

Inflamação renal, alterações metabólicas e oxidativas após 6 semanas de dieta de cafeteria em ratos

Renal inflammatory and oxidative and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats

Autores

Maria Eugênia Lopes Navarro¹

Klinsmann Carolo dos Santos¹

André Ferreira do Nascimento²

Fabiane Valentini Francisqueti¹

Igor Otávio Minatel¹

Damiana Tortolero Pierine¹

Renata Azevedo de Melo Luvizotto²

Ana Lúcia A. Ferreira¹

Dijon Henrique Salomé de Campos¹

Camila Renata Corrêa¹

¹ Universidade Estadual Paulista.

² Universidade Federal de Mato Grosso.

Data de submissão: 01/12/2014.

Data de aprovação: 27/10/2015.

Correspondência para:

Camila Renata Corrêa.
Universidade Estadual Paulista.
Av. Prof. Montenegro, s/nº, Botucatu, SP, Brasil. CEP: 18618970.
E-mail: ccorrea@fmb.unesp.br

DOI: 10.5935/0101-2800.20160003

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença em que a inflamação está inteiramente envolvida e pode causar insuficiência renal. **Objetivo:** Avaliar a influência da exposição a curto prazo de uma dieta de cafeteria sobre a inflamação no tecido renal e a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) no plasma de rato. **Métodos:** Ratos Wistar machos (10 semanas de idade, pesando 350 g) foram designados para receber dieta de ração comercial (C; n = 8 animais/grupo, 5% de energia a partir de gordura) ou dieta de cafeteria (CAF-D, n = 8 animais/grupo: 29% de energia de gordura) e de sacarose em água (300 g/L) de beber durante 6 semanas. **Resultados:** Índice de adiposidade em seis semanas foi maior no grupo CAF-D em comparação com C. O mesmo comportamento foi observado para os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, leptina, insulina e AGEs. A expressão do gene de IL-6 e TNF- α em tecido renal foi maior no grupo D-CAF e nenhuma diferença significativa no tecido adiposo. Não houve aumento destas citocinas no plasma ou rim. Houve uma diminuição significativa de adiponectina no grupo CAF-D. **Conclusão:** A exposição a curto prazo da CAF-D reflete alterações no metabolismo, aumento dos níveis plasmáticos de AGEs, o que pode refletir o aumento expressão de citocinas inflamatórias no rim.

Palavras-chave: estresse oxidativo; inflamação; obesidade.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a disease in which inflammation is directly involved and can lead to impaired renal function. **Objective:** To evaluate the influence of short term exposure to cafeteria diet on kidney tissue inflammation and advanced glycation end products (AGEs) in the rat plasma. **Methods:** Male Wistar rats (10 weeks of age, weighing 350 g) were assigned to receive commercial chow diet (C; n = 8 animals/group, 5% of energy from fat) or cafeteria diet (CAF-D, n = 8 animals/group: 29 energy% fat) and sucrose in drinking water (300 g/L) for 6 weeks. **Results:** adiposity index at six weeks was higher in CAF-D group compared to C. The same behavior was observed for plasma levels of glucose, triglycerides, leptin, insulin and AGEs. The gene expression of IL-6 and TNF- α in renal tissue was higher in CAF-D group and no significant difference in adipose tissue. There was no increase of these cytokines in plasma and kidney or histologically. There was a significant decrease of adiponectin in the CAF-D group. **Conclusion:** The short exposure CAF-D reflects changes in metabolism, increased plasma levels of AGEs, which may reflect the increased expression of inflammatory cytokines in the kidney.

Keywords: inflammation; obesity; oxidative stress.

INTRODUÇÃO

Obesidade é uma condição associada à inflamação e ao estresse oxidativo, que ocorrem quando uma alta ingestão de gorduras e açúcares são oxidados, produzindo substâncias tóxicas, tais como produtos finais de glicação

avançada (AGEs).¹⁻³ Quando o consumo se torna crônico, há um desequilíbrio no sistema redox, que causa a geração destas espécies, as quais estão associadas com disfunções metabólicas e danos inflamatórios em diversos órgãos.^{4,5} Os AGEs podem agir de várias formas,

entre as quais, por se ligar ao receptor RAGE (o receptor para a glicação avançada de produtos finais), iniciando uma cascata de acontecimentos que envolvem cinases de transdução de sinal. Esta associação culmina na ativação de fatores Ikk β /NF κ B - elementos de transcrição nuclear envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias.⁶ Uma vez que estes receptores estão presentes em vários órgãos, incluindo os rins, esta pode ser uma forma de indivíduos obesos desenvolverem insuficiência renal.⁷

