



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

Pedro Octavio Barbanera

Estudo do efeito do N-acetil-cisteína através do metabolismo energético, complexos respiratórios e estresse oxidativo no tecido hepático de ratos submetidos ao glutamato monossódico

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Angélica Henrique Fernandes

Botucatu
2018

Pedro Octavio Barbanera

Estudo do efeito do N-acetil-cisteína através do metabolismo energético, complexos respiratórios e estresse oxidativo no tecido hepático de ratos submetidos ao glutamato monossódico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Ana Angélica Henrique Fernandes

Botucatu
2018

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

Barbanera, Pedro Octavio.

Estudo do efeito do N-acetil-cisteína através do metabolismo energético, complexos respiratórios e estresse oxidativo no tecido hepático de ratos submetidos ao glutamato monossódico / Pedro Octavio Barbanera. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Ana Angélica Henrique Fernandes
Capes: 40101002

1. Estresse oxidativo. 2. Metabolismo energético. 3. Fígado - Doenças. 4. Calorimetria. 5. Aminoácidos.

Palavras-chave: Calorimetria; Estresse Oxidativo; Fígado; Metabolismo energético; N-acetil-cisteína.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares, amigos e também aqueles que durante minha trajetória acadêmica me apoiaram, me incentivaram, permitindo que eu desfrutasse momentos maravilhosos e apoio durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Prof^a. Dr^a. Ana Angélica Henrique Fernandes pela confiança, ensinamentos e paciência comigo durante a realização deste trabalho.

Agradeço também ao apoio dos funcionários da pós-graduação da clínica médica e do departamento de Química e Bioquímica pela dedicação, eficiência e pelo trabalho profissional.

Meus colegas de laboratório que dividimos muito conhecimento e oportunidade de crescimento acadêmico.

A UNESP de Botucatu pela oportunidade, apoio e o incentivo ao meu crescimento pessoal e captação científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio científico.

Sou muito grato a todos.

RESUMO

A obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública em muitos países, uma vez que está associada queda da qualidade de vida. Embora existam vários fatores que corroboram com o desenvolvimento para tal fato, os hábitos alimentares seja o fator relevante. Os transtornos metabólicos podem resultar em alterações na funcionalidade do fígado, podendo desenvolver Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Como o número de obesos e as co-morbidades associadas ao sobrepeso vêm aumentando abruptamente nas últimas décadas, vários modelos de obesidade experimental têm sido propostos para investigar os distúrbios metabólicos envolvendo suas causas e consequências. O glutamato monossódico é amplamente utilizado na culinária e também por indústrias alimentícias, contudo atua no sistema nervoso central e promove a degeneração de áreas importantes do hipotálamo que leva a distúrbios da saciedade e, conseqüentemente acúmulo excessivo de gordura abdominal. Com a finalidade de estudar substâncias que apresentem potencial atividade terapêutica no controle dos distúrbios metabólicos, o N-acetil-cisteína possui propriedades antioxidantes e exerce hepatoproteção. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi evidenciar a indução da obesidade pelo glutamato monossódico e determinar o efeito do N-acetil-cisteína sobre os parâmetros calorimétricos, metabolismo energético, atividade dos complexos respiratórios e estresse oxidativo no tecido hepático. Foram utilizados 32 ratos Wistar, machos com 21 dias de idade. Inicialmente os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais ($n=16$). O grupo C foi o controle e receberam dieta padrão; o grupo GMS recebeu dieta padrão contendo glutamato monossódico (GMS),

durante 30 dias. Após este período estes grupos (C e GMS) foram subdivididos ($n=8$) em NAC que recebeu o mesmo tratamento de do grupo C e a administração de N-acetil-cisteína e o grupo GMS-NAC que recebeu o mesmo tratamento do grupo GMS e a administração de N-acetil-cisteína. Estes grupos foram mantidos durante 30 dias. Os animais receberam N-acetil-cisteína na concentração $30\text{mg}^{-1}\text{dia}$ através da via intra-gástrica (gavage). O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso com 32 tratamentos e 8 repetições, com nível de significância de 5% de probabilidade. O peso corporal diminuiu ($p<0.05$) em animais do grupo GMS-NAC em relação aqueles do grupo NAC, o qual não diferiu dos grupos C e GMS. A calorimetria revelou menor oxidação de carboidratos e maior oxidação de lipídios com elevada atividade da β -hidroxil-CoA-desidrogenase em GMS. Estes animais também apresentaram menor HDL-colesterol sérico e acúmulo anormal de triacilgliceróis, além de promover o estresse oxidativo no tecido hepático. A administração de N-acetil-cisteína ameizou as alterações metabólicas (aumentou oxidação de carboidratos e diminuiu a oxidação de lipídios), manteve a homeostase da glicose, aumentou a concentração de HDL-colesterol e atenuou o estresse oxidativo. Desta forma, pode-se concluir que a dose administrada de N-acetil-cisteína atenuou os efeitos deletérios impostos pelo comportamento alimentar inadequado, normalizou o metabolismo energético, manteve a homeostase da glicose e reduziu o acúmulo de triacilgliceróis no tecido hepático.

Palavras Chave: Disfunção metabólica; Glutamato monossódico; N-acetil cisteína; Metabolismo Energético; Estresse Oxidativo;

ABSTRACT

Obesity is considered one of the greatest public health problems in many countries, since it is associated with a drop in quality of life. Although there are several factors corroborating with the development for this fact, eating habits are the relevant factor. Metabolic disorders can result in changes in liver function, and can develop Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). As the number of obese and co-morbidities associated with overweight have increased steeply in recent decades, several models of experimental obesity have been proposed to investigate metabolic disorders involving their causes and consequences. Monosodium glutamate is widely used in cooking and also in food industries, but it acts on the central nervous system and promotes the degeneration of important areas of the hypothalamus which leads to satiety disorders and consequently excessive accumulation of abdominal fat. In order to study substances that present potential therapeutic activity in the control of metabolic disorders, N-acetyl-cysteine has antioxidant properties and exerts hepatoprotection. Thus, the objective of the present study was to evidence the induction of obesity by monosodium glutamate and to determine the effect of N-acetyl-cysteine on calorimetric parameters, energy metabolism, respiratory complex activity and oxidative stress in hepatic tissue. Thirty-two Wistar male mice were used at 21 days of age. Initially the animals were distributed in two experimental groups (n = 16). Group C was the control and received standard diet; the GMS group received standard diet containing monosodium glutamate (GMS) for 30 days. After this period these groups (C and MSG) were subdivided (n = 8) into NAC who received the same treatment as group C and administration of N-acetyl cysteine and the GMS-NAC group that received the

same treatment as the group GMS and administration of N-acetyl-cysteine. These groups were maintained for 30 days. The animals received N-acetyl-cysteine at the $30\text{mg}^{-1}\text{day}$ concentration through the intragastric route (gavage). The statistical design was completely randomized with 32 treatments and 8 replicates, with a significance level of 5% of probability. Body weight decreased ($p < 0.05$) in animals in the GMS-NAC group compared to those in the NAC group, which did not differ from the C and GMS groups. Calorimetry revealed lower carbohydrate oxidation and higher lipid oxidation with high β -hydroxacyl-CoA dehydrogenase activity in GMS. These animals also presented lower serum HDL-cholesterol and abnormal accumulation of triacylglycerols, in addition to promoting oxidative stress in liver tissue. N-acetyl-cysteine administration ameliorated metabolic changes (increased carbohydrate oxidation and decreased lipid oxidation), maintained glucose homeostasis, increased HDL-cholesterol concentration and attenuated oxidative stress. Thus, it can be concluded that the administered dose of N-acetyl-cysteine attenuated the deleterious effects imposed by the inadequate alimentary behavior, normalized the energy metabolism, maintained glucose homeostasis and reduced the accumulation of triacylglycerols in the hepatic tissue.

Key Words: Disfunction metabolic; Glutamate monosodium; N-acetyl-cysteine; Energetic metabolism; Oxidative Stress.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	8
2. HIPÓTESE	24
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	26
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	86
8. REFERÊNCIAS.....	87
9. ANEXO.....	113

1. REVISÃO DE LITERATURA

i. Disfunções metabólicas

A obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública em muitos países, uma vez que está associada às complicações que comprometem a produtividade e qualidade de vida, pois é, reconhecidamente, como fator de risco para doenças crônicas degenerativas (HILL, 2006; GRAY & MACDONALD, 2016). No Brasil, a obesidade tem sido foco de atenção, pois os índices têm aumentado, atingindo todas as classes sociais e, já é considerada uma questão de saúde pública.

A organização mundial de saúde estimou para o ano de 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos com sobrepeso e, haja mais de 600 milhões de obesos no mundo (WHO, 2016). Embora existam vários fatores que corroboram com o desenvolvimento para tal fato, está cada vez mais claro que os hábitos alimentares seja o fator relevante (LISSNER, 1995; ZIAUDDEEN, FAROOQI, FLETCHER, 2012; WEISE et al., 2017, BERNARDES et al., 2017).

Diversos fatores estão ligados ao desenvolvimento da obesidade como fatores genéticos, psicológicos, socioeconômicos, culturais e ambientais. Recentemente, Bernardes et al. (2017) demonstraram que a ingestão de uma quantidade excessiva de caloria também pode levar a obesidade, mas o aparecimento e a prevalência do sobrepeso não decorre somente em função da ingestão de nutrientes, mas também por alterações no estilo de vida, o que resulta em decréscimo na atividade física, levando a um balanço energético positivo, portanto favorável para o armazenamento da gordura.

Os transtornos metabólicos pode resultar em resistência à insulina que devido a incapacidade a célula utilizar quantidades suficientes de glicose para produzir energia, se associa a co-morbidades, tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, alterações séricas de lipoproteínas (hipertrigliceridemia, elevado colesterol e baixa concentração de HDL-colesterol) (RANA et al., 2007; XIAO et al., 2013, FABBRINI & MAGKOS, 2015) e, conseqüentemente esteatose hepática (CHEUNG, 2008, XIAO et al., 2013, ALWAHSH et al., 2014).

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) abrange grande espectro de alterações no fígado, desde uma esteatose hepatocelular até fibrose avançada e cirrose irreversível. Para melhor compreensão sobre a DHGNA necessita, à priori, evidenciar a esteatose hepática através do acúmulo de gordura no fígado e também assegurar que causas secundárias para sejam excluídas como consumo excessivo de álcool, hepatite C, doença de Wilson, lipodistrofia, fome, abetalipoproteinemia, nutrição parentérica e alguns fármacos (ex: amiodarona, metotrexato, tamoxifeno, corticoesteróides). Geralmente, os fatores de risco metabólicos encontram-se associado ao desenvolvimento de DHGNA (CHALASANI et al., 2012).

Prevalência de DHGNA na América do Sul, avaliada por ultrassonografia, foi estimada em ~ 30,45%, sendo que a maioria dos estudos que relatam a prevalência no Brasil (ONI et al., 2015). No entanto, diversos estudos relataram na América andina, a prevalência de DHGNA (diagnosticada por ultrassonografia) foi estimada entre 13% a 24% (RIQUELME et al., 2009; . FEIJO et al., 2013; LOPEZ-VELAZQUEZ et al., 2014).

A esteatose hepática (não alcoólica) é considerada atualmente, a forma mais comum de hepatopatia, pois é importante causa de aumento na morbimortalidade

relacionada ao fígado, nos países ocidentais (LAW & BRUNT, 2010, ALWAHSH et al., 2014). Diversos eventos fisiológicos e metabólicos estão envolvidos no desencadeamento da patogênese da esteatose hepática, sendo, portanto de etiologia multifatorial. Neste sentido, estudos têm mostrado que obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e a resistência à insulina são os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da esteatose hepática (não-alcóolica). A adiposidade visceral também se encontra associada a uma maior suscetibilidade para DHGNA em pacientes não obesos, ao contrário da gordura subcutânea e índice de massa corporal (IMC) (SATAPATHY & SANYAL, 2015). Para Loomba et al. (2012), o histórico familiar ou pessoal de indivíduos que apresentem a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é também um considerável fator de risco, uma vez que a DM2 aumenta a chance de fibrose hepática em doentes com DHGNA. Ainda, os portadores de diabetes têm, com o passar do tempo, grande importância em termos de prognóstico em doentes com doenças hepáticas, uma vez que antevê independentemente para cirrose e carcinoma hepatocelular (EL-SERAG, TRAN, EVERHART, 2004). Além disso, indicativos de desenvolvimento de síndrome metabólica - elevada circunferência abdominal, aumento de triacilgliceróis, hiperglicemia, níveis baixo de HDL-colesterol - também se apresentam como preditores desta hepatopatia (BOER et al., 2004; CUSI, 2009, SCHUPPAN et al., 2010, FABBRINI & MAGKOS, 2015).

Como o número de obesos e as co-morbidades associadas ao sobrepeso vêm aumentando abruptamente nas últimas décadas, vários modelos de obesidade experimental têm sido propostos para investigar os distúrbios metabólicos envolvendo suas causas e conseqüências. A administração de glutamato monossódico consiste de um modelo animal desenvolvido para simular o estado clínico de obesidade neuroendócrina (COLLISON et al., 2010).

ii. Estresse Oxidativo

De acordo com Ferreira e Matsubara (1997), o termo radical livre (átomos ou moléculas altamente reativas, com número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica) não é o mais conveniente para designar os agentes reativos patogênicos, uma vez que nem todos apresentam elétrons desemparelhados na última camada, como o peróxido de hidrogênio.

Além disso, evidências têm demonstrado que os efeitos adversos da elevada ingestão alimentar estão associados à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs). As condições de obesidade, fatores alimentares que promovem, à nível sérico, disponibilidade de ácidos graxos livres e altos níveis de glicose na corrente sanguínea promovem excesso de espécies reativas de oxigênio em adipócitos (KRAUTBAUER et al., 2014). Adicionalmente, Belemets et al. (2017) utilizaram glutamato monossódico como indutor da obesidade em modelo animal e evidenciaram maior produção de EROs em tecido adiposo visceral. Além disso, acúmulo de lipídios no tecido adiposo visceral aumenta o recrutamento de macrófagos que secretam TNF- α (WEISBERG et al., 2003), resultando em resistência á insulina. As EROs reagem com ligação dupla de ácidos graxos poliinsaturados de fosfolípidos de membrana que prejudicam a integridade de membranas e conduzem à lise celular que, por sua vez, atraem e ativam macrófagos e conseqüentemente a deterioração estrutural de macromoléculas (BERGAMINI et al., 2004).

Embora os mecanismos de desenvolvimento da esteatose hepática não estejam totalmente esclarecidos, estudos apontam que o acúmulo de triacilgliceróis no hepatócito decorrente de elevada ingestão alimentar surge como componente

hepático destas condições patológicas, e configura um tema relevante, uma vez que este órgão assume posição central do metabolismo (MINCIS & MINCIS, 2006; TSUDUKI et al. 2016). É notório assim, que alterações patológicas no fígado podem ter grandes e importantes repercussões na manutenção da homeostase metabólica (MACHO et al., 2000; LAZARIN et al., 2011).

O aumento da massa adiposa pode acarretar insulina resistência periférica, que ocasiona falha na supressão da atividade da lipase hormônio sensível, mantendo a lipólise elevada no tecido adiposo e, conseqüentemente maior influxo de ácidos graxos livres para o fígado (PESSAYRE & FROMENTY, 2005; POUSSIN et al., 2011).

Os ácidos graxos livres provenientes da lipólise ou da ingestão excessiva de alimento ao serem capturados pelo fígado são β -oxidados. Porém, o excedente será exportado para o plasma sanguínea em VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) e direcionados para o tecido adiposo (PREISS & SATTAR, 2008; SOZIO et al., 2010; CASSARD-DOULCIER & PERLEMUTER, 2011, KRAUTBAUER et al., 2014). Os triacilgliceróis não incorporados à VLDL permanecerão estocados patologicamente no fígado. Em adição, a hiperinsulinemia, originária de uma secreção compensatória em resposta a baixa sensibilidade insulínica dos órgãos periféricos, tende a aumentar a degradação hepática da APOB- apolipoproteína essencial para formação de VLDL - limitando ainda mais a exportação de VLDL para a corrente sanguínea.

Quando a ingestão de calorias excede o gasto energético, ocorre além da lipogênese, oxidação excessiva através da cadeia transportadora de elétrons, constituindo fonte endógena para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois o aumento na quantidade de elétrons na cadeia respiratória pode

provocar rapidamente a saturação dos complexos enzimáticos e restringir o fluxo de elétrons (LEVERVE, 2007). Assim eventualmente uma pequena fração de elétrons pode escapar dos complexos respiratórios I e III e reduzir parcialmente as moléculas de oxigênio, produzindo ânions superóxidos, que posteriormente, convertem em peróxidos de hidrogênio (CHEN et al., 2003; VERCESI et al., 2007; CARDOSO et al., 2010).

A formação excessiva de EROs causa injúria celular de diversas formas, como lipoperoxidação de membranas celulares, pois a matriz mitocondrial bloqueia o fluxo de elétrons na cadeia respiratória devido a grande oferta nos complexos enzimáticos de equivalentes redutores (NADH e FADH); além disso, a oxidação da molécula de DNA mitocondrial (DNAMt), que codificam as cadeias polipeptídicas dos complexos enzimáticos respiratórios é lesada (HAQUE et al., 2002; PEREZ et al., 2003). Paralelamente, as EROs podem oxidar e inativar os complexos enzimáticos respiratórios, contribuindo para bloquear o transporte de elétrons e comprometer a fosforilação oxidativa e a produção de ATP (CHEUNG et al., 2008). Estes fatores acarretam modificações estruturais, molecular e enzimática que levam a disfunção mitocondrial, especialmente em indivíduos com esteatose hepática, devido aos efeitos prolongados de lipotoxicidade (MANTENA et al., 2009). Esta disfunção compromete ainda mais o transporte de elétrons, e a reoxidação das coenzimas reduzidas - NADH + H⁺ e FADH, necessárias para garantir a continuidade dos processos oxidativos no meio intramitocondrial, envolvidos no metabolismo energético, tais como, glicólise, β -oxidação e ciclo do ácido cítrico.

O desequilíbrio entre a produção de EROs e a diminuição da atividade endógeno antioxidante (catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase)

desencadeia o estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTHERIDGE 1993; RAMESH & PUGALENDI, 2005).

Vankoningsloo et al. (2005) mostraram a associação entre estresse oxidativo e diminuição do metabolismo energético, com limitação na taxa de oxidação de ácidos graxos. Nestas condições, ocorre acúmulo de ácidos graxos e de triacilgliceróis nos hepatócitos, com o indicativo de atividade mitocondrial inadequada.

iii. Glutamato Monossódico – Uso em Modelo Animal

O glutamato monossódico atua no sistema nervoso central e promove a degeneração de áreas importantes do hipotálamo, como por exemplo, o núcleo arqueado, o que leva a distúrbios da saciedade acompanhada por hiperfagia e, conseqüentemente acúmulo excessivo de gordura abdominal (FREEMANTLE et al., 2008, WEISE et al., 2017). Estes animais desenvolvem obesidade hipotalâmica por meio de diversas alterações metabólicas, como hiperisulinemia, consistente com resistência à insulina (MATYSKOVA et al., 2008), hiperglicemia e diabetes mellitus tipo 2.

O glutamato monossódico é uma das formas do aminoácido dicarboxílico, L-glutamato. É amplamente utilizado na culinária como condimento alimentar, como substituto do sal e composição de vários produtos alimentares. O glutamato monossódico é um agente flavorizante que tem sido acrescentado nos alimentos industrializados, sendo amplamente utilizado para realçar o sabor e assim conhecido como umami, além de atuar como aditivo alimentar e aumentar a palatabilidade (KENAWY et al., 2012, SINGH & AHLUWALIA, 2012; UGUR CALIS et al., 2016).

Efeitos neurotóxicos associados à exposição ao glutamato monossódico foram inicialmente relatados nas décadas de 60 e 70. Os principais relatos sobre as lesões neuronais relacionadas à administração de glutamato monossódico foram constatados por Olney (1971), que administrou doses de 0,5-4,0 g/kg p.c. de glutamato monossódico, por via parenteral, em camundongos com 2 a 9 dias de idade. Posteriormente, surgiram novos estudos que utilizam o glutamato monossódico em modelo animal administradas por via parenteral e oral desenvolvido para simular o estado clínico de obesidade neuroendócrina (COLLISON et al., 2010) e, conseqüentemente, diversas alterações metabólicas, como hiperinsulinemia consistente com resistência à insulina (MATYSKOVA et al. 2008), hiperglicemia, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e obesidade (NAGATA et al., 2006; HERMANUSSEN et al., 2006).

Adicionalmente, Dolnikoff et al. (2001) e Guimaraes et al. (2002) relataram em seus estudos diversas alterações metabólicas na presença de glutamato monossódico importantes em modelo animal, como taxa metabólica basal reduzida, menor atividade simpática com redução no estoque de catecolaminas na glândula suprarrenal, menor atividade da lipase hormônio sensível (HSL) no adipócito, maior atividade de lipases de lipoproteínas no tecido adiposo, e aumentada atividade lipogênica.

Em modelo animal, observa-se em ratos que a administração do glutamato monossódico altera o peso absoluto de vários órgãos como o fígado, coração, baço, pâncreas e adrenais estão reduzidos (REMKE, WILSDORF & MULLER, 1988; RIBEIRO et al., 1989).

A literatura apresenta estudos que demonstram os efeitos deletérios do uso do glutamato monossódico, visto que a alteração funcional do fígado desempenha

papel fundamental no início da DHGNA, cujos distúrbios metabólicos podem estimular as células hepáticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias e, assim, iniciar inflamação e fibrogênese (FEDERICO et al., 2016, KOBLYIAK et al., 2017).

No trabalho realizado por Junqueira et al. (2011), a dosagem de glutamato monossódico demonstrou alterações no perfil lipídico, indicando hipertriglicidemia, além de alterações anatomopatológicas no tecido hepático. Além disso, Nagata et al. (2006) relataram alterações anatômicas do fígado, como esteatose e congestão portal hepática com consequentes lesões relacionadas ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, com indicativo da perda da normalidade de sua função.

