

SILVANA MARTINS CAPARROZ-ASSEF

**EFEITOS DA CICLOFOSFAMIDA,
INDOMETACINA E DEXAMETASONA SOBRE AS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS HEPÁTICAS
CAUSADAS PELA ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE**

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO - 2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Silvana Martins Caparroz-Assef

**EFEITOS DA CICLOFOSFAMIDA,
INDOMETACINA E DEXAMETASONA SOBRE AS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS HEPÁTICAS
CAUSADAS PELA ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Maringá, área
de concentração em Biologia Celular,
para obtenção do grau de Doutor.**

Orientadora: Dr^a. Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Co-orientadora: Dr^a. Ciomar Aparecida Bersani-Amado

**Maringá
2006**

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Abdo, minha grande conquista.

Ao meu filho João Victor, minha grande obra.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e meu maior companheiro em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, que com amor e dedicação me conduziram pela vida concedendo-me tantas oportunidades.

À Dr^a Emy, pela orientação firme, segura e competente, ao mesmo tempo compreensiva e amiga.

À Dr^a Ciomar, co-orientadora, mestra, e antes de tudo amiga, que compartilha comigo momentos importantes. Suas lições me orientam desde o início de minha carreira científica e certamente o farão pelo resto de minha vida.

Ao técnico Jaílson Araújo Dantas, amigo e meu braço direito nos experimentos da ciência.

Às amigas Célia Regina, Maria Angélica e Silmara pela amizade, apoio e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Oxidações Biológicas e Metabolismo Hepático, funcionários, professores, pós-graduandos e bolsistas, que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Farmácia e Farmacologia pela colaboração e oportunidade.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, a tese foi redigida na forma de dois artigos conforme segue:

1. Silvana M. Caparroz-Assef, Ciomar A. Bersani-Amado, Ana M. Kelmer-Bracht, Adelar Bracht e Emy L. Ishii-Iwamoto. Efeitos da indometacina e da ciclofosfamida sobre as alterações metabólicas de fígados de animais artríticos.
2. Silvana M. Caparroz-Assef, Ciomar A. Bersani-Amado, Ana M. Kelmer-Bracht, Adelar Bracht and Emy L. Ishii-Iwamoto. The metabolic changes caused by dexamethasone in the adjuvant-induced arthritic rat.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A artrite induzida por adjuvante é um modelo experimental de poliartrite amplamente utilizado para avaliação de drogas anti-inflamatórias e anti-reumáticas, por apresentar muitas das características clínicas da artrite reumatóide humana. Estudos prévios realizados em fígados de rato em perfusão isolada revelaram que os ratos com artrite induzida por adjuvante apresentam uma série de alterações metabólicas. Os mecanismos implicados nessas alterações hepáticas não são, entretanto, conhecidos. Em contraste com numerosos estudos sobre os benefícios causados por esteróides, anti-inflamatórios não-esteróides ou drogas modificadoras da doença sobre os danos nas articulações e nas manifestações inflamatórias sistêmicas, poucos estudos têm sido realizados no sentido de avaliar se as drogas também normalizam as modificações metabólicas causadas pela doença. Além disso, algumas drogas como os glicocorticóides, exercem também alterações metabólicas sistêmicas. O estudo das alterações metabólicas de ratos artríticos tratados com drogas que atuam através de diferentes mecanismos pode auxiliar no entendimento dos mecanismos implicados nas alterações hepáticas. Além disso, a comparação com os efeitos das mesmas drogas em ratos normais permite discriminar aquelas alterações específicas induzidas pelas drogas daquelas causadas pela artrite.

OBJETIVOS: Levando em conta todas as considerações feitas acima, este trabalho teve como objetivo comparar as ações de três drogas — a indometacina, um anti-inflamatório não-esteróide que inibe as atividades das ciclooxigenases; a ciclofosfamida, um agente imunossupressor que é citotóxico para as células T, e a dexametasona, um agente imunossupressor que inibe a produção de citocinas — sobre vários parâmetros metabólicos em fígados em perfusão isolada e verificar se existe alguma correlação com as manifestações clínicas locais e sistêmicas da artrite, bem como com parâmetros metabólicos de animais *in vivo* (dexametasona).