Estudos em animais diabéticos e obesos mostraram que os AGEs são compostos que podem causar doença renal.⁷⁻⁹ No entanto, a literatura não mostra se um curto período de ingestão de açúcar e gordura seria capaz de aumentar a formação de AGEs - que causam as alterações metabólicas e inflamação no tecido renal. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do curto período de exposição à dieta de uma lanchonete na inflamação do tecido renal, bem como de produtos AGEs no plasma de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratos Wistar machos (10 semanas de idade, pesando cerca de 350g), do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista de Botucatu, UNESP (Botucatu, SP, Brasil), foram inicialmente divididos para receber uma dieta de controle padrão (5% energia de gordura e água (C, n = 8 animais/grupo) ou dieta de lanchonete (29% de energia de gordura) e açúcar na água potável (300 g/l) (CAF-D, n = 8 animais/grupo) durante 6 semanas. A dieta de lanchonete foi desenvolvida em nosso laboratório para conter uma dieta de ração comercial em pó - NUVILAB CR-1 (Nu vital Q5), além de alimentos processados como biscoito wafer, leite condensado e óleo de palmeira, vitaminas e minerais. A composição nutricional da dieta está apresentada na Tabela 1.

Os ratos foram alojados em gaiolas individuais em um biotério no Laboratório Experimental de Medicina Interna, Botucatu Faculdade de Medicina da UNESP, sob uma temperatura ambiente (22-26°C) e iluminação (ciclos com 12h de luz-12h no escuro) controladas. Os animais foram sacrificados por decapitação após jejum de 12 horas e anestesia com pentobarbital de sódio Q4 (50 mg/kg, intraperitoneal). O experimento foi conduzido em conformidade com as Diretrizes para o Cuidado e Uso Experimental de Animais. As dietas seguiram as especificações das

TABELA 1 COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS DAS DIETAS DE CONTROLE E DE LANCHONETE

	Dieta	Lanchonete
Componentes	Controle	Dieta
Proteínas (%)	25,0	21,0
Carboidratos (%)	58,0	45,0
Gordura (%)	5,0	29,0
% Energia a partir de proteína	26,5	16,0
% Energia a partir de carboidratos	61,5	34,3*
% Energia a partir de gordura	12,0	49,7
% Energia a partir de gordura saturada	2,1	24,7
% Energia a partir de gordura insaturada	9,9	25,0
Energia (kcal/g)	3,8	5,3
Energia (KJ/g)	15,8	22,0
Outros	6,8	5,4
Mistura vitaminas/minerais [†]	-	acrescentar

* A energia do açúcar na água potável (300 g/l) não foi incluída. [†] Com base nas quantidades de vitaminas/minerais da dieta de ração, para cada kg da DAG, foram adicionados os seguintes nutrientes: Fe, 25,2 mg; K, 104,8 mg; Se, 73,1 ug; sulfato de molibdênio, 150,0 mg; vitamina B12, 34,5 ug; vitamina B6, 6 mg; biotina, 0,12 mg; vitamina E, UI 48,9; vitamina D, 2447,0 UI; vitamina A, 15.921,2 UI.

exigências e necessidades de nutrientes para ratos de laboratório. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética local para Pesquisa com Animais (protocolo nº PE-47/2011).

ÍNDICE DE ADIPOSIDADE

O índice de adiposidade (IA) foi utilizado como um indicador da obesidade, porque permite a avaliação exata das percentagens de gordura corporal. Depósitos de gordura epididimais, retroperitoneais, e viscerais foram dissecados dos ratos. A soma dos depósitos de gordura, normalizada pelo peso corporal [(epididimal + retroperitoneal + visceral)/ peso corporal] x 100, foi calculada para se obter o índice de adiposidade.¹⁰

MEDIDAS DO PLASMA

Utilizamos um kit colorimétrico enzimático para medir a glicose (Bioclin®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), triglicérides e colesterol (Bioclin®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) plasmáticos. Usamos a espectrofotometria, realizada com o Analisador de Química BS 200 - espectrofotômetro automático (Mindray, China).