Em pesquisa básica, diversos estudos contemplam as diferentes formas de administração do glutamato monossódico em ratos a induzir alterações cerebrais, permitindo a demasiada afluência de cálcio para dentro da célula neuronal, propiciando a formação de radicais livres (RL) e morte celular (NAGAKANNAN et al., 2012; PAUL et al., 2012; SHIVASHARAN et al., 2013). Além disso, Farombi e Onyema (2006) demonstraram que a administração de glutamato de monossódico aumenta a formação de malonaldeído no fígado de ratos. Os animais que receberam glutamato monossódico são normofágicos, apresentam menor produção de somatotrofina, hipercorticosteronemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistência à insulina, menor atividade da proteína translocadora de glicose GLUT-4, menor atividade metabólica do tecido adiposo marrom e maior deposição de gordura visceral (HIRATA et al., 1997; CESARETTI & KOHLMANN, 2006).

A dislipidemia é uma característica comum em ratos que são submetidos a administração de glutamato monossódico. Estes animais apresentaram níveis elevados de triacilgliceróis (TGs) e colesterol (FURUYA et al., 2009; ARIAS et al., 2015). As lipoproteínas ricas em TG desempenham papel no processo inflamatório

através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), bem como a hipercolesterolemia aumenta a expressão das moléculas de adesão envolvidas na aterogênese (LIBBY, 2007; YAMAZAKI et al., 2011).

Além disso, Seiva et al. (2012) demonstraram alterações metabólicas expressivas ligado à hiperfagia, à resistência à insulina/tolerância à glicose, hiperleptinemia e dislipidemia. Neste estudo, os animais tratados com glutamato monossódico apresentaram alterações cerebrais sobre o centro de regulação do apetite. Neste contexto, Seiva et al. (2012) indicaram deficiência na sensibilidade à insulina tecidual e/ou estimulação da gluconeogênese hepática, uma vez que a liberação aumentada de insulina, induzida pela glicose, contribuiu para a hiperinsulinemia.

De acordo com Quines et al. (2017) foi possível evidenciar através da atividade da enzima óxido nítrico sintase (e-NOS), no tecido hepático, toxicidade tecidual através da administração de glutamato monossódico em ratos recém desmamados. Ainda neste trabalho, há evidências no aumento do processo inflamatório causado pela ativação da ADP-ribose polimerase, desde que este aumento ative vias de transdução próinflamatória, por exemplo, a ativação da enzima quinase mitogênica, que está envolvida com as complicações metabólicas e resistência insulínica.

iv. N-Acetil-Cisteína

Estudos epidemiológicos estabeleceram que a administração de antioxidantes encontra-se relacionada inversamente com a ocorrência de doenças promovidas pelas EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1993; SOHAL & WEINDRUCH, 1996).

Portanto, com a finalidade de estudar substâncias que apresentem potencial atividade terapêutica, a literatura relata algumas propriedades terapêuticas do N-acetil-cisteína (NAC). Trata-se um composto derivado e produzido por plantas do gênero *Allium*, tais como, alho (*Allium sativum* L – 487mg/100g de matéria fresca) e cebola (*A. cepa* L - 623mg/100g de caule e raiz), sendo que a quantidade de N-acetil-cisteína varia em função da espécie e do período de cultivo (KREST, GLODEK & KEUSGEN, 2000). Possui diversos efeitos farmacológicos, incluindo, especialmente ação antioxidante e anti-hiperglicemiante (HSU et al., 2004; JAIN, 2012).

O N- acetil-cisteína é o precursor acetilado dos aminoácidos sulfurados, L-cisteína (L-Cys) e possui efeitos antioxidantes por reagir diretamente com eletrofílicos e por facilitar a formação de um antioxidante intracelular, a glutatona que é um tripeptídeo linear composto por três aminoácidos, o ácido-L- glutâmico (L-Glu), cisteína (L-Cys) e a L - glicina (L-Gly) (RUSHWORTH & MEGSON, 2014). A formação da glutatona a partir da N-acetil-cisteína pode ser observada na Figura 1.

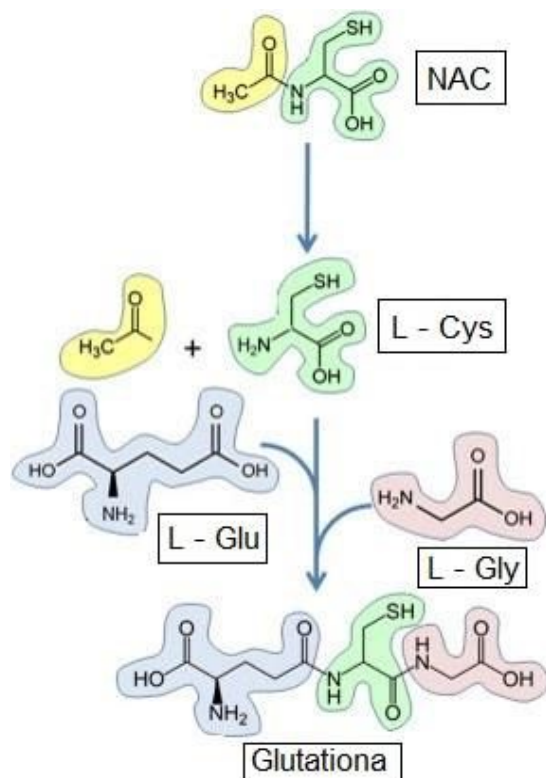


Figura 1: Síntese de glutatona a partir da N-acetil-cisteína (fonte: RUSHWORTH E MEGSON, 2014).

O N-acetil-cisteína ($C_5H_9NO_3S$) é formada pelo aminoácido L-cisteína ($C_3H_7NO_2S$) adicionado de um grupo acetil ($-CO-CH_3$), que torna mais rápida a absorção e distribuição da cisteína pela via oral. Sua indicação terapêutica, por muitos anos, ficou restrita à ação mucolítica e expectorante, bem como ao tratamento da intoxicação por paracetamol na medicina (MOLDEUS et al., 1986). A ação antioxidante da N-acetilcisteína deve-se à sua utilização como substrato para a síntese de glutatona (cedendo a cisteína), um potente antioxidante (DIMARI et al., 1997; DIDONÉ et al., 2002).

O grupo acetil, pertence ao N-acetil-cisteína, é responsável pela sua rápida absorção em vários tecidos após a sua administração pela via oral. Ela é desacetilada e metabolizada no intestino e fígado, e depois incorporada em

proteínas sulfídicas. A atividade antioxidante se deve pela presença do grupo sulfidríla (-SH) como precursor para síntese de glutathiona que através deste que o N-acetil cisteína reage diretamente com as EROs (RUSHWORTH & MEGSON, 2014).

O estudo de Verhasselt (1999) mostrou também que o N-acetil-cisteína, precursor de L-Cisteína inibe a síntese do óxido nítrico (NO), diminui a expressão do fator de necrose tumoral alpha (TNF α) e da ativação de NF κ β (Fator nuclear Kappa β) (envolvido na transcrição de enzimas apoptóticas). Complementando, Moosmann e Behl (2002) observaram que a NAC tem poder antioxidativo efetivo contra a apoptose celular induzida pelo estresse oxidativo, que geralmente está envolvido na fisiopatologia de numerosas doenças.

v. Glutamato Monossódico; Estresse Oxidativo e N-Acetil-Cisteína

Outros pesquisadores verificaram que a exposição ao glutamato monossódico causa injúrias no fígado. Conforme Soliman (2011) e Ibrahim et al. (2012) verificaram aumento da atividade sérica das aminotransferase, o que indica injúria hepatocelular, com perda da integridade celular e alteração na permeabilidade da membrana plasmática promovida pelo estresse oxidativo. Vinodini et al. (2010) e Kenawy (2012) relataram que o glutamato monossódico induziu lipoperoxidação, estresse oxidativo ao diminuir a atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático e renal. Hsieh et al. (2009) observaram esteatose hepática, associada a obesidade e diabetes mellitus tipo 2 promovido pela ingestão de glutamato monossódico.

Conforme estudo realizado por Kumar e Bhandari (2015) diversos fatores controlam o processo de síntese e de quebra de lipídios. Dentre eles, a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é limitante sobre a taxa da

via de fosfato de pentose que produz NADPH, que é essencial para a biossíntese de ácidos graxos e colesterol. No entanto, a ativação da G6PD, em condições hiperglicêmicas, indicam aumento na disponibilidade de NADPH celular para a síntese lipídica, favorecendo a lipogênese que está fortemente associada à obesidade, doença hepática gordurosa, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (CAO et al., 2008; COLLISON et al., 2010; COLLISON et al., 2011).

Com a adição do glutamato monossódico na dieta, a AMPK fosforila o acetil-CoA carboxilase (ACC), tornando-a inativa e conseqüentemente, diminuição na conversão de acetil-CoA em malonil-CoA. A ativação da proteína quinase AMP (AMPK) está associada ao equilíbrio energético da célula. A via de AMPK é conhecida por promover efeitos nos tecidos periféricos para reduzir o risco de obesidade e resistência à insulina. Este efeito ativa a carnitina palmitoyl-CoA transferase-1, aumentando a oxidação de ácidos graxos (KAHN et al., 2005). Além disso, a AMPK medeia o transporte de glicose no músculo esquelético em repouso por aumentar a translocação da glicose, pelo transportador de glicose (GLUT-4), através para a membrana plasmática. Este efeito contribui para o aumento da deposição de lipídios no tecido adiposo, possivelmente devido ao aumento da lipogênese (ARAUJO et al., 2016).

Sheela et al. (1995) administraram N-acetil-cisteína sulfóxido, isolado e purificado da cebola, em ratos com diabetes induzido por aloxana e observaram redução na concentração sérica de glicose, enquanto que a quantidade de glicogênio hepático aumentou consideravelmente em relação àqueles diabéticos não tratados com N-acetil-cisteína sulfóxido. Os grupos tiol dos aminoácidos sulfóxido e dissulfetos oxidam NADPH, desta forma, o NADP⁺ não poderá participar das reações de redução durante a síntese de triacilgliceróis e de colesterol. Além disso,

a diminuição dos equivalentes redutores e a inativação dos grupos tiol podem prevenir a destruição da insulina e assim explicar a ação hipoglicêmica dos compostos sulfurados da cebola. Estes compostos também são dotados da ação inibitória da atividade da glicose -6-fosfatase (LIN et al., 2004).

O grupo N-acetil-cisteína reduz tanto a glicemia como a concentração sérica e hepática de triacilgliceróis e de colesterol, ao diminuir a atividade das enzimas lipogênicas, tais como, a ácido graxo sintase, HMG-CoA redutase, respectivamente (HSU et al., 2006; LOPEZ-MIRANDA et al., 2015).

O N-acetil-cisteína tem a capacidade de atuar no metabolismo oxidativo, uma vez que influencia a fosforilação oxidativa (MIQUEL et al., 1995). Conforme Miquel et al. (1995) e Banaclocha et al. (1997) o N-acetil-cisteína atua através de 2 mecanismos: protegendo proteínas da fosforilação oxidativa contra o dano oxidativo através da manutenção dos grupos SH, essenciais para a atividade enzimática, e evitando a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, o que poderia diminuir a atividade dos complexos (BANACLOCHA et al., 1997). No mesmo estudo de Miquel et al. (1995) relataram aumento das atividade dos complexos respiratórios I, IV e V em mitocôndrias hepáticas de ratos idosos tratados cronicamente com N-acetil-cisteína.

Em modelos animais, o N-acetil-cisteína eleva as defesas antioxidantes em choque hemorrágicos, uma vez que o N-acetil-cisteína também é um precursor da glutatona que desempenha um papel fundamental na defesa antioxidante do pulmão (MANI et al., 2017).

A suplementação de N-acetil-cisteína em um paciente com deficiência de transaldolase parece ser bem tolerada e está associada à melhora bioquímica na

forma de níveis normalizados de alfa-fetoproteínas, embora possa refletir diminuição da lesão hepatocitária e hepatocarcinogênese reduzida (RODAN & BERRY, 2017).

O N-acetil-cisteína possui propriedades antioxidantes e exerce hepatoproteção, além de reduzir a peroxidação lipídica devido à sua atividade antioxidante. No estudo realizado por Maheswari, Saraswathy & Santhranii (2014) observou-se que o tratamento com carbazepina aumentou significativamente os níveis de bilirrubina, os marcadores de hepatotoxicidade e diminuiu os níveis de albumina e proteínas totais. A suplementação com N-acetil-cisteína diminuiu os marcadores de hepatotoxicidade e exerceu uma proteção significativa contra a toxicidade induzida por carbazepina, devido a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica e, portanto, o estresse oxidativo através da atividade de eliminação de radicais livres, o que melhorou os níveis de sistema de defesa antioxidante. Com a dosagem de N-acetil-cisteína a 200 mg/kg melhorou os danos histopatológicos hepáticos induzidos por carbazepina.

Considerando que a glutathiona, na forma reduzida (GSH), atua como substrato da glutathiona peroxidase, a presença de N-acetil-cisteína torna-se importante no sistema de defesa antioxidante, uma vez que este composto recupera a concentração de GSH na célula, o que faz aumentar a atividade da enzima (CHEN et al., 2006; KAGA, 2017).

As alterações metabólicas podem ser controladas através da via exógena, fornecendo recursos para a produção de antioxidantes, e assim, contribuir para a homeostase metabólica. Entretanto, existem fatores de riscos que promovem a disfunção hepática. Deste modo, a procura de produtos naturais com propriedades terapêuticas no controle metabólico e redução de danos hepáticos se torna relevante.

HIPÓTESE

O glutamato monossódico induz disfunções metabólicas, provoca estresse oxidativo e alterações metabólicas no fígado através da disfunção mitocondrial e, o antioxidante N-acetil-cisteína, através de suas propriedades farmacológicas, atenua esta disfunção hepática.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Neste contexto e diante dos relatos em torno das ações farmacológicas do N-acetil-cisteína e dos efeitos deletérios do glutamato monossódico sobre o fígado, o presente trabalho teve como objetivo evidenciar a indução de disfunções metabólicas pelo glutamato monossódico e determinar o efeito do N-acetil-cisteína sobre os parâmetros calorimétricos, metabolismo energético, atividade dos complexos respiratórios e estresse oxidativo no tecido hepático. Tal objetivo geral foi alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evidenciar os parâmetros calorimétricos, glicemia, dislipidemia, marcadores de estresse oxidativo, metabolismo energético e atividade dos complexos respiratórios no tecido hepático de ratos submetidos à ingestão de glutamato monossódico;

- Identificar os efeitos da administração do N-acetil-cisteína sobre a dislipidemia, marcadores de estresse oxidativo, metabolismo energético e atividade dos complexos respiratórios no tecido hepático de ratos submetidos à ingestão de glutamato monossódico.

MATERIAIS E MÉTODO

1. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu (Protocolo número 704-CEUA) e, foram de acordo com os princípios éticos em pesquisa animais, previstos pelo Colégio Brasileiro na Experimentação Animais (COBEA) (Lei 11794/2008; ANEXO 1).

Foram utilizados 32 ratos *Wistar*, machos, recém-desmamados (21 dias). Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu e transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Química e Bioquímica/IB-UNESP-Botucatu, onde foram mantidos em ambiente com temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12:12 horas claro/escuro) controlados.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

Inicialmente os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (n=16). O grupo C foi o controle e receberam dieta padrão; o grupo GMS recebeu dieta padrão contendo glutamato monossódico (GMS), durante 30 dias. Após este período grupos foram subdivididos e constituíram os seguintes grupos experimentais (n=8):

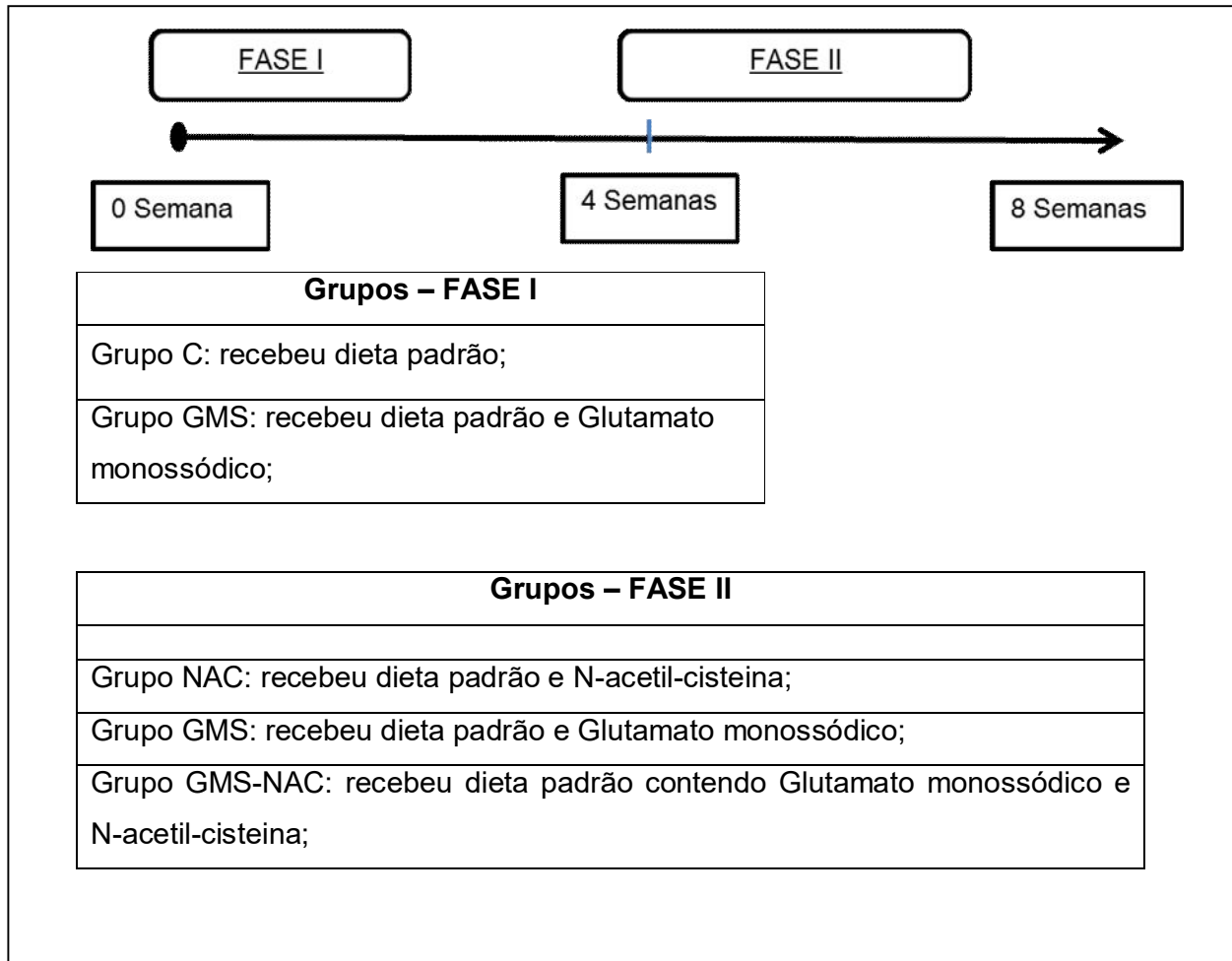
Grupo C: receberam dieta padrão;

Grupo NAC: receberam dieta padrão e N-acetil-cisteína;

Grupo GMS: receberam dieta padrão contendo GMS;

Grupo GMS-NAC: receberam dieta padrão contendo GMS e N-acetil-cisteína.

Estes grupos foram mantidos durante 30 dias. Os animais receberam as respectivas dietas *ad libitum*, e o controle de ingestão de ração e água foram diário e, o peso dos animais foi efetuado semanalmente. O fluxograma abaixo ilustra o esquema experimental.



Fluxograma1: Detalhamento do delineamento experimental, identificando as fases e grupos participante do experimento

A dieta padrão, Purina Labina (Campinas, SP, Brasil), apresentará aproximadamente 26% de proteínas; 3,8% de lipídio; 40,0% de carboidratos e, 3,0 Kcal/g de energia metabolizável. A dieta contendo GMS foi preparada a partir da ração padrão com adição de GMS (Merck) na concentração de 100g/kg, segundo Takasaki (1978).

Os animais receberam N-acetil-cisteína (Sigma-Aldrich; A-7250; $\geq 99\%$ (TLC)), na concentração $30\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$ (LIN et al., 2004) através da via intra-gástrica (gavage).

3. CALORIMETRIA: METABOLISMO BASAL E UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS

Após o período experimental, foi realizada a calorimetria considerando o metabolismo basal, o consumo de O_2 (VO_2) e a produção de CO_2 (VCO_2).

As determinações foram realizadas com a utilização de câmara metabólica para sistema respiratório animal (CWE, Inc, St. Paul, USA), com medidas obtidas em computador através de programa específico (software MMX, CWE, Inc., USA). As medidas do consumo de O_2 e a produção de CO_2 foram monitoradas através de software e calculadas através da média de três determinações (com três inspirações e três exalações) registradas no programa, fornecendo os valores de VO_2 , VCO_2 , quociente respiratório ($\text{QR}=\text{VCO}_2/\text{VO}_2$) e a taxa metabólica basal (TMB).

A calorimetria indireta foi realizada nos animais de jejum de 12 h (STROHL et al., 1997; COMMERFORD, 2000). A oxidação de carboidratos e de lipídios foi calculada tendo como base o QR e os volumes de oxigênio consumido (LABAYEN et al., 1999): oxidação de carboidratos= $\text{VO}_2 \times (\text{QR} - 0.707)/0.746$; oxidação de lipídios= $\text{VO}_2 \times (1-\text{QR})/0.293 \times 0.746$. Onde VO_2 foi medido em l/min, 1,00 é o QR para a oxidação total de carboidratos, 0.707 é o QR para a oxidação total de lipídios, 0.293 é a diferença entre 1,000 e 0.707, 0.746 é o número de litros de oxigênio consumido por g de glicose oxidada.

4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

No final do período experimental (60 dias), os animais foram anestesiados (cloridrato de cetamina 10%, 0,1 mL/100g de peso corporal, i.p.) e, a eutanásia foi realizada por decapitação. O sangue foi coletado e o soro separado por centrifugação a 6000 rpm, por 15 minutos, e utilizado para determinação da glicose, triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e LDL-colesterol, uréia e atividade da alanina aminotransferase (ALT). Após a retirada do sangue, as amostras de aproximadamente 100mg de tecido hepático foram obtidas e estocadas em “freezer” à -80°C.

