-Way ANOVA with Holm-Sidak post hoc test). * Energy intake includes energy from sugar in the drinking water. SE: Standard error.

Table 3. Plasma and kidney concentrations of lycopene (n=21)

	Groups			Mean	SE
	C	HD+S	HD+S+L		
Variables					
Plasma Lycopene (nM)	ND	ND	28.7	6.3	
Kidney lycopene (nM/g protein)	ND	ND	1.49	0.27	

C, control; HD+S, animals subjected to diet-induced obesity; HD+S+L, HD+S supplemented with lycopene. SE: Standard error. ND: not detected.

Table 4. Biochemical, hemodynamic and glomerular filtration rate parameters (n=21)

Variables	Groups						p†
	C		HD+S		HD+S+L		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Total cholesterol (mg/dL)	34.9	3.1	29.6	1.2	34.3	1.3	0.219
Fasting glucose (mg/dL)	112.6	2.0	124.6	3.9	117.0	3.9	0.062
Systolic blood pressure (mmHg)	125.2	4.1	131.5	6.2	127.1	3.2	0.628
Glomerular filtration rate (ml/min)	1.27	0.24	1.02	0.15	1.28	0.14	0.561

C, control; HD, animals subjected to diet-induced obesity; HD+L, HD supplemented with lycopene. †: One-Way

ANOVA.

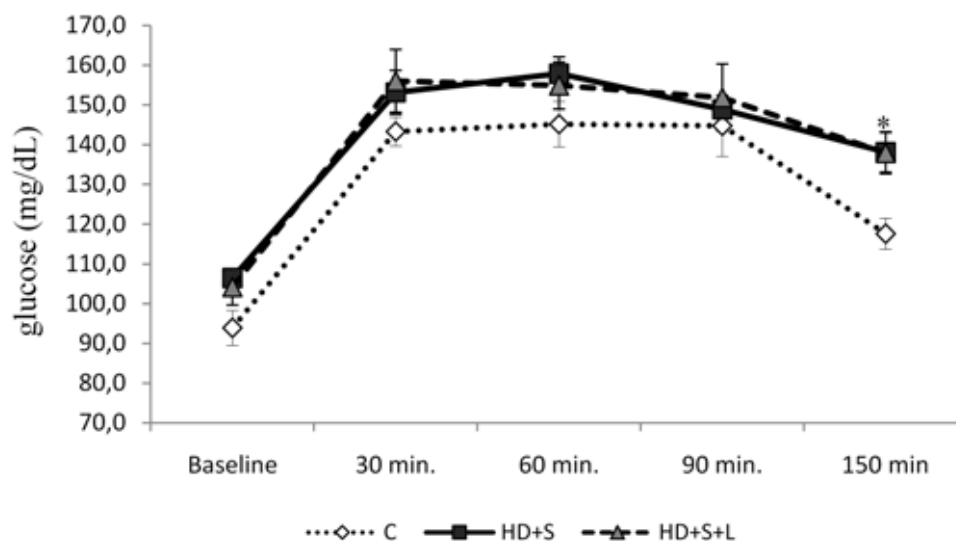


Figura 1. Oral glucose tolerance test (OGTT, n=21)

C, control; HD, animals subjected to diet-induced obesity; HD+L, HD supplemented with lycopene. *: Comparison of HD+S and HD+S+L groups with the C group, One-Way ANOVA with Holm-Sidak post hoc test, $p=0,010$. Area under curve (AUC): C: 11714.9 ± 341.2 ; DH+S: 12812.4 ± 221.5 ; DH+S+L: 12902.4 ± 493.6 mg/dL/150 min. (One-Way ANOVA, $p=0.064$).

Table 5. Oxidative stress markers in kidney, plasma and urine (n=7) (n=21)

Variables	Groups						p†
	C		HD+S		HD+S+L		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Kidney							
TAP (%/g protein)	54.6	3.8	59.3	2.4	59.4	3.4	0.243
Plasma							
TAP (%)	40.4	3.1	42.6	4.4	49.3	3.5	0.498
Urine							
MDA (μM)	2.17 ^a	0.67	5.6 ^b	0.55	4.08 ^{a,b}	0.60	0.003
AGEs (μg/mL)	0.21 ^a	0.004	0.24 ^b	0.006	0.24 ^b	0.006	0.005
8-OHdG (ng/mL)	7.91 ^a	0.54	12.24 ^b	0.58	12.92 ^b	0.44	<0.001

C, control; HD+S, animals subjected to diet-induced obesity; HD+S+L, HD+S supplemented with lycopene. a,b Mean values with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05); † One-Way ANOVA with Holm-Sidak post hoc test).