MÉTODOS: Ratos machos da linhagem Holtzman, pesando entre 170-200 g e alimentados com uma dieta padrão de laboratório foram utilizados. A artrite por adjuvante foi induzida por uma injeção intradérmica de 100 µl da suspensão do adjuvante completo de Freund (*M. tuberculosis* inativadas pelo calor) suspensa em óleo mineral a uma concentração de 0,5% (p/v) na pata posterior esquerda. A indometacina (1,5 mg/kg de peso corporal), a ciclofosfamida (10 mg/kg de peso corporal) ou a

dexametasona (0,2 mg/kg de peso corporal) foram administradas por via oral em dose única diária de acordo com protocolos específicos. A evolução da artrite foi acompanhada até o 22º dia após a injeção do adjuvante completo de Freund (ACF). Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais; (a) ratos normais; (b) ratos artríticos; (c) ratos normais tratados com as drogas; (d) ratos artríticos tratados com as drogas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: gliconeogênese, ureagênese, consumo de oxigênio, liberação de L-lactato, piruvato e amônia a partir de L-alanina em fígados de rato em perfusão; ganho de peso corpóreo; níveis plasmáticos de glicose, insulina e algumas enzimas marcadoras. Os sinais clássicos da inflamação na artrite, quais sejam, o edema das patas e o aparecimento de lesões secundárias foram também monitorados.

Os experimentos de perfusão foram feitos 14 dias após a injeção do adjuvante. O fígado isolado foi perfundido no modo não-recirculante. O líquido de perfusão foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) saturado com uma mistura de O₂ e CO₂ (95:5) através de um oxigenador de membrana e simultaneamente aquecido a 37°C. Os procedimentos cirúrgicos de canulação e isolamento foram feitos sob anestesia de pentobarbital (50 mg/kg de peso corporal). A L-alanina (2,5 mM) foi dissolvida no fluido de perfusão. Os seguintes compostos foram medidos através de procedimentos enzimáticos padronizados: glicose, L-lactato, piruvato, uréia e amônia. A concentração de oxigênio no perfusado efluente foi monitorada por polarografia, através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de prata/cloreto.

O desenvolvimento da artrite induzida por adjuvante foi avaliado pelas variações dos volumes das patas e pelo aparecimento de lesões secundárias. O volume das patas injetadas e não-injetadas foi determinado por pletismografia. As lesões secundárias foram avaliadas pelos seguintes eventos: aparecimento de nódulos na cauda; aparecimento de nódulos em uma ou ambas as orelhas e formação de edema em uma ou ambas as patas dianteiras.

Para as medidas dos níveis plasmáticos de enzimas, de glicose e de insulina, amostras de sangue de animais foram colhidas da veia cava inferior com uma seringa contendo heparina, no 14º dia após a injeção do adjuvante. As atividades da fosfatase alcalina (FALC), da gama-glutamil transpeptidase (γ -GT), das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e a concentração de glicose foram estimadas através de kits analíticos específicos. A insulina foi medida por técnica de radioimunoensaio.

RESULTADOS: Os principais resultados foram os seguintes:

1) A ciclofosfamida e a dexametasona foram muito efetivas em suprimir o desenvolvimento da artrite induzida por adjuvante, como indicado pela ausência da formação de edema nas patas e do aparecimento de lesões secundárias. A indometacina reduziu parcialmente as respostas inflamatórias nas patas, mas não suprimiu o aparecimento das lesões secundárias.

2) O tratamento com as três drogas não trouxe benefícios no ganho de peso corporal dos ratos artríticos. Por outro lado, a perda de peso dos animais artríticos tratados com a dexametasona foi mais acentuada do que aquela dos ratos artríticos não-tratados ou dos ratos normais tratados com a dexametasona, indicando efeitos negativos aditivos.

3) Os fígados de animais artríticos tratados com a ciclofosfamida não apresentaram alterações no metabolismo da L-alanina. O tratamento com a indometacina exerceu somente benefícios parciais sobre a atividade ureagênica dos fígados. Os fígados de ratos artríticos tratados com dexametasona, por outro lado, apresentaram alterações metabólicas adicionais e diferentes. As velocidades iniciais de liberação de glicose e de consumo de oxigênio na ausência de substratos exógenos estavam aumentadas tanto na condição alimentada quanto na de jejum. O metabolismo da L-alanina foi mais ativo do que em ratos artríticos não-tratados, mas houve um desvio do fluxo de carbono da glicose para a produção de L-lactato e piruvato. O estímulo da mobilização de glicogênio causado pelo glucagon foi também mais acentuado em ratos tratados com a dexametasona.