5. DETERMINAÇÕES SÉRICAS: GLICEMIA, PERFIL LIPÍDICO E LIPOPROTEÍNAS

5.1. Determinação da glicemia

A glicose sanguínea, por ação da glicose-oxidase, é oxidada a ácido glicônico e forma peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formado reage por ação da peroxidase com 4-aminoantepirina e com 1,4-diclorofenol. Por junção oxidativa forma-se aintipirilquinonimina, de cor vermelha. A intensidade de coloração foi proporcional à concentração de glicose (MOURA, 1982), utilizando kits comerciais (Labtest ®).

5.2. Determinação da concentração de triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo SOLONI (1971), o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina, utilizando kits comerciais (Labtest ®).

5.3. Determinação da concentração de colesterol total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colesterol oxidase com hidrólise prévia dos ésteres mediante lipase. O peróxido de hidrogênio liberado, na oxidação, produziu fenol oxidado e 4-aminofenazona, o qual foi quantificado (MOURA, 1982), utilizando kits comerciais (Labtest ®).

5.4. Determinação da concentração HDL-colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, estão as lipoproteínas de alta densidade (HDL), na qual se determinou o colesterol incorporado às mesmas (LOPES-VIRELLA et al., 1977), utilizando kits comerciais (Labtest ®).

5.5. Determinação da concentração de LDL e VLDL-colesterol

Os valores de LDL e VLDL-colesterol foram obtidos pela equação de Friedewald ($VLDL = TG/5$; $LDL = CT - (HDL + VLDL)$) (Cohn e Roth, 1996).

5.6. Determinação da concentração de uréia

A concentração de uréia foi determinada enzimaticamente através da urease, onde houve a formação do azul de idofenol, cuja intensidade de cor formada foi proporcional concentração de uréia presente na amostra (FAWCETT & SCOTT, 1960), utilizando kits comerciais (Labtest ®).

5.7. Determinação da atividade alanina aminotransferase

A atividade da alanina aminotransferase foi determinada segundo técnica de Wilkinson et al. (1965), utilizando o método UV otimizado, onde foi medido o

consumo de NADH_2 , que foi proporcional à atividade da enzima (U/L) presente na amostra.

6. ANÁLISES NO TECIDO HEPÁTICO: OBTENÇÃO TECIDUAL

As amostras de aproximadamente 100mg de tecido hepático foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, na presença de tampão fosfato de sódio (0,01M) pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 12 000 *xg*, durante 30 minutos a -4°C (PEREIRA et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos marcadores do estresse oxidativo (hidroperóxido de lipídio, proteína carbanil, glutaciona total e reduzida, atividade das enzimas antioxidantes), atividade das enzimas chaves do metabolismo energético, concentração de proteínas totais.

6.1. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO: Marcadores do Estresse oxidativo

6.1.1. Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio

Foi determinada através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (JIANG et al., 1991).

6.1.2. Determinação da concentração da glutaciona total e reduzida

A concentração de glutaciona total foi determinada através do método cinético, com a redução do pela glutaciona reduzida (GSH) na presença de NADPH (TIETZ,

1969). A concentração de glutathiona reduzida foi determinada em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB (5,5'-Dithio (2 nitrobenzoic acid) como padrão foi utilizado GSH 1mM (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

6.1.3. Determinação da concentração de proteína carbanil

O sobrenadante foi incubado com 2,4 dinitrophenylhydrazina (DNPH) e centrifugado novamente na presença de tricloroacético (TCA). Após lavagem com acetato de etila/etanol (1:1) foi adicionada guanidina e mantido a 37^o C por 10 minutos e, posteriormente procedeu a leitura em absorbância a 360nm (REZNICK & PACKER, 1994).

6.1.4. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px – EC 1.11.1.9)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura et al. (1974) na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH₂, na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), a atividade da GSH-Px, foi determinada.

6.1.5. Determinação da concentração da atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Ewing & Janero (1995), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio

alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a atividade da SOD presente na amostra.

6.1.6. Determinação da atividade da catalase (E.C. 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM, pH 7.0, utilizando 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras foram realizadas à 240nm (AEBI, 1974).

7. ANÁLISE DO METABOLISMO ENERGÉTICO

O metabolismo energético foi analisado através da atividade das enzimas regulatórias das vias metabólicas, fosfofrutoquinase (PFK, E.C.2.7.1.11.) e lactato desidrogenase (LDL, E.C. 1.1.1.27.) associadas à glicólise e ao metabolismo anaeróbico respectivamente, complexo piruvato desidrogenase (Pi-DH), importante reguladora do metabolismo hepático e citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7.), reguladora do fluxo de substrato através do ciclo do ácido cítrico e marcadora do metabolismo aeróbico. A β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase corresponde à enzima reguladora da β -oxidação.

7.1. Determinação da atividade da fosfofrutoquinase

A PFK foi determinada na presença de aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose isomerase, ATP (adenosina trifosfato) e frutose-6-fosfato, sendo quantificada pela oxidação do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) (BASS et al., 1969).

7.2. Determinação da atividade da lactato desidrogenase

A atividade da lactato desidrogenase foi determinada segundo técnica de Wilkinson et al. (1965) utilizando o método UV otimizado, onde foi medido a velocidade do consumo de NADH_2 , tendo como substrato o piruvato, que foi proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

7.3. Determinação da atividade do complexo piruvato desidrogenase

A velocidade de conversão do piruvato em acetil-CoA catalisada pelo complexo enzimático Pi-DH foi determinada pela redução do NAD^+ na presença de tiamina pirofosfato, coenzima A (CoA) e piruvato, em tampão fosfato de potássio (BASS, 1969).

7.4. Determinação da atividade da citrato sintase

A citrato sintase foi determinada a 412nm em tampão TRIS-HCl 50mM, pH 8,0, contendo acetil-CoA, dithiobis-2-nitrobenzoato (DTBN) 0,1mM e oxaloacetato 0,5 mM (BASS et al., 1969).

7.5. Determinação da atividade da B-hidroxiacil-coenzima A desidrogenase

Atividade da β -hidroxiacil coenziam A desidrogenase (OHADH, E.C. 1.1.1.53) foi determinada em meio contendo acetoacetil coenzima A e NADH (BASS et al., 1969).

8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GLICOGÊNIO

Na determinação do glicogênio, amostras de 100mg de tecido hepático foram homogeneizadas (3000 rpm por 10 minutos) com ácido perclórico (0,6 mol/L). Do sobrenadante retirou uma alíquota (20 μ L) para determinar a concentração de glicose inicial e outra de 10 μ L, que recebeu amiloglicosidase juntamente com tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,5), e determinou a concentração de glicose final. A concentração de glicogênio (mg/g de tecido) foi determinada pela diferença entre as concentrações de glicose final e inicial, segundo Roehrig & Allred (1974). A concentração de glicose foi determinada segundo Moura (1982).

9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Biureto, onde as ligações peptídicas das proteínas reagem com íon cúprico, em meio alcalino, resultando em um complexo violeta, cuja intensidade de coloração foi proporcional à concentração de proteína totais na amostra do tecido hepático (MOURA, 1982).

10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS

Para determinação de triacilgliceróis, amostras de 100mg de tecido hepático foram homogeneizadas em mistura de clorofórmio/metanol (2:1). O homogeneizado recebeu 4 mL de clorofórmio e 4 mL de água e foi filtrado, em seguida as amostras ficaram em repouso durante 24 horas. Após, o sobrenadante (fase aquosa) foi retirado e em seguida desprezado (BLISGH & DYER, 1996). Na fração restante, determinou a concentração de triacilgliceróis através do método utilizado para a determinação sérica.

11. ANÁLISE DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL ATRAVÉS DA ATIVIDADE DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS

Os *pellet* da primeira centrifugação do tecido hepático (item 6) foi ressuspenso com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2 mM de EDTA e centrifugado novamente a 10.000 rpm, assim obteve a suspensão das membranas mitocondriais, onde determinou a atividade da NADH-desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II) e ATP sintase.

11.1. Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (E.C. 1.6.99.5).

Foi determinada segundo do método descrito por Singer (1984) através da velocidade do consumo de NADH, à 340nm, em tampão fosfato de sódio 80nM pH 7,4 na presença de EDTA (50nM).

11.2. Determinação da atividade da succinato desidrogenase (E.C. 1.3.99.1.)

O sistema de reação foi constituído por tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,4 na presença de succinato de sódio (10nM), fenazina metassulfato (0,36 mM), diclorofenolindofenol (12 mM) e, leituras obtidas à 340nm, de acordo com (FISCHER et al., 1985).

11.3. Determinação da atividade da ATPsintase

Foi determinada em tampão TRIS-HCl na presença de cloreto de magnésio, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP e lactato desidrogenase e procedeu as leituras à 340nm (PULLMAN, et al., 1960).

As leituras, tanto para determinar a concentração como a atividade enzimática, foram realizadas em leitor de microplaca (Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle através do Software Gen5 2.0 (Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) e em espectrofotômetro (Pharmacia Bio-tech) com medidas obtidas em computador através de programa específico Software SWIFT. Todos os reagentes foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

12. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS - PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

Para as variáveis bioquímicas estudadas foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições, segundo esquema da análise de variância (ANOVA):

C.V.	G.L.
TRATAMENTOS	3
RESÍDUO	29
TOTAL	32

O nível de significância adotado nas análises estatísticas foi de 5% de probabilidade e as estatísticas F foram significativas quando $p < 0.05$. Foi utilizado o Teste de Tukey para a comparação entre as médias (ZAR, 1996).

RESULTADOS

Observa-se que o peso corporal diminuiu ($p < 0.05$) em animais do grupo GMS-NAC em relação aqueles do grupo NAC, o qual não diferiu dos grupos C e GMS (Tabela 1, Figura 2A).

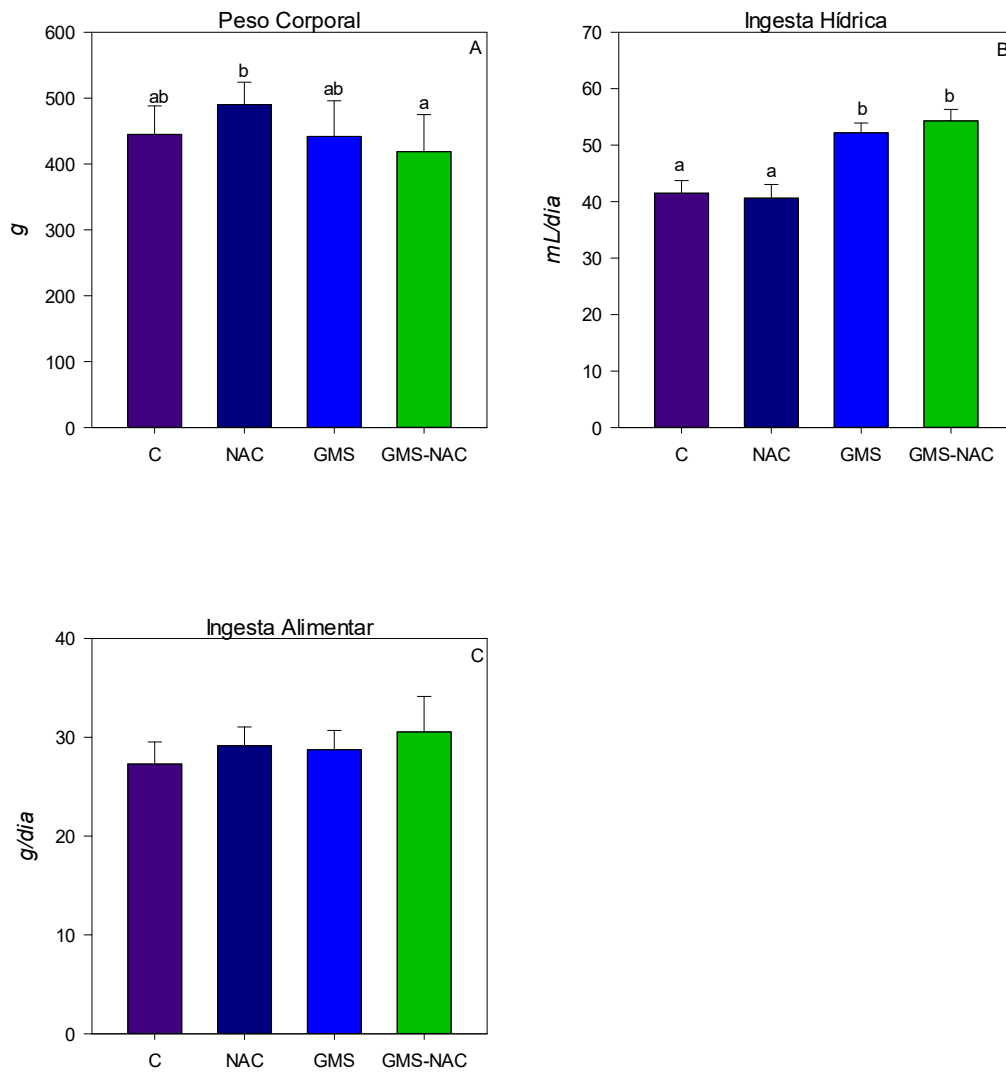
Houve maior ($p < 0.05$) ingestão hídrica em animais que receberam glutamato monossódico com ou sem tratamento com NAC (GMS e GMS-NAC), ao compará-los com os grupos C e NAC (Tabela 1, Figura 2B), os quais não apresentaram diferença estatística ($p > 0.05$) (Tabela 1, Figura 2B).

Em relação ao consumo de ração, não houve significância entre os grupos estudados ($p > 0.05$) (Tabela 1, Figura 2C).

Tabela 1. O peso corporal, ingesta hídrica e alimentar, para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
Peso corporal	444,92±43,22ab	490,18±33,96b	441,77±54,12ab	418,65±56,32a
Ingesta hídrica	40,92±1,80a	40,24±1,80a	52,00±1,77b	54,20±2,43b
Ingesta alimentar	28,07±2,20	29,74±1,95	28,99±2,26	31,35±4,05

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.

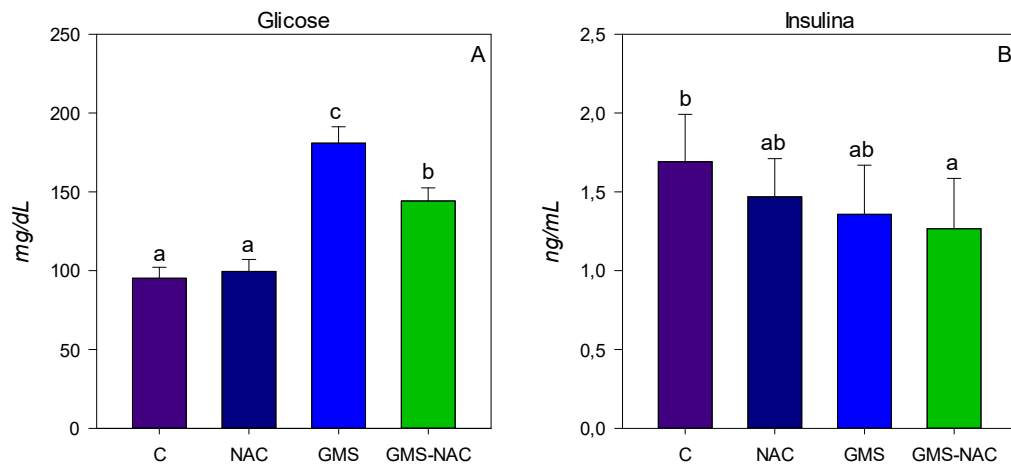
Figura 2. O peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, para os diferentes grupos experimentais.

Através da Tabela 2 e Figura 3A encontram-se os resultados obtidos para glicemia e concentração sérica de insulina. A glicose sérica dos animais pertencentes aos grupos GMS-NAC diminuiu em relação àqueles que receberam apenas GMS, mas não atingiu os valores obtidos para os grupos C e NAC, os quais não diferiram entre si. Os animais do grupo GMS-NAC apresentou redução ($p < 0,05$) no nível sérico de insulina comparativamente ao grupo C, o qual não diferiu dos grupos NAC e GMS (Tabela 2, Figura 3B).

Tabela 2. Os parâmetros séricos de glicose e insulina para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
Glicose	95,17±7,00a	99,50±7,60a	180,90±10,44c	144,25±8,26b
Insulina	1,691±0,300b	1,469±0,242a	1,357±0,312ab	1,266±0,319a

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.

Figura 3. Os parâmetros séricos de glicose e insulina para os diferentes grupos experimentais.

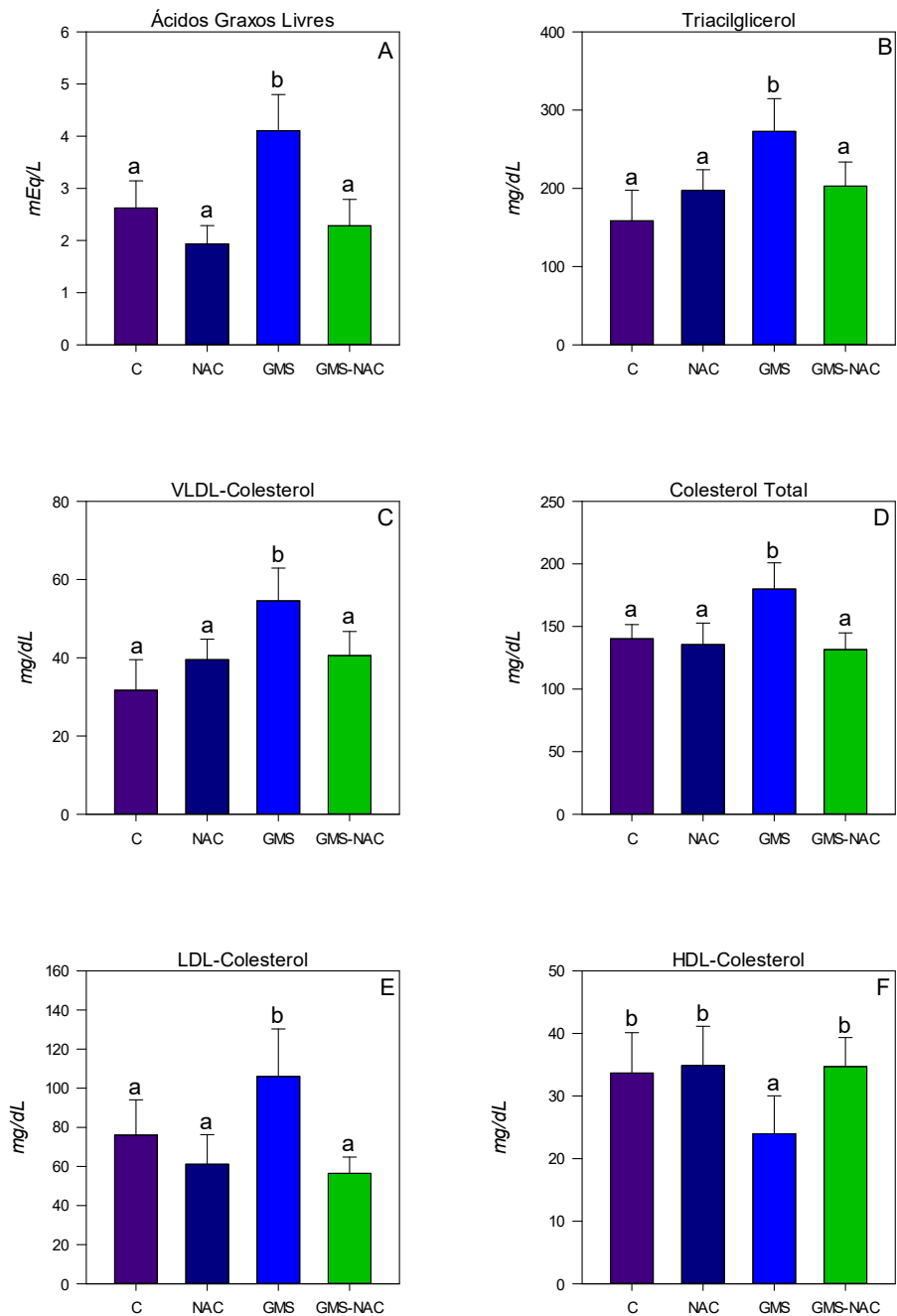
A análise do perfil lipídico revela maior concentração de ácidos graxos, triacilgliceróis, VLDL-colesterol, colesterol total e LDL-colesterol total em animais que receberam apenas GMS em relação aos demais grupos que não apresentaram diferença estatística (Tabela 3 e Figura 4A, 3B, 3C, 3D e 3E).

O valor obtido para concentração sérica de HDL-colesterol foi menor em animais do grupo GMS, em comparação àqueles pertencentes aos grupos C, NAC e GMS-NAC, os quais não diferiram entre si (Tabela 3 e Figura 4F).

Tabela 3. Os parâmetros séricos de ácidos graxos livres, triacilgliceróis, VLDL-colesterol, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
Ácidos graxos livres	2,622±0,523a	1,933±0,351a	4,105±0,693b	2,281±0,506a
Triacilgliceróis	158,50±39,01a	197,60±26,16a	272,80±41,73b	202,80±30,90a
VLDL-colesterol	31,70±7,80a	39,52±5,23a	54,56±8,35b	40,56±6,18a
Colesterol Total	140,14±11,38a	135,50±17,21a	179,93±20,87b	131,50±13,31a
LDL-colesterol	76,03±18,04a	61,10±15,15a	105,96±24,37b	56,45±8,34a
HDL-colesterol	33,67±6,45b	34,88±6,26b	23,97±6,05a	34,71±4,62b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.