Insulina, leptina, adiponectina e AGEs foram adquiridos da Millipore Corporation, EUA. TNF- α e IL-6 vieram da R&D System, EUA. As concentrações plasmáticas foram medidas utilizando métodos de ELISA, segundo as instruções do fabricante, utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

RESISTÊNCIA A INSULINA

A resistência à insulina foi determinada utilizando o índice do modelo de avaliação da homeostase (HOMA-IR) através da seguinte fórmula:¹¹ HOMA-IR = insulina em jejum (mU/ml) x glicose em jejum (mmol/l)/22.5.

MEDIDAS DOS AGEs E DA INSULINA PLASMÁTICA

Insulina (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA); AGEs (Biolabs Celulares, INC, San Diego, CA); as concentrações plasmáticas foram medidas pelo método ELISA. Um espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) foi utilizado, de acordo com as instruções do fabricante.

QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RENAL USANDO PCR EM TEMPO REAL PARA INTERLEUCINA-6 (IL6) E FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α)

O RNA total foi extraído a partir de tecido adiposo epididimal e tecidos renais, utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen). Utilizamos o Sistema Superscript II de Síntese da primeira cadeia para RT-PCR. Usamos o kit da Invitrogen para a síntese de 20 ml de DNA complementar a partir de 1000 ng do RNA total. Os níveis de RNAm de TNF- α (ensaio Rn 00562055_m1; Applied Biosystems) e IL-6 (ensaio Rn 01410330_m1; Applied Biosystems) foram determinadas por PCR em tempo real. As medidas quantitativas foram realizadas com um kit comercial (TaqMan qPCR; Applied Biosystems) em um sistema de detecção (StepOne Plus; Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram as seguintes: ativação da enzima a 50°C durante 2 min, desnaturação a 95°C durante 10 minutos, os produtos complementares de DNA foram amplificados por quarenta ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 15s e anelamento/extensão a 60 ° C durante 1 min. A expressão do gene foi quantificada em relação aos valores do grupo C, após normalização por um controle interno (ciclofilina: ensaio Rn 00690933_m1; Applied Biosystems) pelo método 2^{-DDCT}, como descrito previamente.¹²

ANÁLISE HISTOLÓGICA

O tecido renal foi fixado por formaldeído a 4% e embebido em parafina. Cortamos duas seções consecutivas de cada amostra (4 mm) e as coramos com hematoxilina-eosina. As lâminas foram escaneadas pelo sistema 3DHISTECH Panoramic MIDI, conectado a uma câmera colorida HITACHI HV-F22 e analisadas sob ampliação de 40x de forma cega.

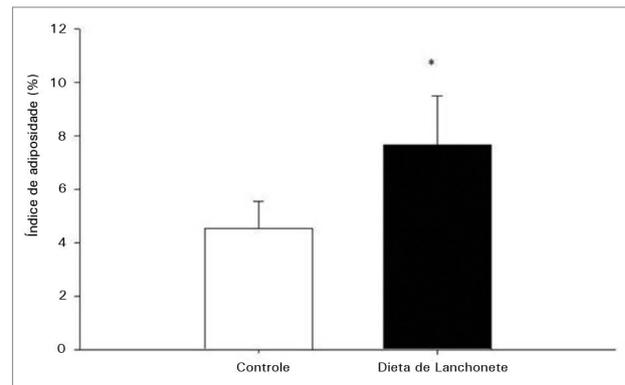
ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP), e a significância foi calculada pela teste-*t* para as variáveis independentes. Utilizamos o software SigmaStat versão 3.5 para Windows (Systat Software, Inc.). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Índice de adiposidade de animais na dieta de lanchonete (CAF-D) na sexta semana foi significativamente maior em comparação com os animais na dieta de controle (C) (Figura 1). Sobre os parâmetros metabólicos, observou-se que glicose, triglicerídeos, leptina e insulina foram maiores no grupo CAF-D em relação ao grupo C. Observamos também que no prazo de seis semanas, os animais CAF-D desenvolveram resistência à insulina (aumento no HOMA-IR) e diminuição significativa da adiponectina plasmática.