4) Foram observados altos níveis de glicose e de insulina no plasma de ratos artríticos após a administração de dexametasona.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES: Os dados permitiram as seguintes conclusões:

1) A supressão das anormalidades do metabolismo de L-alanina de fígados de ratos artríticos pelo tratamento com a ciclofosfamida sugere que as alterações metabólicas hepáticas são também uma consequência da resposta imunológica mediada pelas células T.

2) Os produtos das ciclooxigenases provavelmente não são os principais mediadores implicados nas modificações metabólicas hepáticas, pois o tratamento com a indometacina não foi capaz de suprimir totalmente as anormalidades metabólicas em fígados de ratos artríticos.

3) A administração de dexametasona causou resistência à insulina em ratos artríticos como indicado pelo nível plasmático elevado de glicose e de insulina. Entretanto, nossos dados não estão de acordo com um decréscimo na responsividade do metabolismo de glicose à insulina, porque foram encontrados altos níveis de glicogênio mesmo na condição de jejum.

4) Houve uma clara prevalência dos efeitos metabólicos da dexametasona sobre os efeitos induzidos pela artrite. Entretanto, os efeitos periféricos da dexametasona incluindo um fornecimento aumentado de aminoácidos para o fígado e os níveis elevados da insulina plasmática, possivelmente são mais importantes no controle *in vivo* do metabolismo hepático do que os seus efeitos diretos sobre o órgão.

5) A exacerbação da perda de peso corporal dos ratos artríticos causada pelo tratamento com a dexametasona não apóia a sugestão de que as citocinas TNF- α e/ou interleucinas-1 β sejam os principais mediadores implicados na perda de peso corporal na artrite, visto que dexametasona inibe a produção de ambas as citocinas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Adjuvant-induced arthritis is an experimental model of polyarthritis, which is widely used for evaluation of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs, because it presents many of the clinical characteristics of human rheumatoid arthritis. Previous studies with the isolated perfused rat liver reveal that adjuvant-induced arthritic rats present several metabolic alterations. However, the mechanisms implicated in these liver metabolic changes are not known. In contrast to numerous studies about the beneficial effects of steroids, nonsteroidal anti-inflammatories or disease-modifying drugs on joints damage and on systemic inflammatory manifestation, there have been only few investigations aiming to evaluate whether drugs also normalize the metabolic changes induced by the arthritis disease. In addition, some drugs such as glucocorticoids exert also systemic metabolic alterations. The study of the metabolic alterations of arthritic rats treated with drugs which act through different mechanisms can help in the understanding of the mechanisms implicated in the liver metabolic changes. In addition, comparison with the effects of the same drugs in normal rats allows to differentiate the specific alterations induced by the drugs from those ones caused by the arthritis disease.

AIMS: Taken all these considerations in account, the aim of the present work was to compare the effects of three drugs — indomethacin, a nonsteroidal anti-inflammatory agent which inhibits cyclooxygenase activity; cyclophosphamide, an immunosuppressive agent which is cytotoxic to T cells, and dexamethasone, an immunosuppressive agent which inhibits cytokines production — on several metabolic parameters in isolated perfused livers from adjuvant-induced arthritic rats and to verify if there is any correlation with the local and the systemic inflammatory manifestations of the arthritis disease as well as with the *in vivo* metabolic parameters (dexamethasone).

METHODS: Male Holtzman rats, weighing 170-200 g, fed with a standard laboratory diet were utilized. Adjuvant arthritis was induced by an intradermal injection of 100 μ l of a suspension of Freund's adjuvant (heat inactivated *M. tuberculosis*) suspended in mineral oil at a concentration of 0.5% (w/v) into the left hind paw. Indomethacin (1.5 mg kg body weight⁻¹), cyclophosphamide (10 mg kg body weight⁻¹) and dexamethasone (0.2 mg kg body weight⁻¹) were administered orally once daily according to specific protocols. Rats were divided into four groups: (a) Normal rats; (b)

arthritic rats; (c) normal rats treated with drugs; (d) arthritic rats treated with drugs. The following parameters were measured: gluconeogenesis, ureogenesis, oxygen consumption, L-lactate, pyruvate and ammonia production from L-alanine in isolated perfused livers; the body weight gain; plasmatic levels of glucose, insulin and some enzyme markers. The classic signs of inflammation, namely paws edema and secondary lesions appearance were also monitored.