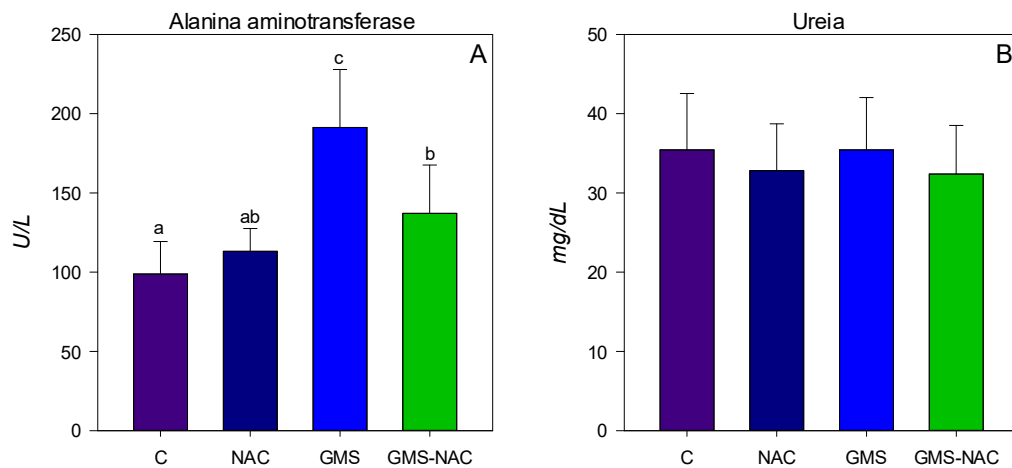
Figura 4. Os parâmetros séricos de ácidos graxos livres, triacilgliceróis, VLDL-colesterol, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol para os diferentes grupos experimentais.

A atividade sérica da alanina aminotransferase aumentou significativamente no grupo GMS. Enquanto o NAC foi eficiente em reduzir a atividade desta enzima em animais submetidos ao GMS (GMS-NAC), porém sem atingir valores próximos ao grupo C que não diferiu do grupo NAC (Tabela 4 e Figura 5A). O nível sérico de ureia manteve-se inalterada entre os grupos experimentais ($p>0.05$). (Tabela 4 e Figura 5B).

Tabela 4. Os parâmetros séricos de alanina aminotransferase, uréia para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
Alanina aminotransferase	98,84±20,52c	113,14±14,39al	191,29±36,61c	137,14±30,48k
UREIA	35,44±7,11	32,81±5,90	35,44±6,60	32,38±6,13

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p<0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.

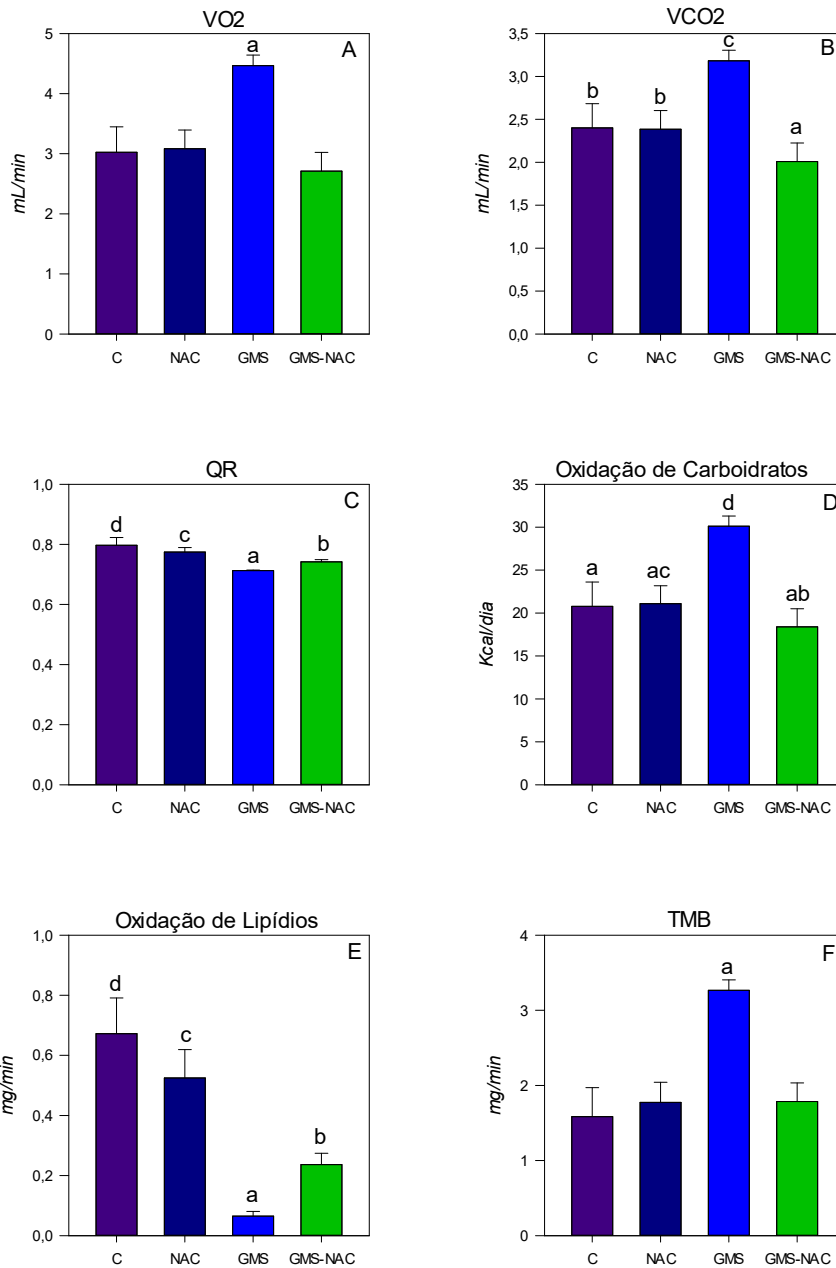
Figura 5. Os parâmetros séricos de alanina aminotransferase, uréia para os diferentes grupos experimentais.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados obtidos para calorimetria indireta. Os animais submetidos à administração de glutamato monossódico apresentaram maiores valores para consumo de oxigênio (VO_2) e produção de CO_2 (VCO_2), e menor quociente respiratório (QR) comparativamente aos demais grupos. Exceto VCO_2 e QR o VO_2 , em animais submetidos ao GMS e tratados com NAC (GMS-NAC), apresentou valor semelhante aos grupos C e NAC (Figuras 6A, 6B e 6C). A oxidação de carboidratos diminuiu em animais de GMS em relação aos demais grupos. Porém o grupo GMS-NAC permaneceu com valor inferior ($p < 0.05$) ao grupo C. Enquanto a oxidação de lipídios diminuiu em GMS comparativamente aos demais grupos que não diferiram entre si (Figura 6D). A maior ($p < 0.05$) taxa metabólica basal foi observada em GMS e a menor ($p < 0.05$) em GMS-NAC que não diferiu de C, mas diferiu de NAC (Figura 6E).

Tabela 5. A determinação do consumo de O₂ (VO₂), produção de CO₂ (VCO₂), quociente respiratório (QR), oxidação de carboidratos, oxidação de lipídios e taxa metabólica basal (TMB), para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
VO₂	3,02±0,43a	3,08±0,31a	4,47±0,18b	2,71±0,31a
VCO₂	2,40±0,28b	2,39±0,22b	3,18±0,12c	2,01±0,22a
QR	0,80±0,03d	0,78±0,015c	0,71±0,00a	0,74±0,01b
Oxidação Carboidratos	0,67±0,12d	0,53±0,094c	0,07±0,015a	0,24±0,037b
Oxidação de Lipídios	1,58±0,39a	1,78±0,27a	3,27±0,14b	1,79±0,25a
TMB	20,78±2,83ab	21,09±2,09b	30,12±1,18c	18,40±2,10a

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos (p<0.05). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.



Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C=dieta padrão; NAC=dieta padrão e NAC; GMS=dieta com GMS; GMS-NAC=dieta com GMS e NAC.

Figura 6. A determinação do consumo de O₂ (VO₂), produção de CO₂ (VCO₂), quociente respiratório (QR), oxidação de carboidratos, oxidação de lipídios e taxa metabólica basal (TMB), para os diferentes grupos experimentais.

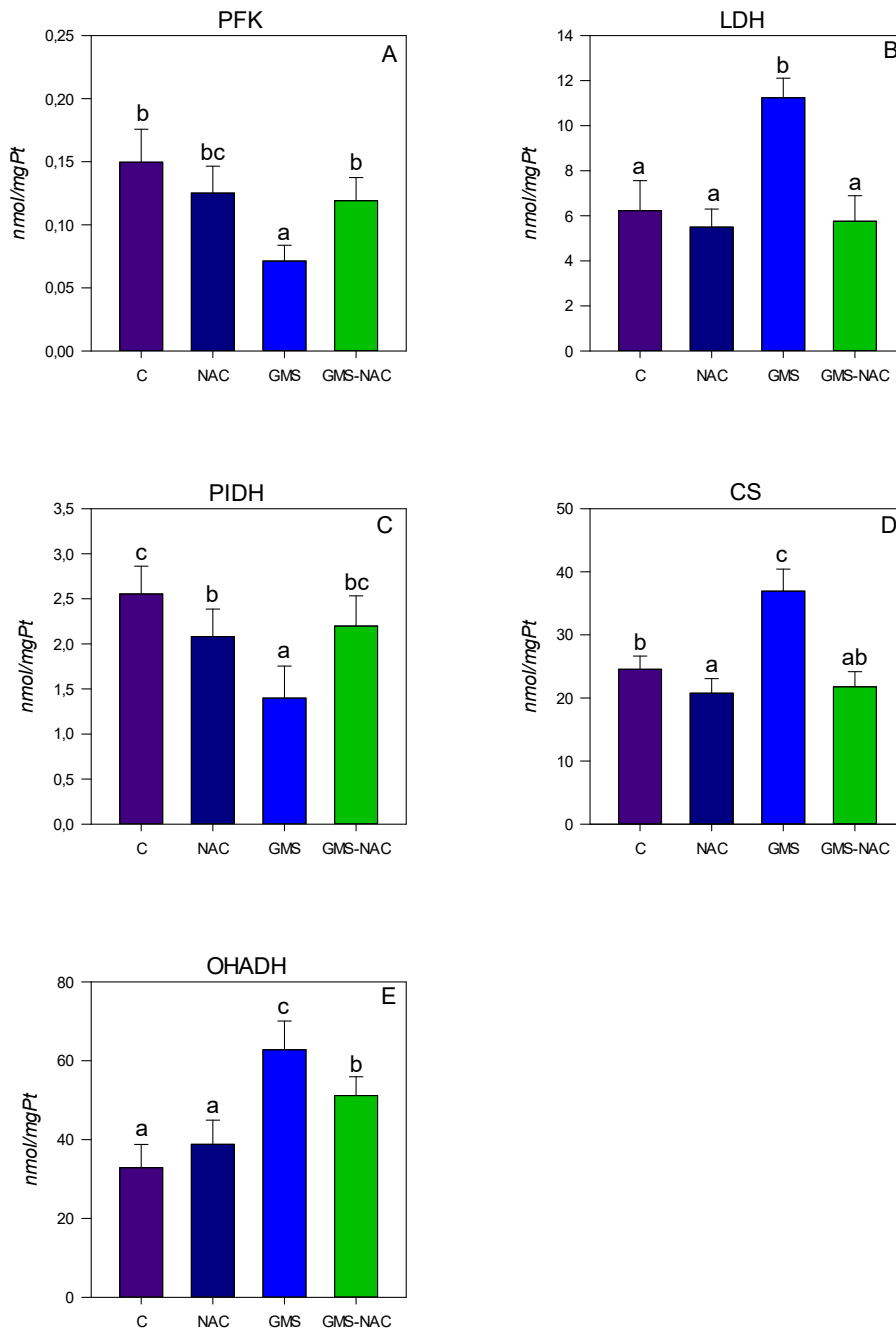
A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a atividade das enzimas marcadoras do metabolismo energético no tecido hepático. A atividade da phosphofruutoquinase diminuiu em animais submetidos a administração de GMS. Enquanto NAC foi eficiente em aumentar a PFK em animais que receberam GMS (GMS-NAC), porém sem atingir os valores obtidos em C (Figura 7A). A Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) esteve elevada em GMS em relação aos demais grupos os quais não apresentaram diferença estatística ($p > 0.05$) (Figura 7B). Os animais de GMS demonstraram diminuição na atividade da piruvato desidrogenase. Enquanto aqueles pertencentes ao grupo GMS-NAC não diferiu tanto do grupo C como do grupo NAC (Figura 7C).

A atividade da citrato sintase e da β -hidroxi-acil CoA desidrogenase aumentou em GMS e o NAC foi capaz de reduzir em animais submetidos à administração de GMS (GMS-NAC), a valores próximos aos grupos C e NAC para citrato sintase, sendo $NAC < C$. Enquanto a β -hidroxi-acil CoA desidrogenase não diferiu entre NAC e C (Figura 7D e 7E).

Tabela 6. As enzimas fosfofrutoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH), piruvato desidrogenase (PiDH), citrato sintase (CS) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (OHADH), para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
PFK	0,150±0,026c	0,125±0,021bc	0,071±0,012a	0,119±0,018b
LDH	6,23±1,33a	5,50±0,80a	11,24±0,87b	5,76±1,14a
PiDH	2,55±0,31c	2,08±0,30b	1,40±0,36a	2,20±0,33bc
CS	24,55±2,09b	20,76±2,31a	36,92±3,50c	21,78±2,39ab
OHADH	32,88±5,87a	38,78±6,16a	62,79±7,26c	51,15±4,77b

Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta *ad libitum*; NAC= dieta *ad libitum* e NAC via gavagem; GMS=dieta *ad libitum* contendo GMS; GMS-NAC= dieta *ad libitum* contendo GMS e NAC via gavagem.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta ad libitum; NAC= dieta ad libitum e NAC via gavagem; GMS=dieta ad libitum contendo GMS; GMS-NAC= dieta ad libitum contendo GMS e NAC via gavagem.

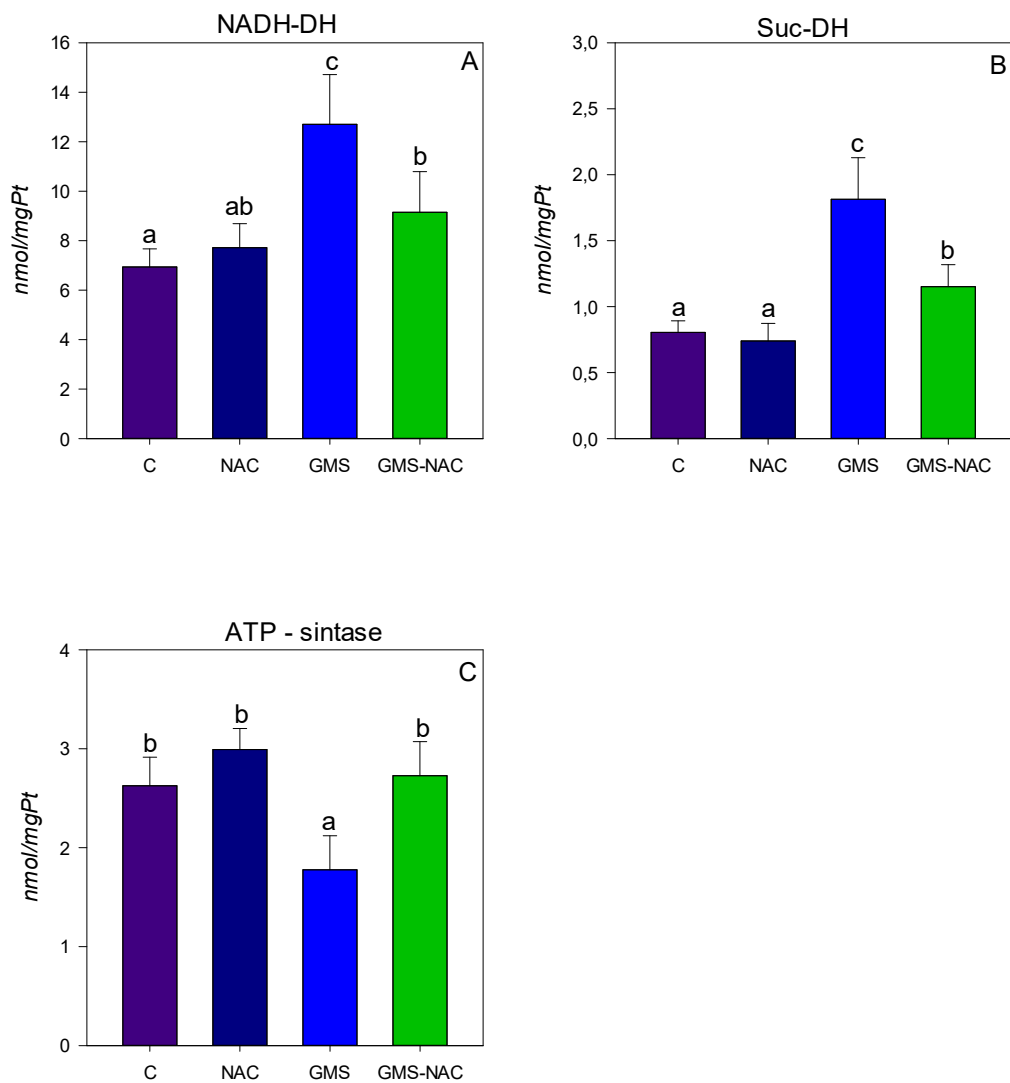
Figura 7. As enzimas fosfofrutoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH), piruvato desidrogenase (PiDH), citrato sintase (CS) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (OHADH), para os diferentes grupos experimentais.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados obtidos para atividade hepática dos complexos respiratórios. Os animais pertencentes ao grupo GMS demonstraram aumento na atividade tanto da NADH desidrogenase como da succinato desidrogenase em relação aos demais grupos que apresentaram diferenças significativas, segundo esquema: GMS+NAC=NAC>C para NADH desidrogenase e GMS+NAC>NAC=C para succinato desidrogenase (Figura 8A e 8B). Enquanto a atividade da enzima ATPsintase esteve reduzida no grupo GMS em relação aos demais grupos, os quais não diferiram estatisticamente entre si (Figura 8C).

Tabela 7. Atividades da NADH desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP sintase, para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
NADH-DH	6,94±0,73a	7,72±0,97ab	12,70±2,01c	9,15±1,64b
Suc-DH	0,81±0,088:	0,74±0,13a	1,81±0,32c	1,15±0,17b
ATPsintase	2,63±0,29b	2,99±0,21b	1,77±0,34a	2,73±0,34b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta *ad libitum*; NAC= dieta *ad libitum* e NAC via gavagem; GMS=dieta *ad libitum* contendo GMS; GMS-NAC= dieta *ad libitum* contendo GMS e NAC via gavagem.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta ad libitum; NAC= dieta ad libitum e NAC via gavagem; GMS=dieta ad libitum contendo GMS; GMS-NAC= dieta ad libitum contendo GMS e NAC via gavagem.

Figura 8. Atividades da NADH desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP sintase, para os diferentes grupos experimentais.

No tecido hepático, as proteínas totais não diferiram estatisticamente para este modelo de estudo ($p>0.05$), embora o grupo GMS-NAC apresentou maior valor absoluto (Tabela 8, Figura 9A).

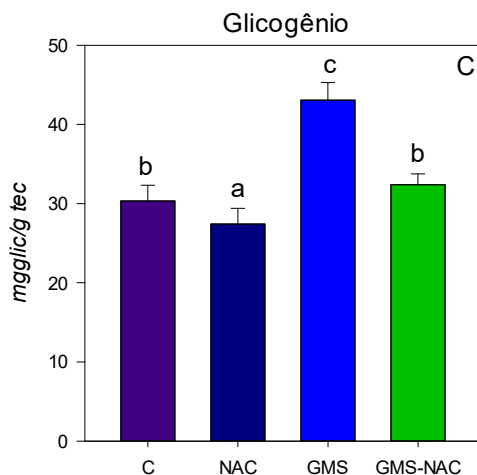
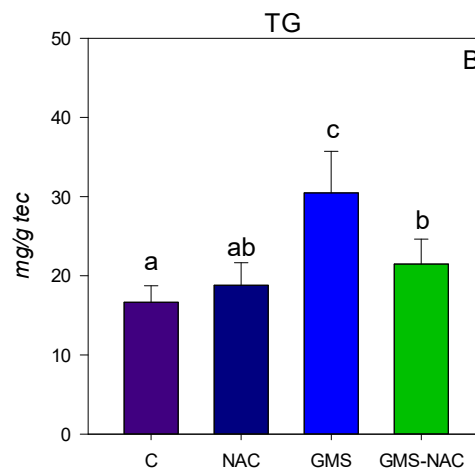
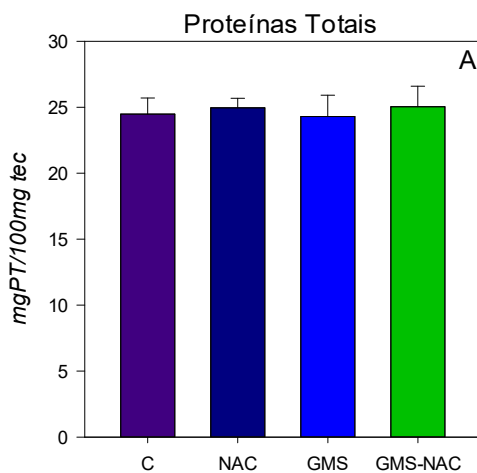
Em relação ao triglicerídeo presente no fígado, os grupos que receberam glutamato monossódico em sua dieta apresentaram maiores valores em relação aos grupos C e NAC, contudo os grupos GMS-NAC e NAC não diferiram estatisticamente entre si ($p>0.05$). O grupo GMS apresentou significância em relação aos demais grupos deste estudo ($p<0.05$) (Tabela 8, Figura 9B).

A concentração de glicogênio hepático está ilustrada na figura 9C. A administração de N-acetilcisteína equiparou estatisticamente os grupos GMS-NAC e C, ou seja, não houve significância entre os grupos ($p>0.05$). Contudo, o grupo NAC apresentou menor concentração de glicogênio hepático, o que resultou em diferença estatística em relação aos demais grupos experimentais ($p<0.05$) (Tabela 8). Em contrapartida ao grupo NAC, o grupo que recebeu em sua dieta o GMS não tratado com N-acetilcisteína apresentou maior concentração hepática de glicogênio, diferindo estatisticamente dos grupos C, NAC e GMS-NAC (Tabela 8, Figura 9C).