Figura 1. Índice de Adiposidade dos animais nas dietas de Controle e de Lanchonete ao longo de 6 semanas. Os dados são expressos como média \pm SE. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (teste-t para variáveis independentes $p < 0,05$)



Não houve diferença nos níveis de TNF- α e IL-6, entre os grupos (Tabela 2). A concentração plasmática de AGEs está apresentada na figura 2. Observou-se aumento nos animais em CAF-D, em comparação com

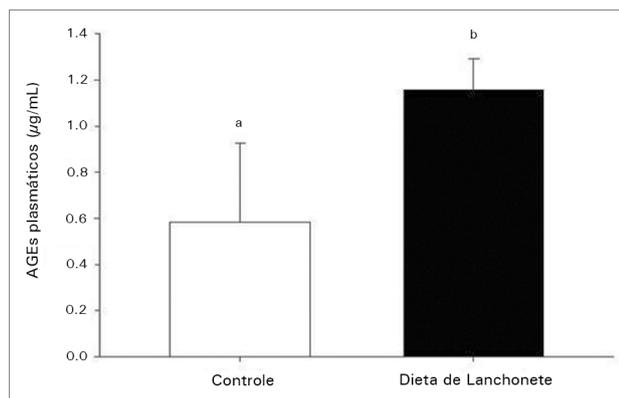
os animais C. Além disso, os animais alimentados com dieta de lanchonete mostraram um aumento significativo na expressão gênica de IL-6 e TNF- α no tecido renal (Tabela 3). Este comportamento não foi observado na expressão gênica no tecido adiposo (Tabela 3).

TABELA 2 VARIÁVEIS PLASMÁTICA, HORMONAIS E DE CITOCINAS DE RATOS QUE RECEBERAM AS DIETAS DE CONTROLE E DE LANCHONETE DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL DE 6 SEMANAS.

Variáveis	Controle (n = 8)	Dieta de Lanchonete (n = 8)
Glicose (mmol/L)	6,8 ± 0,8 ^a	9,0 ± 0,9 ^b
Triglicérides (mg/dL)	45,8 ± 13,9 ^a	87,6 ± 29,3 ^b
Leptina (ng/mL)	2,5 ± 0,1 ^a	6,2 ± 0,1 ^b
Insulina (ng/mL)	1,9 ± 0,1 ^a	3,9 ± 0,2 ^b
Adiponectina (ng/mL)	19,4 ± 0,9 ^a	11,4 ± 0,2 ^b
HOMA-IR	0,9 ± 0,5 ^a	3,8 ± 2,5 ^b
IL-6 (pg/mL)	156,9 ± 11,4 ^a	154,8 ± 12,2 ^a
TNF- α (pg/mL)	3,1 ± 2,0 ^a	4,3 ± 3,9 ^a

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (teste-t para variáveis independentes, p < 0,05). HOMA-IR = avaliação do modelo do índice de homeostase, IL-6 = interleucina-6, TNF- α = fator de necrose tumoral-alfa.

Figura 2. Produtos plasmáticos finais avançados da glicação (AGEs) dos animais nas dietas de controle e de lanchonete ao longo de 6 semanas. Os dados estão expressos como média ± SE. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (teste-t para variáveis independentes, p < 0,05)



A análise histológica do rim nos dois grupos não apresentou alterações estruturais ou características inflamatórias, com ausência de infiltrado inflamatório peritubular, glomerular ou intersticial. Túbulos e glomérulos mostraram arquitetura celular normal. Não houve alteração na morfologia do endotélio vascular, e não houve deposição focal ou disseminada de colágeno, o que poderia sugerir a

TABELA 3 NÍVEIS DE RNAM DE CITOCINAS NO RIM E NO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS, QUE FORAM ALIMENTADOS COM DIETAS DE CONTROLE E DE LANCHONETE DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL DE 6 SEMANAS

Variáveis	Controle (n = 8)	Dieta de lanchonete (n = 8)
Tecido renal		
IL-6	1,0 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,5 ^b
TNF- α	1,0 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,6 ^b
Tecido adiposo		
IL-6	1,0 ± 1,5 ^a	0,4 ± 0,2 ^a
TNF- α	1,0 ± 0,3 ^a	1,3 ± 1,2 ^a

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. (teste-t para as variáveis independentes, p < 0,05). IL-6 = interleucina-6, TNF- α = fator de necrose tumoral-alfa.

esclerose. A hiper celularidade glomerular estava normal, compatível com a linhagem de camundongos utilizados, semelhante aos animais de controle.