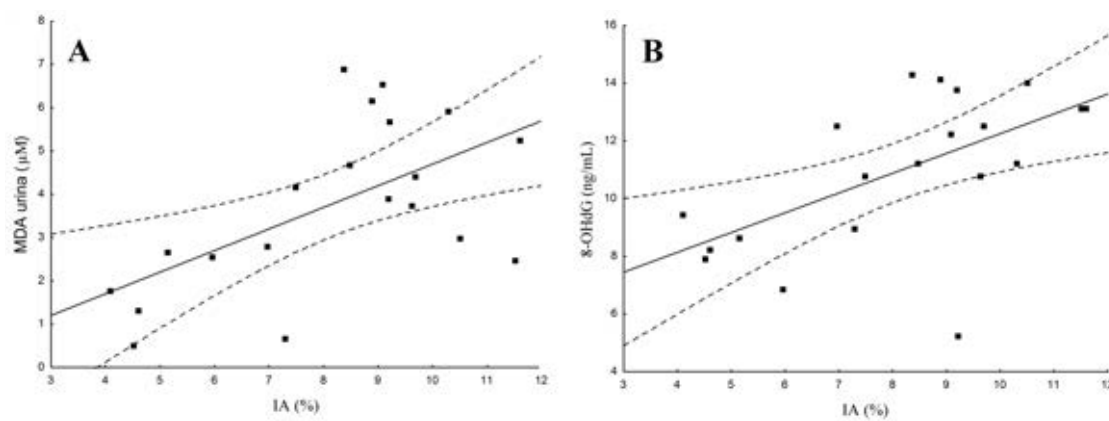


Figure 2. Correlation of adiposity index (AI) with 8-OHdG and MDA (n = 21)

Pearson's correlation between AI and 8-OHdG: $r=0,60$, $p=0,005$; AI and MDA: $r=0,59$, $p=0,006$.

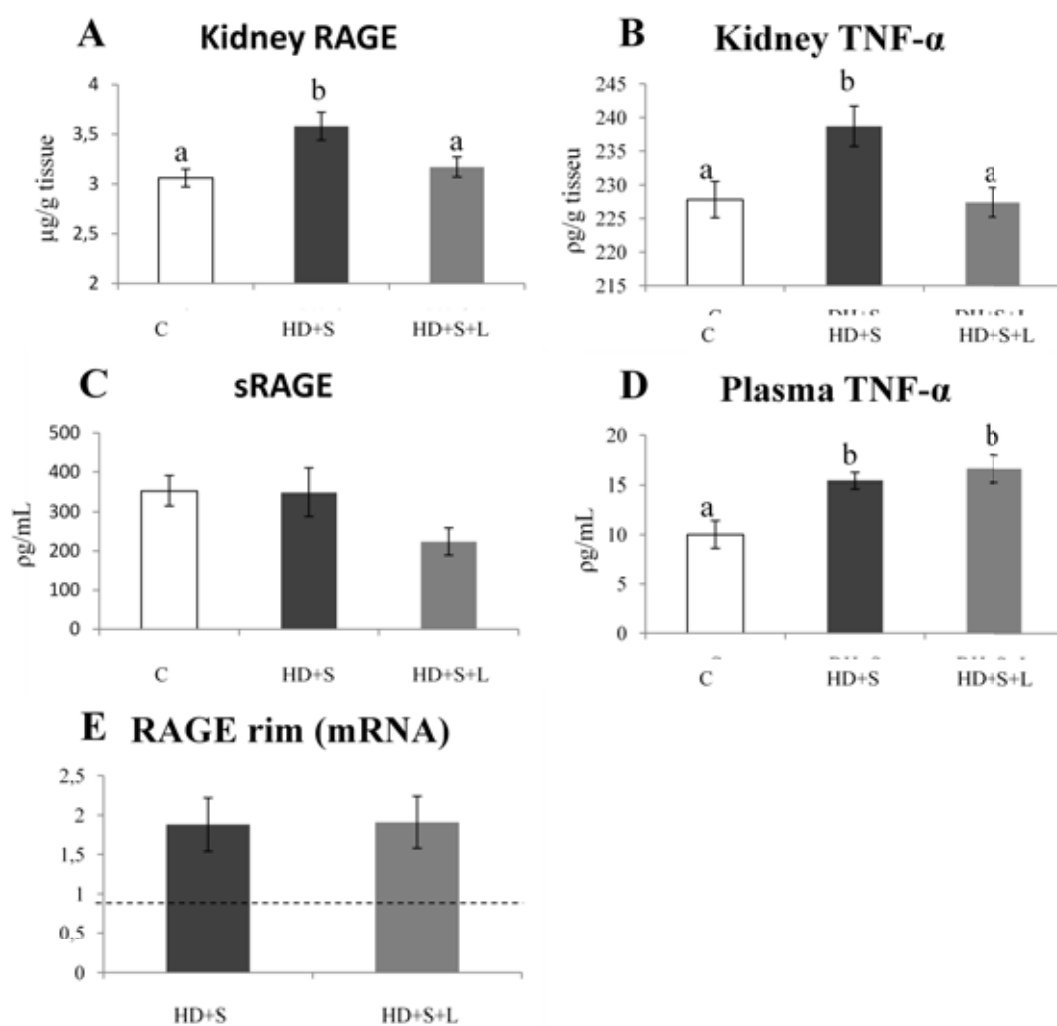


Figure 3. Renal and plasma concentrations of RAGE and TNF-α (n=21)

C, control; HD+S, animals subjected to diet-induced obesity; HD+S+L, HD+S supplemented with lycopene. a,b Mean values with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$); one-way ANOVA with Holm-Sidak post hoc test). Figure 3E (Kidney mRNA RAGE) dashed line: control group value (mean: 1.00 and standard error: 0.13)