Tabela 8. A concentração hepática de proteínas totais, triacilglicerol e glicogênio, para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
Proteínas totais	24,48±1,22	24,96±0,72	24,30±1,61	25,04±1,56
Triacilgliceróis	16,65±2,08a	18,80±2,85a	30,47±5,20c	21,48±3,14b
Glicogênio	30,33±1,97b	27,43±1,96a	43,06±2,23c	32,39±1,38b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta *ad libitum*; NAC= dieta *ad libitum* e NAC via gavagem; GSM=dieta *ad libitum* contendo GSM; GSM-NAC= dieta *ad libitum* contendo GSM e NAC via gavagem.



Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta ad libitum; NAC= dieta ad libitum e NAC via gavagem; GMS=dieta ad libitum contendo GMS; GMS-NAC= dieta ad libitum contendo GMS e NAC via gavagem.

Figura 9. A concentração hepática de proteínas totais, triacilglicerol e glicogênio, para os diferentes grupos experimentais.

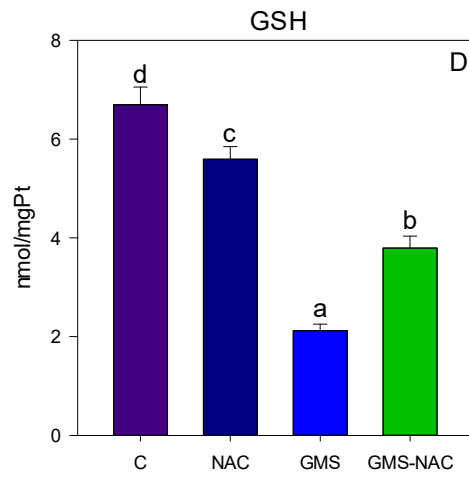
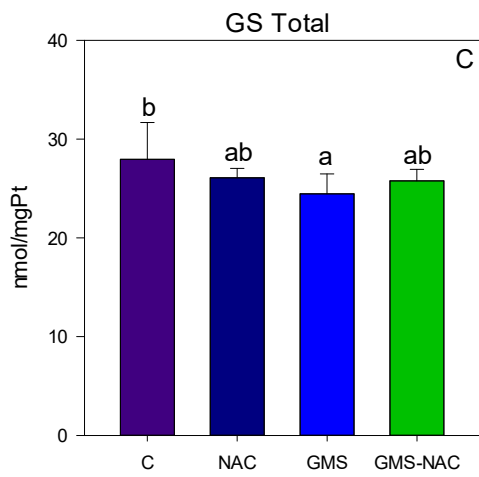
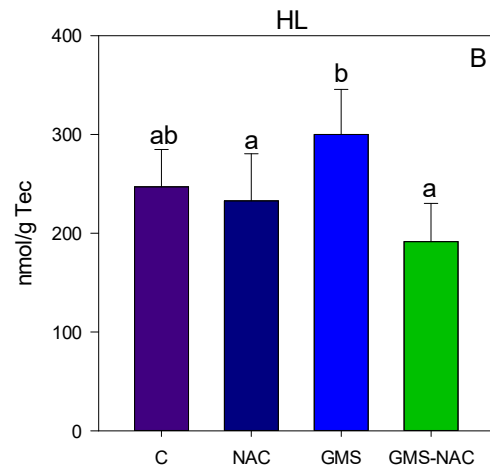
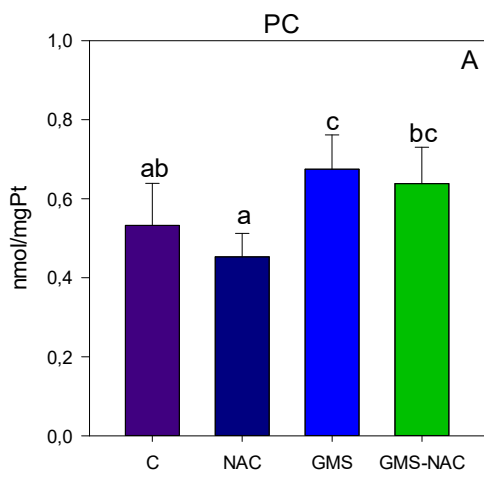
Na Tabela 9 encontram-se os resultados obtidos para os parâmetros do estresse oxidativo. A concentração hepática da proteína carbonila esteve aumentada ($p < 0.05$) em animais pertencentes ao grupo GMS e GMS-NAC, sendo esse último sem diferença significativa com o grupo C (Tabela 9 e Figura 10A).

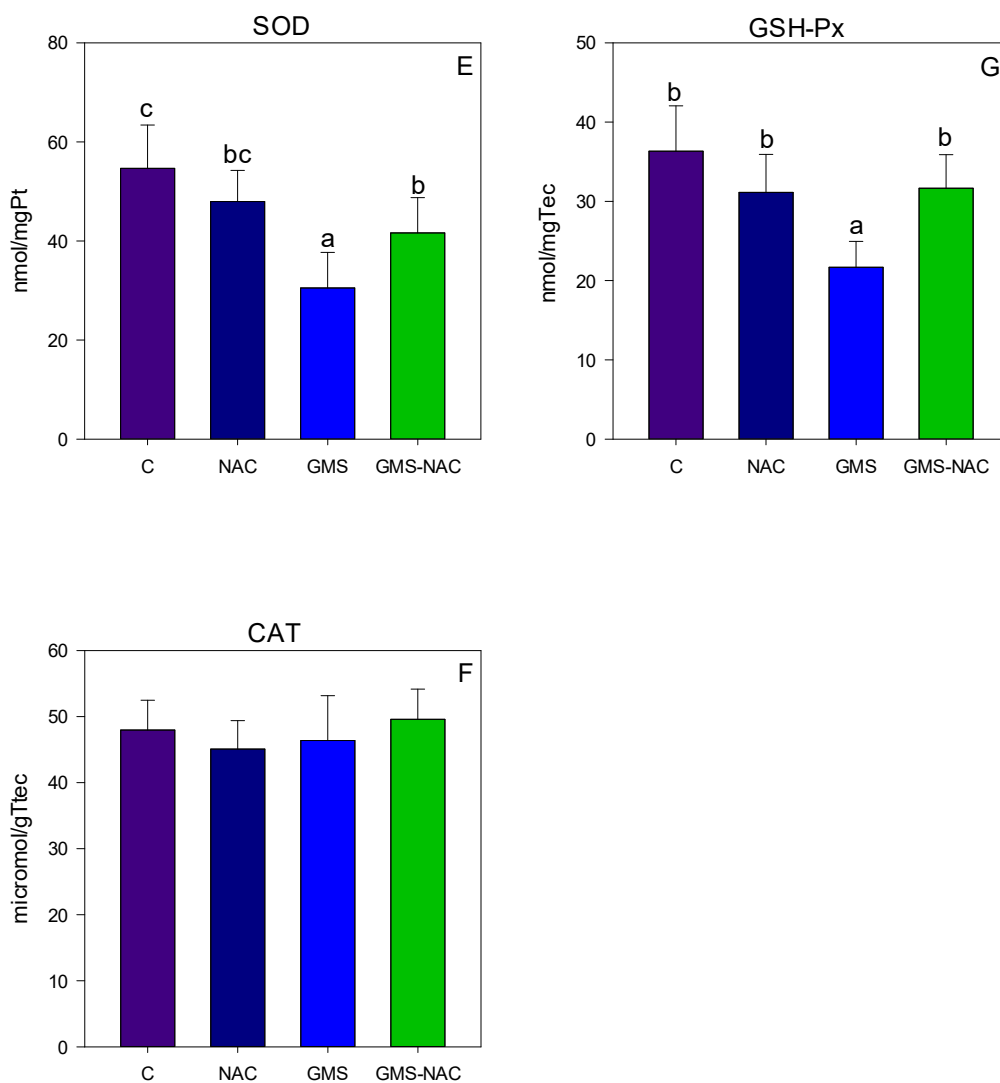
O grupo GMS-NAC apresentou queda na concentração de hidroperóxido de lipídio no tecido hepático em relação ao grupo GMS, o qual não diferiu de grupo C, mas demonstrou diferença significativa com grupo NAC (GMS-NAC=NAC<GMS) (Figura 10B). Os animais submetidos somente ao GMS apresentou diminuição no nível hepático de glutathiona total em relação ao controle (C), porém permaneceu inalterado quando comparado com os demais grupos (GMS=GMS=NAC) (Figura 10C). Quanto à concentração de glutathiona reduzida houve diferença significativa entre os grupos experimentais num ordem decrescente de valores C>NAC>GMS-NAC>GMS (Figura 10D). A atividade da superóxido dismutase decresceu significativamente no grupo GMS, enquanto a administração de NAC em animais submetidos ao GMS (GMS-NAC) foi capaz de aumentar a atividade desta enzima, porém sem atingir os valores próximos do grupo controle (C), o qual não permaneceu inalterado em relação ao grupo NAC (Figura 10D). Quanto a atividade da catalase não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 10E). Os animais do grupo GMS apresentaram menor atividade da glutathiona peroxidase em comparação aos demais grupos experimentais, os quais não diferiram entre si (Figura 10F).

Tabela 9. A concentração de proteína carbonila (PC), hidroperóxido de lipídio (HL), glutatona total (GS total), glutatona reduzida (GSH) e atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px), para os diferentes grupos experimentais.

	GRUPOS			
	C	NAC	GMS	GMS-NAC
PC	0,53±0,11ab	0,45±0,06a	0,68±0,09c	0,64±0,09bc
HL	246,94±37,79a	232,77±47,65a	300,02±45,56†	191,47±38,75a
GS total	27,96±3,72b	26,09±0,94ab	24,46±2,02a	25,78±1,16ab
GSH	6,67±0,36d	5,59±0,26c	2,12±0,13a	3,79±0,24b
SOD	54,66±8,76c	47,97±6,27bc	30,51±7,20a	41,64±7,12b
CAT	47,97±4,49	45,08±4,30	46,39±6,78	49,59±4,56
GSH-Px	36,32±5,72b	31,13±4,80b	21,68±3,28a	31,65±4,23b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta *ad libitum*; NAC= dieta *ad libitum* e NAC via gavagem; GMS=dieta *ad libitum* contendo GMS; GMS-NAC= dieta *ad libitum* contendo GMS e NAC via gavagem.





Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C= dieta ad libitum; NAC= dieta ad libitum e NAC via gavagem; GMS=dieta ad libitum contendo GMS; GMS-NAC= dieta ad libitum contendo GMS e NAC via gavagem.

Figura 10. A concentração de proteína carbonila (PC), hidroperóxido de lipídio (HL), glutatona total (GS total), glutatona reduzida (GSH) e atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px), para os diferentes grupos experimentais.

Discussão

As doenças relacionadas a transtornos metabólicos como a resistência à insulina, dislipidemia, obesidade, esteatose hepática (não alcoólica) estão associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade. A compreensão de fatores relacionados à variação do peso corporal é fundamental na prevenção de doenças metabólicas, ou seja, obter maior conhecimento às complicações associadas ao sobrepeso e aos fatores de riscos para o desenvolvimento de doença hepática torna-se fundamental (PIETILAINEN et al, 2010; AGUIRRE et al, 2014).

O peso corporal dos animais pertencentes ao grupo que ingeriram glutamato monossódico (GMS) não diferiram estatisticamente do grupo controle (C). Estes resultados diferem da literatura, uma vez que em animais adultos, o glutamato monossódico adicionado a alimentos ou a beber água não alterou a ingestão de alimentos ou o ganho de peso corporal (TORDOFF, ALEMAN & MURPHY, 2012; NAKAMURA et al., 2013). A proximidade dos valores referentes ao peso entre os grupos C e GMS não implica em afirmar que os animais do grupo GMS não ganharam massa adiposa, uma vez que um dos efeitos do glutamato monossódico é sobre a redução da estrutura esquelética, por provocar queda dos níveis de hormônio de crescimento circulantes, além de diminuir a sensibilidade nos tecidos periféricos (SHAPIRO et al., 1993; MISKOWIAK & PARTIKA, 1993). Por outro lado, é interessante ressaltar que o glutamato monossódico aumenta o apetite durante as refeições através do seu efeito estimulante do sabor, com isto aumenta a saciedade e atrasa a próxima refeição, o que pode reduzir massa adiposa (MASIC & YEOMANS, 2013; LOPEZ-MIRANDA et al., 2015).

Conforme estudo realizado por Maheswari, Saraswathy & Santhranii (2014), foi possível evidenciar aumento da massa corporal em animais tratados com N-acetil-cisteína nas doses de 50mg/Kg, 100mg/Kg e 200mg/Kg. Além disso, as diferentes doses administradas do N-acetil-cisteína também aumentou o peso total do fígado em animais com hepatotoxicidade induzida por carbazepina. Adicionalmente, Ribeiro et al (2011) também comprovou que a administração de N-acetil-cisteína aumenta a massa corporal nas doses de 25mg/Kg e 75mg/Kg, via intraperitoneal. No presente estudo, a dose de 30mg/Kg de N-acetil-cisteína não apresentou significância naqueles grupos que receberam NAC tanto na presença como na ausência de GMS, comparativamente ao controle. Porém a diminuição do peso corporal é evidenciada pela administração de NAC em animais submetidos ao GMS (GMS-NAC) em relação aqueles que receberam apenas (Tabela 1; Figura 2A, Figura 2C).

A oferta de glutamato monossódico acrescido na dieta não promoveu, aos grupos GMS e GMS-NAC, indicativos de distúrbios alimentares, pois não houve diferenças significativas para ingestão alimentar. Tal achado corrobora com Sasaki et al (2011) que observaram aumento tanto no peso como no IMC em camundongos que receberam MSG, porém sem alteração na ingestão de alimentos. Os autores salientaram que a principal causa da obesidade, provocada pelo GMS, é a perturbação do apetite, causada por alterações no metabolismo energético devido à disfunção no sistema nervoso autônomo.

Contudo, Lopez-Miranda et al (2015) observaram maior ingestão hídrica em razão da oferta diária de glutamato monossódico adicionada à água de beber dos animais. Enquanto que no presente estudo os animais que receberam GMS através da ração não apresentaram diferenças para ingestão hídrica (Tabela 1; Figura 2B). A

literatura justifica este aumento da ingesta hídrica pelo efeito osmótico induzido pelo glutamato monossódico independentemente da maneira que foi ofertada, ou seja, estimulação da sede nos animais (McKINLEY & JOHNSON, 2004).

Os distúrbios no metabolismo da glicose são descritos na literatura como consequência da utilização do glutamato monossódico (TAWFIK & AL-BADR, 2012; UGUR CALIS et al, 2016). A glicose é captada pelos hepatócitos através dos transportadores de glicose tipo 2 (GLUT2), e fosforilada pela enzima quinase gerando glicose-6-fosfato (G6P). A G6P pode ser convertida em glicose-1-fosfato (G1P) que é adicionada às cadeias de glicogênio através da enzima glicogênio sintase (RUI, 2014). Uma vez que a quantidade de armazenamento de glicogênio é alcançada, o excesso de glicose é redirecionado para síntese de ácidos graxos (AG), em um processo denominado de lipogênese.

A concentração sérica de glicose aumentou em animais submetidos a administração de glutamato monossódico, tratados ou não com NAC (GMS e GMS-NAC) em relação aos demais grupos deste estudo (Tabela 2, Figura 3A). Estes valores, possivelmente, indicam deficiência na sensibilidade à insulina tecidual e/ou estimulação da gliconeogênese hepática, uma vez que não observa deficiência de insulina. Embora os mecanismos que causam alterações metabólicas ainda não estejam bem esclarecidos, Seiva et al (2012), Della Corte et al (2015) e Arias et al (2015) relataram que a disfunção metabólica esteja associada ao descontrole na atividade das células β -pancreáticas em aumentar a liberação de insulina.

Entretanto a glicemia diminuiu naqueles animais que receberam NAC, indicando a eficiência deste composto em controlar a glicemia na presença do GMS, mesmo sem alteração da concentração de insulina entre os grupos GMS e GMS-NAC.

A resistência insulínica está associada à deposição de lipídio visceral desde que a lipólise é proporcional à massa adiposa, portanto a maior massa adiposa expõe o fígado a maiores quantidades de ácidos graxos livres (AGLs) (LIMA et al., 2005; LIRA et al., 2010). Os AGLs em excesso podem alterar as vias de sinalização da insulina ao favorecerem a fosforilação do IRS-1 em serina (e não em tirosina), isto implica que esta fosforilação inadequada suprime a ativação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), o que favorece o aumento da produção hepática de glicose e, conseqüentemente reduz a captação da glicose (ANTUNES & BAZOTTE, 2015). Contudo, observa-se que tanto administração de N-acetil-cisteína quanto o glutamato monossódico não promoveram diferenças na concentração de insulina sérica entre os grupos estudados (Tabela 2 e Figura 3B).

Tanto os ácidos graxos livres (AGLs) como o glicerol contribuem para a síntese de triglicerídeos hepáticos através de cadeia longa de ácidos graxos no tecido hepático ligados à coenzima A (para formar acil coenzima A graxo). A concentração hepatocelular de acil CoA graxo resulta do balanço entre a formação de AGLs (de AGL circulante, lipogênese, captação de lipoproteínas e degradação de triglicérides) e utilização (síntese e oxidação lipídica) (RODEN, 2006).

Em geral, a resistência insulínica adiposa é o principal contribuinte para o armazenamento excessivo de triglicerídeos hepáticos (LOMONACO et al., 2012; TILG, MOSCHEN, RODEN, 2017). No presente estudo, pode-se observar maior concentração sérica de AGLs nos animais submetidos ao GMS com indicativos de atividade de lipogênese aumentada (Tabela 3; Figura 4A). No estudo de Lambert et al. (2014) foi observado que a lipogênese é três vezes maior em pacientes com DHGNA do que em indivíduos fisiologicamente normais, representando uma característica fundamental do fígado gorduroso. A lipogênese pode ser estimulada

tanto pela insulina, via proteína de ligação do elemento regulatório de esterol 1c (SREBP-1c) quanto pela glicose, via proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos (ChREBP) (RODEN, 2006). Assim, o glutamato monossódico pode favorecer a lipogênese e conseqüentemente a DHGNA.

A administração de NAC em animais que receberam GMS foi eficiente em normalizar o nível de AGLs, indicando melhor sensibilidade a insulina e menor influxo de AGLs para o fígado. Contudo, este cenário pode ser indicativo de melhor aproveitamento da glicose pelas células como substrato energético.

A dislipidemia, um dos fatores da síndrome metabólica, é caracterizada por apresentar concentrações elevadas de colesterol total, triacilgliceróis, LDL-colesterol e baixos níveis de HDL-colesterol (PEDRO et al., 2017).

Sabe-se que a concentração sérica de colesterol e de LDL-colesterol é dependente tanto de fonte exógena, provenientes da dieta, como endógena (síntese), e esta ocorre quando há disponibilidade de moléculas de acetil-CoA. Os níveis de colesterol total e de LDL-colesterol do grupo GMS foram substancialmente aumentados em relação aos demais grupos. Embora a literatura relate que a hipercolesterolemia seja incomum sem atribuir a uma dieta enriquecida com colesterol (ALWAHSH et al., 2014, PEDRO et al., 2017), há indicação que níveis séricos elevados de colesterol estejam associados a hiperglicemia juntamente com o desenvolvimento de fígado gorduroso, conferindo risco de acidentes cardiovasculares (SHIMOMURA & WAKABAYASHI, 2013; ALWAHSH et al., 2014).

As concentrações séricas de colesterol total e de LDL-colesterol diminuíram em animais do grupo GMS-NAC, atingindo valores médios obtidos para o grupo controle. Neste sentido, Sit et al (2014) reforçaram o efeito benéfico do NAC sobre a concentração de colesterol. Além disso, a propriedade antioxidante da N-acetil-

cisteína indiretamente ajuda a diminuir os níveis de lipídios circulantes, reduzindo ou inibindo a peroxidação lipídica em ratos com infarto do miocárdio (NAGOOR MEERAN et al., 2012).

Observa-se no presente estudo que a dieta acrescida de glutamato monossódico promoveu aumento sérico tanto de triacilgliceróis como de VLDL-colesterol.

De acordo com Valastyan et al. (2008) a concentração sérica de VLDL-colesterol e de triacilgliceróis decorre basicamente de dois processos metabólicos, ou seja, biossíntese hepática de triacilgliceróis e a depuração plasmática de VLDL-colesterol, que consiste no catabolismo extra-celular, desta lipoproteína no tecido adiposo e muscular. Esta degradação envolve a atividade da lípase lipoproteica – ativada pela insulina – que catalisa a hidrólise das ligações ésteres dos triacilgliceróis incorporados na lipoproteína.

Por outro lado, a concentração sérica de triacilgliceróis e de VLDL-colesterol reduziu em animais do grupo GMS-NAC, sugerindo que o NAC controlou a síntese hepática de triacilgliceróis e, conseqüentemente a liberação da lipoproteína VLDL-colesterol, processos metabólicos estes que foram exacerbados pelo GMS. Chen et al. (1995) e Vaisy et al. (2011) observaram o favorecimento do NAC sobre estes parâmetros.

Sabe-se que a fração lipoproteica HDL-colesterol tem a função de realizar o transporte reverso do colesterol, ou seja, remover o excesso do colesterol dos tecidos extra-hepático e levar para o fígado. Portanto, a diminuição sérica desta lipoproteína nos animais do grupo GMS pode contribuir como fator de risco para as doenças cardiovasculares relacionadas a hábitos alimentares inadequados. Estes resultados comparativamente com outros estudos, indicaram que dietas nas quais o

glutamato monossódico seja acrescido reduzem o nível de HDL-colesterol (LOPEZ-MIRANDA et al., 2015; FABBRINI et al., 2015).

Por outro lado, N-acetil-cisteína normalizou a concentração sérica de HDL-colesterol nos animais que receberam GMS, indicando seu efeito favorável sobre os níveis de HDL-colesterol. Estes resultados são consistentes com Sit et al. (2014), Joshi et al. (2014) e Teodorak et al. (2017) ao relatarem que a administração de N-acetil-cisteína manteve o perfil lipídico na faixa da normalidade, além de elevar o nível da lipoproteína HDL-colesterol.

A literatura indica aumento da atividade sérica alanina aminotransferase (ALT) na DHGNA (ÂNGULO et al., 1999; MANTON et al., 2000; FISHBEIN et al., 2003). Segundo Lira et al. (2010) observaram, através de relatos baseados numa população de jovens obesos com algum grau de fígado gorduroso, valores aumentados de ALT, o que pode ser interpretado como indicador de esteatose hepática não alcoólica. Adicionalmente, nos estudos de McCullough (2002) e Patton et al. (2006) foram apresentados correlações entre o aumento de massa adiposa corporal e lesão hepática, com grau de esteatose hepática não alcoólica aumentado, confirmado através da atividade elevada da ALT no soro sanguíneo.