DISCUSSÃO

A obesidade é acompanhada por uma resposta inflamatória sistêmica e distúrbios metabólicos.¹³ Este processo inclui aumento dos níveis de citocinas circulantes, assim como na glicemia, nos triglicérides, na leptina e diminuição de adiponectina.¹⁴ O nosso estudo observou a manifestação da obesidade em 6 semanas, com os animais apresentando maiores índices de adiposidade, aumento da glicemia de jejum, de triglicérides, de leptina, de resistência à insulina, e redução na adiponectina, refletindo o contexto da obesidade e distúrbios metabólicos. Essas alterações na composição corporal e no metabolismo já estão bem descritas na literatura, mas com períodos mais longos de exposição à dieta rica em gordura, como no trabalho de Vincent *et al.*,¹⁵ que realizaram um estudo observando alterações metabólicas semanais durante 20 semanas em animais alimentados com dieta rica em gordura (45%) e apenas na 12^a semana encontraram alterações nos perfis lipídico, glicêmico e hormonal. A diferença nos eventos metabólicos pode ser explicada pela composição da dieta. Dieta com alto teor de gordura consiste em uma dieta em que a maior parte das calorias são provenientes de gordura, enquanto dieta de lanchonete é constituída por uma combinação de alimentos saborosos, com alta densidade energética, o que reflete atualmente o padrão de dieta ocidental. Em um estudo conduzido

por Sampey *et al.*,¹⁶ que comparou o efeito da dieta de lanchonete e uma dieta rica em gordura na indução da síndrome metabólica em ratos, os autores mostraram que a dieta de lanchonete induziu um aumento no peso corporal e de gordura epididimal, em comparação com o grupo sob dieta com alto teor de gordura e foi também capaz de induzir resistência à insulina já às sete semanas de consumo, o que não ocorreu com a dieta rica em gordura. Esses dados corroboram a ideia de que a dieta de lanchonete funciona como um gatilho para deflagrar alterações metabólicas.

A literatura tem se concentrado no fato de que um aumentado índice de massa corporal (IMC) aumenta o risco de progressão da doença renal.¹⁷⁻¹⁹ Pessoas obesas com doença renal crônica têm maior velocidade de declínio na taxa de filtração glomerular e têm progressão mais rápida da doença renal.²⁰ No entanto, os mecanismos pelos quais a obesidade predispõe as pessoas a danos renais são desconhecidos.⁸ Sabe-se que a obesidade provoca um aumento da inflamação no tecido renal e lesão renal,²¹ e uma das causas desta inflamação é o estresse oxidativo.²² Os AGEs são gerados *in vivo*, como consequência normal do metabolismo, mas sua formação é acelerada em condições de hiperglicemia, hiperlipidemia e aumento no estresse oxidativo.^{7,23} Esses AGEs são altamente reativos, e podem provocar inflamação principalmente através da geração de TNF- α e IL-6,⁸ que poderia prejudicar o rim através da apoptose das células tubulares, e pode também promover a proliferação de células mesangiais, causando glomerulonefrite proliferativa mesangial, e nefrite.²⁴

No presente estudo não se observou alterações morfológicas no rim entre os grupos, mas foi observado aumento da expressão gênica dessas citocinas no tecido renal de animais em CAF-D. Isso pode ter sido provocado pela alta presença de AGEs no plasma, que quando presentes na corrente sanguínea entram em contato com o rim e se ligam a receptores RAGE, provocando inflamação no órgão. Apesar de alguns estudos na literatura indicarem inflamação no tecido adiposo como o início do processo inflamatório na obesidade, e, posteriormente, pela circulação afeta outros órgãos, nós não observamos neste trabalho, uma vez que não encontramos aumento da IL-6 e TNF- α no tecido adiposo ou no plasma dos animais alimentados com a CAF-D.