Neste estudo foi possível observar que o consumo de glutamato monossódico, tanto na ausência como na presença de NAC (GMS e GMS-NAC), elevou a atividades de ALT, comparativamente aos demais grupos. No entanto, a administração de N-acetil-cisteína (30mg/dia) diminuiu a atividade da ALT no plasma de animais que receberam GMS, indicando certo efeito hepatoprotetor do N-acetil-cisteína.

O efeito benéfico do NAC sobre o fígado é descrito como sendo umas de suas propriedades farmacológicas descritas na literatura (MANI et al., 2017; RODAN & BERRY, 2017). Além disso, o grupo NAC apresentou atividade sérica da ALT próxima

àquela observada ao grupo C, o que indica que a dosagem utilizada não provocou toxicidade sobre o tecido hepático (Tabela 4; Figura 5A). Segundo estudo realizado por Ferreira et al. (2016) a administração de N-acetil-cisteína (10mg/Kg de peso do animal via intraperitoneal) atenuou o desenvolvimento de cirrose hepática em ratos tratados com paracetamol, além de restaurar as funções hepáticas.

Os níveis plasmáticos de uréia refletem a taxa de filtração renal, de forma que a elevação deste composto nitrogenado pode indicar deficiência renal, desta forma dosagem de uréia no sangue torna-se importante para avaliação da função renal, pois a concentração aumenta à medida que a velocidade da filtração glomerular diminui (GONZÁLEZ, 2009). No presente estudo não evidenciou qualquer alteração no nível sérico de ureia, possivelmente não houve comprometido renal com a administração tanto de NAC como de GMS (Tabela 4, Figura 5B).

A calorimetria indireta permite evidenciar o substrato utilizado para obtenção de energia pelo organismo e, assim avaliar o metabolismo nos principais órgãos ativos energeticamente, incluindo o fígado, pois descreve as adaptações periféricas, como a capacidade oxidativa (NOVELLI et al., 2010; HOLLOWAY et al., 2012). Mourão et al., (2005) complementaram a definição de calorimetria indireta como um método para a determinação de taxas de utilização de substratos energéticos durante o consumo de O_2 e liberação de CO_2 , pela análise do ar inspirado e expirado pelos pulmões. Esta metodologia quantifica e identifica a natureza de substratos energéticos que são metabolizados pelo organismo. O VO_2 corresponde à quantidade de oxigênio consumido, o VCO_2 a quantidade de dióxido de carbono produzido por grama de substrato oxidado, sendo que o quociente respiratório ($QR = VCO_2/VO_2$) é frequentemente empregado para determinar qual combustível

metabólico, carboidratos ou lipídios, que está sendo oxidado pelo organismo (LABAYEN et al., 1999).

Os animais que receberam GMS apresentaram maiores valores tanto para VO_2 como para CO_2 , porém menor QR, indicando que VO_2 foi relativamente maior que VCO_2 , quando se compara aos demais grupos. Estes resultados comprovam que o GMS induziu maior oxidação de lipídios em detrimento a oxidação de carboidratos (Tabela 5; Figura 6A, 6B, 6C, 6D e 6E). Sabe-se que o QR corresponde à relação entre a taxa de consumo de O_2 e a produção de CO_2 , a redução de VO_2 para GMS refletiu em menor valor para QR, indicando que a elevação na oxidação de lipídios, como substrato energético, foi acompanhada pela diminuição na oxidação de carboidratos.

Ao induzirem a obesidade em modelo animal, Delany & West (2000) e Diniz et al. (2008) justificaram o quadro de obesidade acrescentando sacarose na dieta através da modificação da utilização de substratos energéticos, com maior oxidação de lipídios. No presente estudo, o acréscimo de glutamato monossódico na dieta modificou a seleção de combustíveis metabólicos, uma vez que a preferência pela oxidação de lipídios pode ser devido a presença de glutamato monossódico, indicando que houve necessidade de catabolizar triacilgliceróis no tecido adiposo e liberar ácidos graxos para a corrente sanguínea tornando disponíveis para os tecidos oxidá-los para obtenção de energia.

A relação VCO_2/VO_2 foi elevada em ratos do grupo GMS-NAC em relação ao grupo GMS, o qual sugeriu principal ativação do metabolismo de lipídios. Dietas hipercalóricas estimulam a lipólise e, conseqüentemente a disponibilidade de ácidos graxos para os tecidos muscular e hepático, assim ocorre diminuição tanto na internalização como na utilização intracelular de glicose (SORIA et al., 2001). Esta

condição pode também explicar a elevação da glicemia e baixa oxidação de carboidratos na presença de GMS, o qual interferiu na concentração sérica de glicose e a sua oxidação.

A quantidade de dióxido de carbono produzido, comparativamente a de oxigênio consumido durante os processos oxidativos, varia de acordo com o teor de oxigênio presente na molécula do substrato oxidável. O fato dos ácidos graxos serem moléculas relativamente reduzidas ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$) em comparação com carboidratos ($\text{C}_6\text{-H}_{12}\text{O}_6$), os tecidos requerem mais oxigênio para oxidar lipídios. Além disso, a oxidação completa de ácidos graxos durante a fosforilação oxidativa gera grande quantidade de ATP, isto contribui para aumentar ainda mais a necessidade de oxigênio e diminuir a razão fosfato/oxigênio (P/O), a qual reflete o número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigênio reduzido na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (LOPASCHUK et al., 2010).

A administração de N-acetil-cisteína em animais que receberam GMS (grupo GMS-NAC) atenuou tanto o consumo de O_2 como a produção de CO_2 . Desta forma, o QR aumentou com melhor utilização de carboidratos, como combustíveis metabólicos, e menor oxidação de lipídios, no grupo GMS-NAC em relação a aqueles animais que receberam apenas GMS.

A dose proposta de administração do N-acetil-cisteína ($30\text{mg}^{-1}\text{dia}$) normalizou a taxa de oxidação de lipídios, devido a menor diferença entre VO_2 e VCO_2 observada ao grupo NAC e GMS-NAC, quando comparada ao grupo GMS, cuja diferença foi maior. Além disso, o N-acetil-cisteína demonstrou eficiente em aumentar a oxidação de carboidrato para os animais do grupo GMS-NAC em relação ao grupo GMS (Tabela 5; Figura 6D). Estes resultados sugerem que o N-acetil-cisteína atenuou os

efeitos metabólicos impostos pelo acréscimo de glutamato monossódico na dieta dos animais pertencentes ao grupo GMS-NAC.

O maior equilíbrio na oxidação de substratos energéticos é devido à capacidade do organismo em oxidar carboidratos e lipídios. Trabalhos realizados por Poirier et al. (2001), Brun et al. (2007) e Bordenadave et al (2008) sugeriram que quanto melhor for a condição do organismo em manter qualidade funcional de seus sistemas fisiológicos, melhor será o equilíbrio em oxidar os substratos. Porém, Melanson et al. (2002) salientaram que a maior oxidação lipídica reportadas em algumas pesquisas pode não representar o real aumento de utilização do lipídio como substrato energético, pois, em seu próprio estudo os autores demonstraram que a oxidação de lipídios em indivíduos submetidos a atividade aeróbia não diferiu estatisticamente da qual ocorreu na inatividade física.

Considerando que a taxa metabólica basal é a quantidade de energia mínima necessária que o organismo requer para executar e manter as funções básicas/vitais do organismo (WOODS et al. 2017) e é dependente tanto do consumo de oxigênio (VO_2) como pela produção de gás carbônico (VCO_2), o aumento da TMB em animais do grupo GMS pode indicar que o organismo utilizou maior quantidade de energia ingerida para suas atividades vitais, disponibilizando-a menos para o depósito no tecido adiposo. De fato houve aumento no consumo de O_2 , corroborando com o aumento na taxa de oxidação de lipídio, o que pode também explicar o não aumento de peso nestes animais.

A administração de NAC em animais submetidos a ingestão de GMS foi eficaz em diminuir a TMB, desde que a alteração na seleção do combustível metabólico é controlada pela internalização celular e oxidação de carboidratos, e conseqüentemente supressão na oxidação de lipídios, assim explica queda na TMB.

Estes resultados são respaldados por Novelli et al (2009) ao relatarem que o NAC normalizou a TMB em animais que receberam dietas hipercalóricas.

O metabolismo energético do fígado foi estudado através da atividade de enzimas-chave que marcam as principais vias metabólicas, destacadas pela fosfofrutoquinase (PFK) e lactato desidrogenase (LDH) ambas marcadoras do metabolismo glicolítico e indicadoras do fluxo de metabólitos na via da glicólise; a piruvato desidrogenase (Pi-DH), que catalisa a conversão do piruvato, proveniente da glicólise, em acetil-CoA, substrato para o ciclo do ácido cítrico. Em condições aeróbicas o piruvato, é transportado para o interior da mitocôndria, onde é descaboxilado e oxidado pela ação da piruvato desidrogenase em acetil-CoA, que condensa-se ao oxaloacetato, cuja reação é catalisada pela citrato sintetase (responsável pela entrada de metabólitos no ciclo do ácido cítrico) (PASLMQUIST & MATTOS, 2006; LYALL et al., 2018).

Sabe-se que a atividade da PFK está favorecida em baixas concentrações de ATP e inibida quando as células estão supridas de ATP e com outros substratos, tais como ácidos graxos (DEPRE et al., 1998; KAGA et al., 2018). Assim, no presente estudo, a diminuição da atividade da PFK em animais pertencentes ao grupo GMS pode ser devido à presença de ácidos graxos no tecido hepático. Além disso, a baixa atividade desta enzima comprova prejuízos na oxidação de carboidratos, mesmo observando elevada atividade na LDH.

A diminuição da atividade da enzima PFK corrobora com a literatura e representa uma resposta adaptativa ao excesso de lipídios disponível para a oxidação (NEMETH et al, 1992).

Nota-se que o grupo GMS teve a atividade da Pi-DH reduzida, devido a menor oferta de carboidratos disponível ao tecido hepático, ou seja, a baixa taxa de oxidação

de carboidratos neste grupo (Tabela 6; Figura 7C). Contudo, isso afeta diretamente a atividade da Pi-DH, uma vez que a redução na atividade desta enzima gera menos moléculas de acetil-coA, provenientes do piruvato, para serem oxidadas no ciclo do ácido cítrico.

De acordo com Wu et al (2001) a alta concentração de ácidos graxos e elevada oxidação de ácidos graxos leva ao aumento de acetil-CoA, o qual provoca fosforliação e inibição da Pi-DH.

O grupo GMS também apresentou elevada atividade tanto da β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase como da citrato sintase em relação aos demais grupos estudados, o que indica maior oxidação de ácidos graxos em detrimento a oxidação de carboidratos no fígado destes animais.

A alta atividade da citrato sintase sugere maior velocidade no ciclo do ácido cítrico e conseqüentemente maior geração de equivalentes redutores (NADH e FADH), os quais liberarão elétrons na cadeia respiratória para produção de energia (SEIVA et al., 2012).

Por outro lado, a atividade da enzima da CS esteve elevada no grupo GMS em relação aos demais grupos estudados, uma vez que pode sugerir que o glutamato monossódico adicionado à dieta elevou a capacidade oxidativa do tecido hepático destes animais (Tabela 6). Além disso, o aumento da CS provoca maior concentração de citrato, precursor lipogênico. Tal fato pode ser justificado pelas alterações que o glutamato monossódico provoca no metabolismo de lipídio, elevando as concentrações séricas de TG e Colesterol total. Desta forma, a literatura relaciona maior atividade da CS com o metabolismo oxidativo e a lipogênese (GRANLUD et al., 2011; CHUNG & DIFEE, 2012) e também com alterações no perfil lipídico sérico (ALWAHSH et al., 2014; LOPEZ-MIRANDA et al., 2015).

A administração de N-acetil-cisteína em animais submetidos ao GMS (GMS-NAC) aumentou a atividade da PFK, normalizou a LDH, Pi-DH e CS, e diminuiu a atividade da β -OHADH. Estas alterações indicam a seleção do combustível metabólico, melhorando a oxidação de carboidratos e reduzindo a taxa de oxidação de ácidos graxos no fígado destes animais.

A enzima LDH é um importante marcador do metabolismo glicolítico (GRANLUND et al. 2011, FERRIERO et al., 2018), visto que a LDH, no fígado, promove a desidrogenação do lactato, proveniente do músculo, convertendo-o em piruvato. O piruvato oriundo tanto da desidrogenase do lactato como da oxidação da glicose, passa a ser doador de acetil-CoA para biossíntese de ácido graxo e conseqüentemente de triacilgliceróis (LOPASCHUCK et al., 2010), mas sem alterar a concentração de lipídios no soro sanguíneo.

No presente estudo pode-se observar que os efeitos da administração de N-acetil-cisteína através da oxidação corporal de carboidratos e lipídios, como evidenciada pela calorimetria indireta (Tabela 6; Figura 7D), foram refletidos também no tecido hepático, pois a atividade da β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase nos animais do grupo GMS-NAC diminuiu em relação ao grupo GMS (Figura 7E). Assim pode-se evidenciar que a dose proposta de N-acetil-cisteína, no presente estudo atenuou a oxidação excessiva de ácidos graxos no tecido hepático dos animais pertencentes ao grupo GMS-NAC.

A calorimetria indireta permite evidenciar o substrato utilizado para obtenção de energia pelo organismo, refletindo notadamente sobre o metabolismo hepático (NOVELI et al., 2010, THOMASZ et al., 2018).

A normalização na atividade da CS, enzima reguladora do fluxo de metabólitos pelo ciclo do ciclo do ácido cítrico e marcadora da integridade da membrana mitocondrial nos animais do grupo GMS-NAC assegurou o metabolismo aeróbio.

Considerando que a β -OHADH está associada ao metabolismo celular aeróbico (INEICHEN et al., 2017; PEDRO et al., 2017) a redução na atividade desta enzima no grupo GMS-NAC em relação ao grupo GMS, não alterou o suprimento de energia para o tecido hepático destes animais, como pode ser observado pela manutenção da atividade da ATP sintase (Tabela 7; Figura 8C).

O estudo da atividade dos complexos enzimáticos respiratórios tais como, NADH- desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP sintase, inseridos na membrana mitocondrial interna, complementa o conhecimento sobre o metabolismo energético no fígado.

Em condições aeróbicas normais, as moléculas de acetil Coenzima A, provenientes da oxidação de ácidos graxos são metabolizadas no ciclo do ácido cítrico produzindo equivalentes redutores NADH ou FADH₂. (VOET et al., 2000).

Sabe-se que deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam a uma rápida queda na obtenção de energia, ou seja, comprometimento na síntese de ATP, o que induz aumento da produção de EROs e lesão e morte celular (ANKARCRONA et al., 1995).

No presente trabalho, observa-se que animais submetidos ao GMS apresentaram aumento tanto na NADH-DH como na Suc-DH, porém diminuição na ATP sintase. Estes resultados refletem que embora haja maior transporte de elétrons, possivelmente pelo aumento de equivalentes redutores gerados no ciclo do ácido cítrico, não foi possível elevar a produção de energia, como pode ser observado pela redução na atividade da ATP sintase.

Em oposição, pode-se observar que a administração de N-acetil-cisteína em animais submetidos ao GMS diminuiu a atividade da NADH-DH e Suc-DH em relação àqueles que não receberam apenas GMS e normalizou a ATP sintase (Tabela 7; Figuras 7A, 7B e 7C), indicando menor fluxo de elétrons na cadeia transportador de elétrons sem prejudicar a atividade da ATP sintase.

Sabe-se que o complexo respiratório NADH-DH apresenta alto grau de controle do fluxo de elétrons, sendo assim considerado componente limitante da fosforilação oxidativa, assegurando a produção de ATP pela atividade da ATP sintase (THOMASZ et al., 2018).

Alguns estudos demonstram relação entre a liberação de insulina sérica e concentração de proteínas teciduais em animais tratados com glutamato monossódico. A redução do teor de proteína no tecido adiposo de camundongos que receberam glutamato monossódico pode ter diminuído a ação da insulina e prejudicar a tolerância à glicose, uma vez que a regulação da concentração de proteínas pode estar associada com o nível basal de insulina circulante, trabalhando em um mecanismo de *feedback* negativo, por meio do qual a insulina dependente do tempo para sensibilizar seus tecidos alvo (ARAUJO et al. 2016; MIRANDA et al., 2017). Desta forma, observa-se a preservação do tecido hepático dos grupos estudados não havendo alterações na concentração de proteínas nos grupos estudados (Tabela 8, Figura 9A).

Apesar da alta oxidação hepática de ácidos graxos no fígado de animais do grupo GMS, ainda foi possível observar aumento no acúmulo de triacilgliceróis, possivelmente pelo influxo elevado de ácidos graxos para o fígado (Tabela 8; Figura 9B). Sabe-se que a alta demanda da β -oxidação pode provocar a saturação enzimática, no caso a β -OHADH, e aqueles ácidos graxos que não forem β -oxidados

serão reesterificados em triacilgliceróis e seu excesso será armazenado no tecido hepático (VOET et al., 2000).

A sobrecarga hepática de triacilglicerol ocorre quando a oxidação mitocondrial não está sendo realizada de maneira correta, o que está associado à disfunção hepática (LOPEZ-MIRANDA et al., 2015). O acúmulo de lipídios no fígado reflete desequilíbrio entre a entrada absorção e oxidação de ácidos graxos (LOPASCHUK, et al., 2010).

O acúmulo ectópico de triacilgliceróis leva a esteatose hepática, cujo processo corresponde ao primeiro estágio da doença hepática não alcoólica (ADIELS et al. 2008; NOVELLI et al. 2009). De fato, a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo é responsável por aproximadamente 60% de triacilgliceróis acumulados no fígado (DONNELLY et al., 2005).

Este depósito patológico de triacilgliceróis pode ter causado algum grau de injúria hepática, como observado por marcado aumento da atividade sérica da ALT. Liu et al. (2014); Cachon et al. (2017) demonstraram a correlação entre hepatotoxicidade e elevação na atividade da ALT em condições experimentais.

Os efeitos da administração de N-acetil-cisteína em animais que receberam o glutamato monossódico reduziu o depósito hepático de triacilgliceróis hepático em animais do grupo GMS-NAC.

Rosa et al (2018) relataram queda no acúmulo de triacilgliceróis, baixa lipotoxicidade e menor grau de dano hepático na presença de NAC. Outro possível mecanismo de ação do NAC está relacionado a sua inibição sobre lipogênese com decréscimo na atividade da enzima málica (LIU et al, 2014).

Resultados similares foram reportados por Joshi et al. (2014a); Ali et al. (2016); Falach-Malik et al. (2016) que demonstraram efeito hepatoprotetor do NAC e decréscimo no grau de esteatose hepática induzida por cloreto de mercúrio.

O balanço do conteúdo celular de glicogênio depende basicamente de dois processos metabólicos, ou seja, a glicogênese que envolve a atividade enzimática da glicogênio sintase – forma desfosforilada – e a glicogenólise que apresenta forte relação com a atividade da enzima glicogênio fosforilase – forma fosforilada (SEKAR et al., 2005). Contudo, a fosforilação e desfosforilação, destas enzimas regulatórias do metabolismo do glicogênio, dependem da presença de epinefrina, glucagon e insulina, respectivamente.

O mecanismo de deposição das moléculas de glicose é quase exclusivamente na forma de glicogênio, desde que o balanço energético de carboidratos seja positivo (Novelli et al., 2009). O aumento hepático de glicogênio dos animais pertencentes ao grupo GMS, pode ser explicado pela ingestão excessiva de glutamato monossódico, o qual promove a aceleração no apetite (Tabela 8 e Figura 9C).

O conteúdo de glicogênio em animais submetidos a ingestão de GMS tratados com NAC normalizou, sugerindo a influência do NAC sobre o metabolismo do glicogênio nestes animais. Estes resultados são compatíveis com homeostase glicêmica promovida pelo NAC.

Em modelos experimentais a elevação da liberação de ácidos graxos amplifica o metabolismo oxidativo e causa estresse oxidativo (SATAPATI et al., 2015). Os achados funcionais *in vivo* e *in vitro* confirmaram estudos nos quais as alterações mitocondriais hepáticas que incluem aumento do vazamento de elétrons ao longo da cadeia respiratória, desacoplamento da fosforilação oxidativa e anormalidades redox

com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROMESTAING et al., 2008; MORRIS et al., 2011).

Sabe-se que a lipotoxicidade indica que o acúmulo de lipídios no tecido hepático pode constituir importante alvo para a ação de radicais livres e formação de hidroperóxidos (SCHAFFER, 2003), pois as células de tecido não adiposo têm capacidade limitada para estocar lipídios e, quando esta capacidade é excedida, resulta em disfunção celular (LOPASCHUK et al., 2007).

Os animais que ingeriram dieta contendo glutamato monossódico (GMS) apresentaram o maior nível de proteína carbonila com diferença significativa quando comparada aos animais do grupo C e NAC (Tabela 9; Figura 10A).

A geração excessiva de EROs resulta em dano, não apenas à estrutura do DNA, mas também a outros componentes celulares como proteínas e lipídeos. Quanto às proteínas, alterações importantes podem ocorrer por meio da ação prejudicial das espécies reativas de oxigênio, desencadeando processos de oxidação dos aminoácidos e alterando a capacidade funcional dos mesmos, através da inativação de enzimas e formação de proteína carbonila, alterando assim o mecanismo de transdução de sinal e proteólise (UZUN et al., 2007; LOBO, PHATAK, CHANDRA, 2010).

A oxidação proteica pode ocorrer de diferentes formas e o maior produto da oxidação de proteínas é a proteína carbonila, que pode reagir com resíduos da lisina e promover a agregação proteica. As proteínas agregadas não conseguem ser degradadas pelos mecanismos normais, condição que leva à disfunção celular e desencadeamento de processos patológicos (VALKO, 2007). Da mesma maneira, a oxidação proteica leva à inativação de enzimas envolvidas no fornecimento de energia para a célula, que são participantes na produção de adenosina trifosfato

(ATP) na glicólise e no ciclo do ácido cítrico. A inativação dessas enzimas é altamente deletéria para o *status* energético da célula, induzindo disfunção celular (TRETTER; ADAM-VIZI, 2000; MALLETT et al., 2002).

Além disso, observa-se também no presente estudo, o acúmulo de lipídios decorrente da elevação na captação de lipídios pelo tecido hepático em detrimento de sua oxidação no grupo GMS (Tabela 8; Figura 9B). Lipídios acumulados no tecido hepático são passíveis de serem oxidados pelas espécies radicalares de oxigênio, promovendo a formação de lipoperóxidos e conseqüentemente o estresse oxidativo. Estes processos podem ser confirmados pela elevação da concentração de hidroperóxido de lipídios no tecido hepático de animais do grupo GMS. A literatura relata que a lipotoxicidade e alto nível de hidroperóxido de lipídio estão diretamente relacionada com o estresse oxidativo e disfunção celular e tecidual (RECTOR et al., 2008; GELLI et al., 2017).

Os animais pertencentes ao grupo que recebeu apenas o glutamato monossódico na dieta (GMS) apresentaram aumento na concentração de hidroperóxido de lipídio, indicando que o acúmulo anormal de triacilgliceróis no tecido hepático possivelmente favoreceu a lipoperoxidação.

Além disso, pode-se inferir que a alta β -oxidação de ácidos graxos, demonstrada por estes animais (GMS), pode ter contribuído para elevar a produção de EROs. As moléculas de acetil-CoA, produto final da β -oxidação, são oxidadas no ciclo do ácido cítrico e a sua entrada nesta via depende da atividade da citrato sintase. A oxidação elevada de acetil-CoA gera excesso de equivalentes redutores (NADH e FADH), as quais liberam elétrons na cadeia respiratória, o que provoca rapidamente saturação dos complexos enzimáticos e bloqueio no fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Eventualmente uma pequena fração de elétrons pode escapar dos

complexos enzimáticos I e III e reduzir parcialmente o oxigênio molecular, produzindo ânions superóxidos, que posteriormente convertem-se em peróxidos de hidrogênio, favorecendo a formação de hidroperóxido de lipídio (LEVERDE, 2007).

Os resultados apresentados mostram menor concentração hepática de hidroperóxido de lipídio em animais tratados com N-acetil-cisteína (Grupos NAC e GMS-NAC). Porém o NAC em animais submetidos ao GMS (grupo GMS-NAC) não foi suficiente para controlar a produção de proteína carbonila.

Em adição, a peroxidação lipídica é subproduto da oxidação de ácidos graxos e a depleção protetora de GSH precede a oxidação de lipídios *in vivo* (BISWAS et al., 2005).

A redução de hidroperóxido de lipídio no grupo GMS-NAC evidenciou o efeito do N-acetil-cisteína no controle de lipoperoxidação das membranas celulares hepáticas, pois nota-se que a dose proposta de NAC foi suficiente para normalizar a concentração de hidroperóxido de lipídio (Tabela 9; Figura 10B).

Os trabalhos de Mani et al. (2017) e Soliman et al. (2017) evidenciaram a administração de N-acetil-cisteína no controle de danos oxidativos em diferentes modelos animais, através do seu efeito antioxidante, o que corrobora com o presente estudo, o qual sugere a aplicabilidade para atenuar os efeitos deletérios provocados pelo glutamato monossódico.

O efeito antioxidante do NAC pode ser atribuído a capacidade de sequestrar diretamente as EROs através do radical sulfidrílica na sua estrutura química (SIVITZ & YOREK, 2010).

Por outro lado, ao considerar a fosforilação oxidativa associada ao transporte mitocondrial de elétrons, importante fonte de EROs, os quais podem induzir a lipoperoxidação, a melhora na produção de hidroperóxido de lipídio pelos animais

tratados com N-acetil-cisteína pode ser em decorrência de maior controle na oxidação de ácidos graxos e, portanto menor a probabilidade de produzir EROs na cadeia transportadora de elétrons.

Atualmente há possibilidade de trabalhar com grande número de métodos com o objetivo de determinar o estado antioxidante, desta forma, este estudo utilizou a quantificação dos compostos antioxidantes endógenos e a atividade das enzimas antioxidantes.

Nota-se na Tabela 9, que nos animais que receberam dieta acrescida de glutamato monossódico (GMS), a concentração de GSH foi reduzida, a despeito daqueles animais que foram tratados com N-acetil-cisteína, amenizando deste modo as alterações que o glutamato monossódico provoca na concentração de PC e HL no tecido hepático destes animais (Figuras 10A e 10B).

O estresse oxidativo celular também pode ser consequência da biotransformação da atividade enzimática da glutatona reduzida, substrato da glutatona peroxidase. Muitas das reações da glutatona envolvem o grupo sulfidríla (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos, com a habilidade de doar e receber elétrons, isto faz da glutatona um composto com bom estado redox (LU, 2009).

Conforme estudo realizado por Nakagawa et al. (2014) *in vitro*, a adição de N-acetil-cisteína às suspensões de hepatócitos inibiu efetivamente o dano oxidativo induzido experimentalmente, sugerindo a sua ação antioxidante. Neste sentido, o presente estudo *in vivo* evidenciou que o N-acetil-cisteína aumentou a concentração da glutatona reduzida na presença de NAC, em animais submetidos ou não ao GMS (Grupos NAC e GMS-NAC), comparativamente àqueles do grupo GMS. O NAC também pode exercer seu efeito antioxidante indiretamente após apresentar hidrólise,

fornece o aminoácido cisteína durante a formação da glutatona (RODAN & BERRY, 2017; MANI et al., 2017).

Nota-se que a glutatona, assim que foi formada tornou-se reduzida (GSH), pois não observou diferença significativa na concentração da glutatona total entre os animais dos grupos NAC, GMS e GMS-NAC.

A glutatona reduzida é substrato ou cofator de diversas enzimas protetoras, como a glutatona peroxidase (GSH-Px) e a glutatona redutase (GSH) (GIUSTARINE et al., 2003; HSU et al., 2004). O NADPH é fonte de elétrons que é catalisada pela redução da glutatona oxidase em glutatona redutase. (NOVELLI, 2005), isto se reflete em diversas situações clínicas que associam o desenvolvimento de diversas patologias com a redução de níveis de GSH, que podem resultar em uma redução do potencial redox da célula e um efeito sobre os fatores de transcrição que regulam a síntese de citocinas (EXNER et al., 2000).

Portanto, sugere-se que a suplementação com N-acetil-cisteína foi efetiva como antioxidante, melhorando o estado redox celular em animais que receberam GMS, nos quais pode observar alterações ocorridas no sistema glutatona (Figura 10C).

No estudo realizado por Bruck et al (1999), usaram o N-acetil-cisteína no tratamento da insuficiência hepática fulminante induzida por tioacetamida no modelo de rato. Entretanto, este trabalho não encontrou nenhum efeito protetor do NAC. Neste modelo, o teor total de glutatona hepática não é afetado, ou seja, não apresentou alterações na atividade enzimática de GSH-Px.

Para a remoção das EROs as células dependem de sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos, representados pela superóxido dismutase, que constitui a primeira linha de defesa contra a ação de EROs, convertendo o

radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é reduzido a H_2O pela glutathiona peroxidase e catalase. (TSUTSUI et al., 2011; BRIEGER et al., 2012).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) esteve diminuída no grupo GMS, enquanto aqueles animais que receberam GMS e tratados com N-acetil-cisteína a atividade desta enzima aumentou, porém sem atingir os valores obtidos para os animais controle (Figura 10E). Confirmando que a dose proposta de N-acetil-cisteína diminuiu os marcadores de danos celulares (Tabela 9).

Dados da literatura respaldam estes resultados. Em cultura de células hepáticas, foi observado que a administração de N-acetil-cisteína promoveu aumento da atividade da enzima SOD em torno 38% (WANG et al., 2016). Em estudos com camundongos, o N-acetil-cisteína foi eficaz no controle de danos oxidativos que pudessem acelerar a degradação da mielina, induzindo assim a hipermielinização de certos tipos de axônios, ao analisar a velocidade de condução nervosa (HICHOR et al., 2018).

No presente estudo, analisando a atividade da catalase não se observa qualquer alteração entre os grupos estudados (Tabela 9 e Figura F). Através da atividade destas enzimas (SOD e catalase) sugere que o radical superóxido não foi dismutado por completo, sendo aquele convertido em peróxido de hidrogênio, este produto não foi suficientemente reduzido em água pela catalase e assim, o radical superóxido e peróxido de hidrogênio, apresentaram importante papel na peroxidação lipídica e oxidação proteica no tecido hepático dos animais do grupo GMS.

Contudo, o estudo realizado por Wang et al. (2016) evidenciou-se aumento da atividade da enzima CAT em modelo de cultura celular com adição de N-acetil-cisteína, o que possibilita deduzir, no primeiro momento, eficácia ao controle de danos

oxidativos. Embora o objetivo da administração de N-acetil-cisteína no estudo realizado por Adikwu e Bokolo (2017) diferente do presente trabalho (*in vivo*), os autores verificaram diminuição na atividade da SOD e CAT, sugerindo a ineficácia de N-acetil-cisteína em elevar a defesa antioxidante através apenas da análise da atividade da SOD e CAT.

No presente estudo, a administração de N-acetil-cisteína em animais submetidos à dieta acrescida de glutamato monossódico (GMS-NAC), elevou a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px), em relação ao grupo GMS. Por outro lado, a administração de N-acetil-cisteína ao grupo NAC não promoveu alteração na atividade da enzima GSH-Px em relação aos animais mantidos como controle (Grupo C) (Tabela 9, Figura 10G). Corroborando com o achado, Ozaras et al (2003) identificou que em animais considerados saudáveis, a administração de N-acetil-cisteína não promoveu aumento da atividade da GSH-Px, contudo, em animais que apresentavam dano hepático, provocado pelo álcool, o N-acetil-cisteína elevou a atividade da GSH-Px.

Conforme estudo de Baykara et al. (2015) a dose proposta de N-acetil-cisteína (300mg/Kg/dia) em modelo animal apresentou efeito antioxidante no rim, com alta atividade da GSH-Px, além de atenuar a concentração de marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA) no sangue.

Neste estudo, a dieta ofertada com glutamato monossódico promoveu menor atividade da enzima GSH-Px e a dose proposta de N-acetil-cisteína induziu aumento da GSH-Px em animais do grupo GMS-NAC, o que pode ter contribuído para impedir o aumento de hidroperóxido de lipídio no tecido hepático no grupo GMS-NAC.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a dieta acrescida de glutamato monossódico induziu alterações metabólicas, com diminuição na oxidação de carboidrato em detrimento à oxidação excessiva de lipídios. Além disso, promoveu o acúmulo de triacilgliceróis e estresse oxidativo, no tecido hepático. A dose administrada de N-acetil-cisteína atenuou os efeitos deletérios impostos pelo comportamento alimentar inadequado, normalizou o metabolismo energético, manteve a homeostase da glicose e reduziu o acúmulo de triacilgliceróis no tecido hepático. Os efeitos benéficos observados pela administração de N-acetil-cisteína estiveram associados à ação protetora das defesas antioxidantes contra o estresse oxidativo no fígado.

REFERÊNCIAS

Adiels, M., Taskinen, M.R., and Boren, J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr. Diabetes Rep.* 2008; 8(1): 60–4.

Adikwu E, Bokolo B. Melatonin and N- Acetylcysteine as Remedies for Tramadol-Induced Hepatotoxicity in Albino Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin.* 2017;7(3):367-374.

Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer, H.U, editor. *Methods of enzymatic analysis* Academic. New York: Academic Press; 1974. p.673-677.

Aguirre L, PortilloMP,Hijona E, Bujanda L. Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis.*World J Gastroenterol* 2014 20:7366–7380

Ali MH, Messiha BA, Abdel-Latif HA. Protective effect of ursodeoxycholic acid, resveratrol, and N-acetylcysteine on nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Pharm. Biol.* 2016; 54(7): 1198–208.

Alwahsh SM et al. Combination of alcohol and fructose exacerbates metabolic imbalance in terms of hepatic damage, dyslipidemia, and insulin resistance in rats. *PLoS One* 2014; 9(8): 1042-20

Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis.*Hepatology.* 1999;30:1356-62.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15: 961-973.

Antunes MM, Bazotte RB. Efeitos da metformina na resistência insulínica: aspectos fisiopatológicos e mecanismos de ação farmacológica. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia.* 2015; 10(3): 105-112.

Araujo TR, Freitas IN, Vettorazzi JF, Batista TM, Santos-Silva JC, Bonfleur ML, et al. Benefits of L-alanine or L-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity. *European journal of nutrition*. 2016.

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Miranda J, Portillo MP. Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet. *Journal of physiology and biochemistry*. 2015.

Banaclocha MM, Hernandez AI, Martinez N, Ferrandiz MI. N-acetylcysteine protects against age-related increased in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain Research* 1997; 762 (1-2): 256-8.

Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* 1969;10:p.198-206.

Baykara M, Silici S, Ozcelik M, Guler O, Erdogan N, Bilgen M. In vivo nephroprotective efficacy of propolis against contrast-induced nephropathy. *Diagn Interv Radiol*. 2015;21:317–21

Belemets N, Kobylak N, Virchenko O, Falalyeyeva T, Olena T, Bodnar P, et al. Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;88:267-76.

Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage, *Curr. Pharm. Des*. 2004;10:1611–26.

Bernardes N et al. Excessive Consumption of Fructose Causes Cardiometabolic Dysfunctions Through Oxidative Stress and Inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2017; 10:1-13.

Biswas SK, Newby DE, Rahman I, Megson IL. Depressed glutathione synthesis preceds oxidative stress and atherogenesis in Apo-E(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005;338:1368-73.

Blisgh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extration and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1959;37(8): p.911-7

Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM Romijn J.A. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 35: p.644-49.

Bordenave, S, Metz L, Flavier L, Raynaud E, Brun JF, Merciel J. Training –induced improvement in lipid oxiadation in type e diabetes mellitus is related to alternations in muscle mitochondrial activity. Effect of endure training in type e diabetes. *Diabetes e Metabolism.* 2008; (34): 162-8.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659.

Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, et al. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Journal of hepatology.* 1999;31(1):27-38.

Brun JF, Jean E, Ghanassia E, Flavier S, Mercier J. Metabolic training: new paradigms of exercise training for metabolic diseases with exercise calorimetry targeting individuals. *Annales de Réadaptation et de Médecine Physique.* 2007; (50):528-34.

Cachon AU, Quintal-Novelo C, Medina-Escobedo G, Castro-Aguilar G, Moo-Puc RE. Hepatoprotective effect of low doses of caffeine on CCl₄- induced liver damage in rats. *J. Diet. Suppl.* 2017;2: 158–172.

Cao H, Gerhold K, Mayers JR et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 2008; 134: 933–944

Cardoso AR, Costa JVC, Kowaltowski V. Effects of a high fat on liver mitochondria: increased ATP-sensitive K⁺ channel activity and reactive oxygen species generation. *J Bioenerg Biomembr* 2010;42: p. 245-53.

Cassard-Doulicier AM & Perlemuter G. Inflammation hépatique liée à l'obésité (NASH). *Médecine et nutrition. Cahiers de nutrition et de diététique*. 2011.

Cesaretti MLR, Kohlmann OJ. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006: 190-7.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1592-609.

Chen O, Vasquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 38: p.6027-31.

Chen YD, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM. Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM? *Diabetes Care*. 1995. (18):10-6.

Chen, Z.H., Yoshida, Y., Saito, Y., Sekine, A., Noguchi, N., Niki, E. Induction of Adaptive Response and Enhancement of PC12 Cell Tolerance by 7-Hydroxycholesterol and 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 through Up-regulation of Cellular Glutathione via Different Mechanisms. *J Biol Chem*. 2006. 19;281(20):14440-5.

Cheung O, Sanyal AJ. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease* 2008; 28: p.351-59.

Chung E, Diffie GM. Moderate vs. high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *J Gerontol a Biol Sci Med Sci*. 2012; (11):1178-87.

Collison KS, Maqbool ZM, Inglis AL, Makhoul NJ, Saleh SM, Bakheet RH, et al. Effect of dietary monosodium glutamate on HFCS-induced hepatic steatosis: expression profiles in the liver and visceral fat. *Obesity*. 2010;18(6):1122-34.

Collison KS, Zaidi MZ, Saleh SM, Mondreal R, Makhoul NJ, Milgram NW, Mohanna FA. Effect of trans-fat, fructose and monosodium glutamate feeding on feline weight gain, adiposity sensitivity, adipokine and lipid profile. *British Journal of Nutrition* 2011;106:p 218-26.

Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2000; 279(4): E875-85.

Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* 2009;13: p.545-63.

Delany JP, West DB. Changes in body composition conjugated linoleic acid. *J Am Cell Nutr*. 2000; (19):487-93.

Della Corte C, Mosca A, Majo F, Lucidi V, Panera N, Giglioni E, et al. Non-alcoholic fatty pancreas disease and Non-alcoholic fatty liver disease: more than ectopic fat. *Clinical endocrinology*. 2015.

Depre C, Ponchaut S, Deprez J, Maisin L, Hue L. Cyclic AMP suppresses the inhibition of glycolysis by alternative oxidizable substrates in the heart. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(2):390-397.

Didoné EC, Cerski CT, Kalil AN. N-acetylcysteine decreases hepatic congestion in the ischemia-reperfusion injury: experimental study. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 2002; 29(4): 191-6.

DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, Price P, Davis R, Safirstein R. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1997; 272(3): F292-8.

Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FRF, Almeida FQA, Galhardi CM, Novelli, JLVB, et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *International Journal of Cardiology*. 2008; (124):92-9.

Dolnikoff M, Martin-Hidalgo A, Machado U F, Lima F B, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:426–33.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoprotein in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest*. 2005; 115: 1343–51.

El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;126(2):460-8.

Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem* 1995; 232: p. 243-8

Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. Therapeutil potential of Glutathione. *Wien Klin Wochenschr*. 2000;14:610-6

Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients* (2015); 7(6): 4995-5019.

Falach-Malik A, Rozenfeld H, Chetboun M, Rozenberg K, Elyasiyan U, Sampson SR, Rosenzweig T. N-acetyl-L-cysteine inhibits the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in diabetes-prone mice. *Am. J. Transl. Res.* 2016; 8: 3744–56.

Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006; 25, 251-259.

Fawcett JK, Scoth JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 1960;13:p.156-9.

Federico A, Dallio M, Godos J, Loguercio C, Salomone F. Targeting gut-liver axis for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: translational and clinical evidence. *Transl Res* 2016; 167:116–24.

Feijo, S. G. et al. The spectrum of non alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: prevalence and associate risk factors. *Acta Cir. Bras.* 2013; 28,

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira* 1997; 43(1): 61-8.

Ferreira CS, Piccoli FC, Pereira Filho GA et al. Efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre o estresse oxidativo no modelo experimental de cirrose. *Revista de Iniciação-periodicos.ulbra.br.* 2016; (1): 5 -9

Ferriero R, Nusco E, De Cegli R, Carissimo A, Manco G, Brunetti-Pierri N. Pyruvate dehydrogenase complex and lactate dehydrogenase are targets for therapy of acute liver failure. *Journal of Hepatology.* 2018;69(2):325-335.

Fischer J, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RCA, Janssen AJM. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta* 1985;153:p.23-36.

Fishbein MH, Miner M, Mogren C, Chalekson J. The spectrum of fatty liver in obese children and the relationship of serum aminotransferases to severity of steatosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36:54-61. 35.

Freemantle N, Holmes J, Hockey A. How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes? *Int J Clin Pract* 2008;62: 1391-6.

Furuya DT, Poletto AC, Favaro RR, Martins JO, Zorn TM, Machado UF: Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. *Metabolism.* 2010, 59: 395-99.

Gelli C, Tarocchi M, Abenavoli L, Di Renzo L, Galli A, De Lorenzo A. Effect of a counseling-supported treatment with the Mediterranean diet and physical activity on the severity of the non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology.* 2017;23(17):3150-3162.

Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milazani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:1365-72.

González, FHD. Laboratório de análises clínicas veterinárias. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

Gray L, MacDonald C. "Morbid Obesity in Disasters: Bringing the "Conspicuously Invisible" into Focus." *Int J Environ Res Public Health* 2016; 13(10). 788–93.

Guimaraes RB, Telles MM, Coelho VB et al. Adrenalectomy abolishes the food-induced hypothalamic serotonin release in both normal and monosodium glutamate-obese rats. *Brain Res Bull* 2002; 58: 363–369.

Halliwell B, Gutheridge JM. Free radicals antioxidants and human disease. Whew are we now? *J Lb Clin Med* 1993; 119:p. 598-620.

Haque M, Mirshahi F, Campbell SC, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman VA. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with hepatocyte mitochondrial DNA depletion. *Hepatology* 2002;38: p. 404-10.

Hermanussen M, García AP, Sunder M, Voigt M, Salazar V, Tresguerres JAF. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60, 25–31.

Hichor M, Sundaram VK, Eid SA, et al. Liver X Receptor exerts a protective effect against the oxidative stress in the peripheral nerve. *Scientific Reports*. 2018;8:2524.

Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev* 2006; 27: p.750-61.

Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:671-4.

Holloway CJ, Dass S, Suttie J, Rider OJ, Cox P, Cochlin LE, et al. Exercise training in dilated cardiomyopathy improves rest and stress cardiac function without changes in cardiac high energy phosphate metabolism. *Heart*. 2012; (98):1083-1090.

Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chen CH, Shih KC. COX-2- mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity* 2009; 17: 1150-57.

Hsu CC, Yen HF, Yin MC, Tsai, CM, Hsieh CH. Five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/cA mice. *Journal of Nutrition*, v. 134, 2004; 3245-49.

hydroxycholesterol and 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 through up-regulation of cellular glutathione via different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 14440–5.

Ibrahim MA, Buhari GO, Aliyu AB, Yunusa I, Bisalla M. Amelioration of monosodium glutamate-induced hepatotoxicity by vitamin C. *European Journal of Scientific Research* 2011;60: 159-65.

Ineichen BV et al. Direct, long-term intrathecal application of therapeutics to the rodent CNS. *Nat. Protoc.* 2017; 12, 104–131.