Isso nos leva a destacar que no início da obesidade, a inflamação se manifesta de forma independente e por diferentes mecanismos em diferentes órgãos. Assim, nota-se que o estresse oxidativo causado por alterações metabólicas na obesidade e hiperglicemia causam inflamação. Animais obesos tiveram um acúmulo de AGEs no plasma e, é claro que, se esta obesidade persistir além do período proposto (6 semanas), a inflamação nos rins pode se tornar um fator que favorece a progressão de complicações renais. O TNF- α é um importante mediador da inflamação e um importante participante na patogênese da lesão renal, promovendo apoptose por inflamação e o acúmulo de matriz extracelular, reduzindo a taxa de filtração glomerular (TFG) e aumentando a permeabilidade à albumina.²⁵

Juntos, os AGEs no plasma podem ser um biomarcador para a doença renal, uma vez que estudos relataram que, quando há uma redução na glicemia, ou mesmo a diminuição da ingestão de açúcares e comida processada que contém grandes quantidades de AGEs,²⁶ há uma melhora na função renal.²⁷

CONCLUSÃO

Estes dados nos permitem concluir que um período curto de exposição à dieta de lanchonete reflete em alterações metabólicas, níveis plasmáticos elevados de produtos tóxicos como os AGEs, que podem aumentar a expressão de citocinas inflamatórias.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos Mario B. Bruno, José Carlos Georgette, e Renata Capela por seu apoio técnico e a FAPESP (2011/14132-0; 2011/2011/20950-8) pelo apoio financeiro.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesse

REFERÊNCIAS

1. 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. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:847-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200500126>
2. 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. *Am J Kidney Dis* 2003;42:532-8. PMID: 12955681 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(03\)00779-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00779-0)

3. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15596-601. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.242407999>
4. Pitocco D, Tesaro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci* 2013;14:21525-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms141121525>
5. Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, et al. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014;28:169-76.
6. Bierhaus A, Schiekofe S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 2001;50:2792-808. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.50.12.2792>
7. Thallas-Bonke V, Coughlan MT, Tan AL, Harcourt BE, Morgan PE, Davies MJ, et al. Targeting the AGE-RAGE axis improves renal function in the context of a healthy diet low in advanced glycation end-product content. *Nephrology (Carlton)* 2013;18:47-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2012.01665.x>
8. Tomino Y, Hagiwara S, Gohda T. AGE-RAGE interaction and oxidative stress in obesity-related renal dysfunction. *Kidney Int* 2011;80:133-5. PMID: 21720304 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.86>
9. Harcourt BE, Sourris KC, Coughlan MT, Walker KZ, Dougherty SL, Andrikopoulos S, et al. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. *Kidney Int* 2011;80:190-8. PMID: 21412218 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.57>
10. Luvizotto Rde A, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br J Nutr* 2013;110:1803-9. PMID: 23632237 DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114513001256>
11. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00280883>
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001;25:402-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
13. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>
14. Gu Y, Yu S, Lambert JD. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *Eur J Nutr* 2014;53:149-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-013-0510-1>
15. Vincent M, Philippe E, Everard A, Kassis N, Rouch C, Denom J, et al. Dietary supplementation with *Agaricus blazei murill* extract prevents diet-induced obesity and insulin resistance in rats. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:553-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/oby.20276>
16. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:1109-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.18>
17. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med* 2006;144:21-8. PMID: 16389251 DOI: <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-144-1-200601030-00006>
18. Kopple JD, Feroze U. The effect of obesity on chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2011;21:66-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2010.10.009>
19. Abrass CK. Overview: obesity: what does it have to do with kidney disease? *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2768-72.
20. 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 Int* 2004;65:1870-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00582.x>
21. Kim JE, Lee MH, Nam DH, Song HK, Kang YS, Lee JE, et al. Celastrol, an NF- κ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice. *PLoS One* 2013;8:e62068. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062068>
22. Maric-Bilkan C. Obesity and diabetic kidney disease. *Med Clin North Am* 2013;97:59-74. PMID: 23290730 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2012.10.010>
23. Kellow NJ, Savige GS. Dietary advanced glycation end-product restriction for the attenuation of insulin resistance, oxidative stress and endothelial dysfunction: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2013;67:239-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2012.220>
24. Takase O, Marumo T, Imai N, Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, et al. NF-kappaB-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. *Kidney Int* 2005;68:464-73. PMID: 16014023
25. Lee SY, Choi ME. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. *Pediatr Nephrol* 2015;30:1063-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-014-2888-2>
26. Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4483-91. PMID: 19820033 DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-0089>
27. Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013;42:697-719. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2013.07.005>