Jain SK. L-cysteine supplementation as an adjuvant therapy for type-2 diabetes. *Canadian Journal of Pharmacology* 2012; 90: p.1061-64.

Jiang ZY, Woolard ACS, Wolf SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe⁺² in the of xylene orange. *Lipids* 1991;24:p.861-9.

Joshi D, Kumar MD, Kumar AS, Sangeeta S. Reversal of methylmercury-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and DNA damage by the treatment of N-acetyl cysteine: a protective approach. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2014; 33: 167-82

Joshi D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav AK, Srivastav SK. N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: a histopathological approach. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2014a; 28: 218–226.

Junqueira PHT, Meneghin PV, Da Silva A, Vieira AF, Silva SL, Do Vale Baracho NC. Desenvolvimento e Caracterização de um Modelo Experimental de Obesidade por Injeção Subcutânea de Glutamato Monossódico em Ratos/Development and

Characterization of an Experimental Model of Obesity by Subcutaneous Injection of Monosodium Glutamate in Rats. *Revista ciências em saúde* 2011; 1(3): 22-32.

Kaga AK, Barbanera PO, do Carmo NOL, Rosa LR de O, Fernandes AAH. Effect of N-Acetylcysteine on Dyslipidemia and Carbohydrate Metabolism in STZ-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Vascular Medicine*. 2018;2018:6428630.

Kaga AK. Efeito do tratamento de N-acetilcisteína sobre o metabolismo energético e estresse oxidativo no miocárdio de ratos diabéticos. 2017.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; 1(1):15–25

Kenawy AM, Osman HEH, Daghestani MH. The effect vitamin C administration on monosodium induced liver injury. An experimental study. *Experimental and Toxicology Pathology* 2012; 25:p.345-68.

Kobyliak N, Falalyeyeva T, Bodnar P, Beregova T. Probiotics Supplemented with Omega-3 Fatty Acids are More Effective for Hepatic Steatosis Reduction in an Animal Model of Obesity. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017;9:123–30.

Krautbauer S, Eisinger K, Neumeier M, Hader Y, Buettner R, Schmid PM et al., Free fatty acids, lipopolysaccharide and IL-1 α induce adipocyte manganese superoxide dismutase which is increased in visceral adipose tissues of obese rodents, *PLoS One* 9 2014.

Krest, L; Glodek, J.; Keusgen, M. Cysteine sulfoxides and Alliinase activity of *Allium* species. *J Agric Food Chem* 2000; 48: p. 3753-60.

Kumar P, Bhandari U. Fenugreek Seed Extract Prevents Fat Deposition in Monosodium Glutamate (MSG)-Obese Rats. *Drug Research* 2015; (66):4 174-80.

Labayen I, Forga I, Martinez JA. Nutrient oxidation and metabolic rate as affected by containing different proportions of carbohydrate and fat, in healthy young women. *Eur J Nutr.* 1999; (38):158-66.

Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D. & Parks, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2014: 146, 726–35.

Law K, Brunt, EM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2010;14, p.591-604.

Lazarin MO et al. Liver mitochondrial function and redox status in an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease induced by monosodium L-glutamate in rats. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(3): 687-94.

Leverve XM. Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med,* 2007;35:p.S454-S-60.

Libby P. Fat fuels the flame: triglyceride-rich lipoproteins and arterial inflammation. *Circ Res.* 2007; 100: 299-301.

LIMA, W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.). *Clinical Nutrition.* 2005; 24 (6): 1019-28.

Lin CC, Yin MC, Hsu CC, Lin MP. Effect of five cysteine-containing compounds on three lipogenic enzymes in Balb/cA mice consuming a high saturated fat diet. *Lipids* 2004; 39: p.843-8.

LIRA F.S. et al. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumorbearing rats. *Hormone and Metabolic Research.* 2010; 42 (13): 944-49.

LIRA F.S. et al. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumorbearing rats. *Hormone and Metabolic Research.* 2010;. 42(13): 944-49.

Lissner I, Heitmann BL. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49:p.79-90.

Liu F, Lin Y, Li Z, Ma X, Han Q, Liu Y., et al. Glutathione transferase a1 (gsta1) release, an early indicator of acute hepatic injury in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2014;71: 225–30.

Lobo V, Phatak A, Chandra N. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Review.* 2010; 4(8):118-26.

Lomonaco, R. et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2012; 55, 1389–97.

Loomba R, Abraham M, Unalp A, Wilson L, Lavine J, Doo E, et al. Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology.* 2012;56(3):943-51.

Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Cir Res* 2007; 101: 335–47.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 2010; (90):207-58.

Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by different methods. *Clin. Chem.* 1977;23(5): p.882-4.

Lopez-Miranda, V., et al. Effects of chronic dietary exposure to monosodium glutamate on feeding behavior, adiposity, gastrointestinal motility, and cardiovascular function in healthy adult rats. *Neurogastroenterol Motil* 2015; 27(11): 1559-70.

Lopez-Velazquez, J. A. et al. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann. Hepatol.* 2014. 13, 166–178.

Lu SC, "Regulation of glutathione synthesis," *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30: (1-2): 42–59.

Lyall MJ, Cartier J, Thomson JP, et al. Modelling non-alcoholic fatty liver disease in human hepatocyte-like cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018;373(1750):20170362. doi:10.1098/rstb.2017.0362.

Macho L, Fickova M, Jezova D, Zorad S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiological Research* 2000; 49: p.579-85.

Maheswari E, Saraswathy GR, Santhranii T. Hepatoprotective and antioxidant activity of N-acetyl cysteine in carbamazepine-administered rats. *Indian journal of pharmacology*. 2014;46(2):211-5

Mallet RT et al. Pyruvate restores contractile function and antioxidant defenses of hydrogen peroxide-challenged myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2002;34:1173-84.

Mani A, Staikou C, Karmaniolou I, Orfanos N, Mylonas A, Nomikos T, et al. N-Acetylcysteine and Desferoxamine Reduce Pulmonary Oxidative Stress Caused by Hemorrhagic Shock in a Porcine Model. *Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2017; 30(1):33-40

Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AI. High fat diet induces deregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J* 2009;417:p. 183-93.

Manton DN, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AJ, Couper RT. Nonalcoholic steatohepatitis in children and adolescents. *Med J Aust*. 2000;173:476-9

Masic U, Yeomans MR. Does monosodium glutamate interact with macronutrient composition to influence subsequent appetite? *Physiol Behav* 2013; 116–117:23–9.

Matyskova R, Maletinska L, Maixnerova J. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRT mice. *Physiol Res* 2008; 57: 727-34.

McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2002;34:255-62

McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *NewsPhysiol Sci* 2004;19:1–6.

Melanson EL, Sharp TA, Seagle HM, Donahoo WT, Grunwald GK, Peters JC. Resistance training and aerobic exercise have similar effects on 24-h nutrient oxidation. *Med Sci Sports Exerc.* 2002; (34):1793-800.

Mincis M, Minicis R. Doença hepática alcoólica. *Rev Bras Med* 2005;62: 427-33.

Miquel J, Ferrandiz MI, De Juan E, Sevilla I, Martinez M. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. *European Journal of Pharmacology* 1995; 292: 333-5.

Miranda RA, da Silva Franco CC, de Oliveira JC, Barella LF, Tofolo LP, Ribeiro TA, et al. Cross-fostering reduces obesity induced by early exposure to monosodium glutamate in male rats. *Endocrine.* 2017;55(1):101-12.

Miskowiak B, Partika, M. Effects of neonatal treatment with MSG (Monosodium glutamate) on hypothalamo-pituitary-thyroid axis in adult male rats. *Histol. Histopathol.*1993; 8(4), 731-4,

Moldeus PI, Cotgreave A, Margareta B. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50.(1): 31-42.

Moosmann B, Behl C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs.*2002;11: p. 1407–35.

Morris EM, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;15: 485–504.

Moura RA. *Técnicas de Laboratório*, 2a ed. Atheneu Editora, São Paulo, 1982.

Mourão DM, Monteiro JBR, Hermsdorff HHM, Teixeira MCL. Alimentos modificados e suas implicações no metabolismo energético. *Ver Nutr.* 2005; (18):19-28.

Nagakannan P, Shivasharan BD, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Restoration of brain antioxidant status by hydroalcoholic extract of *Mimusops elengi* flowers in rats treated with monosodium glutamate. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2012;31(3):213–21.

Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, Aburada M, Miyamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim.* 2006; 55(2), 109-115.

Nagoor Meeran MF, Stanely Mainzen Prince P, Hidhayath Basha R. Preventive effects of N-acetyl cysteine on lipids, lipoproteins and myocardial infarct size in isoproterenol induced myocardial infarcted rats: an in vivo and in vitro study. *European journal of pharmacology.* 2012;677(1-3):116-22.

Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D. Effects of N-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Archives of toxicology.* 2014;88(1):115-26.

Nakamura H, Kawamata Y, Kuwahara T, Smriga M, Sakai R. Longterm ingestion of monosodium L-glutamate did not induce obesity, dyslipidemia or insulin resistance: a two-generation study in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2013; 59: 129–35.

Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. *Biochem Biophys Acta* 1974; 358:p.251-61.

Nemeth PM, et al. Metabolic response to a high-fat diet in neonatal and adult rat muscle. *Am J Physiol.* 1992;262:C282-C286.

Novelli ELB, Santos PP, Assalin HB, Souza G, Rocha K, Ebaid GX, Seiva FRF, Mani F, Fernandes AAH. N-acetylcysteine in high-sucrose diet-induced obesity: Energy expenditure and metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacological Research*, 2009; 59. 74-9

Novelli ELB, Souza GA, Ebaid GMX, Rocha KKHR, Seiva FRF, Mani F. Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease. *Obesity*. 2010; (18):1754-61.

Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1971; 30: 75-90.

Oni, E. T. et al. Relation of physical activity to prevalence of nonalcoholic Fatty liver disease independent of cardiometabolic risk. *Am. J. Cardiol.* 2015; 115, 34–39.

Ozaras R, Tahan V, Aydin S, Uzun H, Kaya S, Senturk H. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats. *World journal of gastroenterology*. 2003;9(4):791-4.

Paslmquist DL, Mattos WRS. Metabolismo de lipídeos. In: Berchielli TT, Pires VA, Oliveira SG. (Eds.) *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. p.287-309.

Patton HM, Sirlin C, Behling C, Middleton M, Schwimmer JB, Lavine JE. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a critical appraisal of current data and implications for future research. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43:413-27

Paul MV, Abhilash M, Varghese MV, Alex M, Nair RH. Protective effects of alpha-tocopherol against oxidative stress related to nephrotoxicity by monosodium glutamate in rats. *Toxicol Mech Methods.* 2012;22(8):625–30.

Pedro OB, Klinsmann CS, Camila B, Angélica HFA. Aerobical Physical Activities Improve Quality of Cardiac Health in an Animal Model: Parameters of Calorimetry, Profile Lipids and Oxidative Stress. *Biochem Physiol.* 2017; 6: 219-26.

Pereira B et al. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidases activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenomedullated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998;31:p.827-33.

Perez CM, Delhoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin C, Castellano G. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: p. 999-1007.

Pessayre D, Fromenty B. A mitochondrial disease. *J. Hepatol* 2005;42:p.928-40.

Pietilainen KH, Korkeila M, Bol LH, Westerterp KR, Ykijarvinen H, Kaprio J. Inaccuracies in food and physical activity diaries of obese subjects: complementary evidence from doubly labeled water and co-twin assessments. *Int J Obes.* 2010; (34):437-45.

Poirier P, Mawhinney S, Grondin L. Prior meal enhances the plasma glucose lowering effect of exercise in type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; (33):1259-64.

Poussin C, Ibberson M, Hall D, Ding J, Soto J, Abel ED, Thorens B. Oxidative phosphorylation flexibility in the liver of mice resistant to high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Diabetes* 2011;60: 2216-24.

Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment consideration. *Chemical Science* 2008;115: p.141-50.

Pullman M, Penefsky HS, Datta A, Racker E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphate. *Journal of Biology Chemistry* 1960;235:p.3322-29.

Quines CB, Chagas PM, Hartmann D, Carvalho NR, Soares FA, Nogueira CW. (p-CIPhSe)₂ Reduces Hepatotoxicity Induced by Monosodium Glutamate by Improving Mitochondrial Function in Rats *Journal of Cellular Biochemistry* 2017 118(9): 2877-86

Ramesh B, Pugalendi KV. Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. *Yale J. Biol Med* 2005; 78:p.131-138.

Rana JS, Nieuwdorp M, Jukema JW, Kastelein JJ. Cardiovascular metabolic syndrome- an interplay of obesity inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 2007;9: p.218-32.

Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease nad the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol.* 2008; (14): 185-92.

Remke H, Wilsdorf A, Muller F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp. Pathol* 1988;33(4):p.223-32.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology* 1994;233: 357-63.

Ribeiro EB, Marmo MR, Andrade IS, Dolnikoff MS. Effect of fasting on monosodium glutamate-obese rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1989; 22(7):p.917-21.

Ribeiro G, Roehrs M, Bairros A, Moro A, Charão M et al N-acetylcysteine on oxidative damage in diabetic rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 2011; 34(4): 467–74.

Riquelme, A. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its association with obesity, insulin resistance and increased serum levels of C-reactive protein in Hispanics Liver Int; 2009; 29, 82–88.

Rodan LH, Berry GT. N-Acetylcysteine Therapy in an Infant with Transaldolase Deficiency Is Well Tolerated and Associated with Normalization of Alpha Fetoprotein Levels. JIMD reports. 2017;31:73-7

Roden, M. Mechanisms of disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes—pathogenesis and clinical relevance. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 2006; 2:335–48.

Roehrig K, Allred JB. Direct enzymatic for the determination of liver glycogen. Analytical and flavoids after oral and intravenous administration. Free Radic Biol Med 1974;27:p.278-86.

Romestaing, C. et al. Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2008; 294, E110–E119.

Rosa LRO; Kaga AK; Barbanera PO; Queiroz PM; Carmo NOL; Fernandes AAH. Beneficial effects of N-acetylcysteine on hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2018; 96: 412–18.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. Comprehensive Physiology, 2014;4 (1): 177-97.

Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. Pharmacol Ther 2014; 141(2): p. 150–9.

Sasaki, Y., et al (2011). "Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome." *Eur J Pharmacol* 662(1-3): 1-8.

Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in liver disease*. 2015;35(3):221-35.

Satapati, S. et al. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J. Clin. Invest.* 2015; 125, 4447–62.

Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:281-7.

Schuppan D, Gorrell MD, Kle NT. The challenge of developing novel pharmacological therapies for non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2010;30: 795-808.

Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25:p.192-205.

Seiva FR, Chuffa LGA, Braga CP, Amorim JPA, Fernandes A.H. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50 (10):p. 3556-61

Shapiro BH, Pampori NA, Ram PA, Waxman DJ. Irreversible suppression of growth-dependent cytochrome P450 2C11 in adult rats neonatally treated with monosodium glutamate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993;265(2);979-84.

Sheela CG, Kumud K, August KT. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Medica* 1995;61: p. 356-7.

Shimomura T, Wakabayashi I. Inverse associations between light-to-moderate alcohol intake and lipid-related indices in patients with diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2013; 12: 104.

Shivasharan BD, Nagakannan P, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Protective Effect of *Calendula officinalis* L. Flowers Against Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress and Excitotoxic Brain Damage in Rats. *Indian J Clin Biochem.* 2013;28(3):292–8.

Singer TP. Determination of the activity of succinate, NAD, choline and alpha-glycerolphosphate dehydrogenase. *Methods of Biochemical Analysis.* 1984;32:p.123-75.

Singh K, Ahluwalia P. Effect of monosodium glutamate on lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in cardiac tissue of alcoholic adult mice male. *Journal of Cardiovascular Disease Research* 2012;3:p. 12-8.

Sit M, Yilmaz EE, Tosun M, Aktas G. Effects of N-acetyl cysteine on lipid levels and on leukocyte and platelet count in rats after splenectomy. *Nigerian journal of clinical practice.* 2014;17(3):343-5.

Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010; 12 (4):537-577.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, coloric restriction and aging. *Science* 1996; 273: p. 59-63.

Soliman AM. Extract of *Coelatura aegyptiaca*, a freshwater clam, ameliorates hepatic oxidative stress induced by monosodium glutamate in rats. *African Journal of Pharmacy and Phamacology* 2011; 5:p. 398-408.

Soliman NA, Zineldeen DH, Katary MA, Ali DA. N-acetylcysteine a possible protector against indomethacin-induced peptic ulcer: crosstalk between antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic mechanisms. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2017;95(4):396-403.

Soloni FG. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. *Clinical Chemistry* 1971;17(6): p.531-4.

Soria A, Alessandro ED, Lombardo YB. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol.* 2001; (91): 2109-16.

Sozio MS, Liangpunsakul S, Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Seminars in liver disease* 2010; 30:p378-90.

Strohl KP, Thomas AJ, Jean P S, Schlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rat strains. *Journal of Applied Physiology* 1997; 82(1): 317-23.

Tawfik MS, Al-Badr N. Adverse Effects of Monosodium Glutamate on Liver and Kidney Functions in Adult Rats and Potential Protective Effect of Vitamins C and E. *Food Nutr Sci.* 2012;3(5):651-9

Teodorak BP, Scaini G, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Teixeira LJ, Rebelo J, et al. Antioxidants reverse the changes in energy metabolism of rat brain after chronic administration of L.-tyrosine. *Metabolic brain disease.* 2017;32(2):557-64.

Thomasz L, Oglio R, Salvarredi L, Perona M, Rossich L, Copelli S, et al. Regulation of NADPH oxidase NOX4 by delta iodolactone (IL-delta) in thyroid cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology.* 2018;470:115-26

Tietz, A. Studies on the biosynthesis of diglycerides and triglycerides in cell free preparations of the fat body of the locust *Locusta migratoria*. *Israel journal of medical sciences* 1969;5(5): 1007.

Tilg H, Moschen AR, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2017;14: 32–42 .

Tordoff MG, Aleman TR, Murphy MC. No effects of monosodium glutamate consumption on the body weight or composition of adult rats and mice. *Physiol Behav* 2012; 107: 338–45.

Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *Journal of Neuroscience*. 2000;20:8972-79.

Tsuduki T et al. High dietary cholesterol intake during lactation promotes development of fatty liver in offspring of mice. *Mol Nutr Food Res* 2016, 60(5): 1110-17.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2011; (301):2181-2190.

Ugur Calis, I., et al. "The Effects of Monosodium Glutamate and Tannic Acid on Adult Rats." *Iran Red Crescent Med J* 2016;18(10): e37912.

Uzun, H. et al. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and obesity after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. *Surgery*. 2007;17 (10): 1367-73.

Vaisy M, Szlufcik K, Bock K, et al. Exercise-induced, but not creatine-induced, decrease in intramyocellular lipid content improves insulin sensitivity in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2011; (22):1178-85.

Valastyan S, Thakur V, Johnson A, Kumar K, Mamor D. Novel transcriptional activities of vitamin E: inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochemistry*. 2008; (47):744-52.

Valko M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39:44-84.

Vankoningsloo S, Piens M, Lecocq C, Gilson A, Pauw A, Renars P. Mitochondrial dysfunction induces triglycerides accumulation in 3T3-L1 cells; role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *J Lipid Res* 2005; 46:p.1133-49.

Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowshki AJ, Oliveira HCF. Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. *Life* 2007;59: p.263-8.

Verhasselt V. et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. *J Immunol.*1999;162:p. 2569–74.

Vinodini NA, Nayanatara AK, Ramaswamy C, Ranade AV, Kini RD, Gowda KM, Ahamed B, Bhat SR. Study on evaluation of monosodium glutamate induced oxidative damage on renal tissue on adult Wistar rats. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2010;5:p. 144-7.

Voet D, Voet JG, Pratt C. *Fundamentos de Bioquímica*. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

Wang Y, Gao H, Na X-L, et al. Aniline Induces Oxidative Stress and Apoptosis of Primary Cultured Hepatocytes. Tchounwou PB, ed. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016;13(12):1188. doi:10.3390/ijerph13121188.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1796–1808.

Weise CM et al. "The obese brain as a heritable phenotype: a combined morphometry and twin study." *Int J Obes (Lond)* 2017;41(3): 458-466.

Wilkinson JH. *Introducción al diagnóstico enzimático*. 3ª. ed. Buenos Aries: Ediciones Toray, 1965. 310p.

Woods A, Garvican-Lewis L, Lundy B, Rice A, Thompson K. New approaches to determine fatigue in elite athletes during intensified training: Resting metabolic rate and pacing profile. PLoS ONE. 2017;12(3):e0173807. Pmid :28296943

World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight: Fact sheet No. 311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (updated June 2016, 4 July 2016, date last accessed).

Wu P, Peters JM, Harris RA. Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Biochem Biophys Res Commun; 2001; 287: 391–396.

Xiao G, Zhang T, Yu S, Lee S, Calabuig-Navarro V, et al. ATF4 deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. J Biol Chem 2013; 288: 25350–61.

Yamazaki RK, Brito GAP, Coelho I, Pequitto DCT, Yamaguchi AA, Borghetti G, Schiessel DL. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. Lipids in Health and Disease 2011.

Zar JH. Biostatistical Analysis. Prentice – Hall New Jersey. 718p, 1996.

Ziauddeen H, Farooqi IS, Fletcher PC. Obesity and the brain: how convincing is the addiction model? Nat Rev Neurosci 2012; 13: 279–86.

ANEXO


Anexo 1: Certificado nº 704 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 704-CEUA, sobre “Estudo do efeito do N-acetil-cisteína através do metabolismo energético, complexos respiratórios e estresse oxidativo no tecido hepático de ratos submetidos ao glutamato monossódico”, sob a responsabilidade de **Ana Angélica Henrique Fernandes**, está de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 19 de março de 2015.


Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Serviço Técnico Acadêmico
Diário de Notícias - Rua 14 8815 3714 - Botucatu SP Brasil
Tel 14 3893 0051 Fax 14 3815 3714 e-mail: sctad@fca.unesp.br

Atestamos para os devidos fins que, para o Protocolo nº 704 sob responsabilidade de Ana Angélica Henrique Fernandes, foi aprovada a utilização de 40 ratos Wistar machos.

Botucatu, 19 de março de 2015.


Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
(Instituto de Biociências - Unesp-Botucatu)