The perfusion experiments were done 14 days after adjuvant injection. The isolated liver was perfused in the non-recirculating system. The perfusion fluid was Krebs/Henseleit-bicarbonate buffer (pH 7.4) saturated with a mixture of O₂ and CO₂ (95:5) by means of a membrane oxygenator and simultaneously heated to 37°C. The surgical procedures of isolation and cannulation were done under pentobarbital anesthesia. L-Alanine (2.5 mM) was dissolved in the perfusion fluid. The following compounds were assayed in the effluent perfusion fluid by means of standard enzymatic procedures: glucose, L-lactate, pyruvate, urea and ammonia. The oxygen concentration in the outflowing perfusate was monitored continuously, employing a teflon-shielded platinum electrode.

The severity of adjuvant-induced arthritis was assessed by paw volume changes and by secondary lesions appearance. The volume of the injected and non-injected hind paws was determined by plethysmography. The secondary lesions were evaluated by the following events: appearance of nodules in the tail; appearance of nodules in one or both ears and appearance of swelling in one or both forelimbs.

For the measurements of enzyme activities and glucose and insulin plasma concentrations, blood samples were taken from the inferior vena cava with a heparine-containing syringe, on day 14 post-adjuvant injection. The activities of alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) transaminases (aspartate aminotransferase-AST and alanine aminotransferase-ALT) and the glucose concentration in plasma were estimated by using specific analytical kits. Insulin was measured by a radioimmunoassay technique.

RESULTS: The main results were the following:

1) Cyclophosphamide and dexamethasone were very effective in suppressing the development of Freund's adjuvant-induced arthritis, as indicated by the absence of paws edemas and secondary lesions. Indomethacin did not suppress the appearance of secondary lesions and reduced only partially the inflammatory responses in the paws.

2) The treatment with the three drugs did not induce any benefits on the body weight gain of arthritic rats. On the other hand, the body weight loss of the arthritic rats treated with dexamethasone was more accentuated than that of untreated arthritic or normal rats treated with dexamethasone, indicating additive harmful effects.

3) The livers from cyclophosphamide-treated arthritic rats did not present alterations in L-alanine metabolism. Indomethacin treatment exerted only partial benefits on the ureogenic capacities of the livers. The perfused livers from dexamethasone-treated arthritic rats, on the other hand, presented additional and different metabolic alterations. Initial basal rates of glucose release and oxygen uptake in the absence of L-alanine were increased in both fed and fasted conditions. The L-alanine metabolism was faster than in untreated arthritic rats, but there was a diversion of carbon flux from glucose to L-lactate and pyruvate. Stimulation of glycogen mobilization by glucagon was more accentuated in dexamethasone-treated rats.

4) High levels of plasma glucose and insulin were observed in arthritic rats after dexamethasone administration.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: The data allow the following conclusions:

1) The suppression of L-alanine metabolism abnormalities by cyclophosphamide treatment suggests that the arthritis-induced hepatic metabolic alterations are also consequence of T cell mediated- immune responses.

2) The ciclooxigenases (COXs) products seem not to be the major mediators implicated in the hepatic metabolic alteration, because indomethacin treatment was not effective in suppressing the L-alanine metabolism abnormalities in livers from arthritic rats.

3) Dexamethasone administration caused insulin resistance in arthritic rats as indicated by the high levels of plasma glucose and insulin. However, our data were not in accordance with a decrease in the responsiveness of the liver glucose metabolism to insulin, because high content of hepatic glycogen was found even in the fasted condition.

4) There was a clear prevalence of the effects of dexamethasone on liver metabolism over those ones induced by the arthritis disease. However, the peripheral effects of dexamethasone, including increased aminoacids supply to the liver and the high plasma insulin levels seem to be more important in controlling the hepatic metabolism in vivo than its direct effects on the organ.

5) The finding that the body weight loss of dexamethasone-treated rats was more accentuated than that of untreated arthritic rats did not agree with the suggestion that the cytokines TNF- α and/or interleukin-1 β play a major role in the body weight loss in the arthritis disease, because it is known that dexamethasone inhibits the production of both cytokines.

**Efeitos da indometacina e da
ciclofosfamida sobre as alterações
metabólicas de fígados de animais
artríticos**

Silvana M. Caparroz-Assef, Ciomar A. Bersani-Amado, Ana M. Kelmer-Bracht,
Adelar Bracht e Emy L. Ishii-Iwamoto

*Laboratório de Metabolismo Hepático e de Oxidações Biológicas, Departamento de
Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, 87.020-900 Maringá, Brasil*

Autor para correspondência:

Emy L. Ishii-Iwamoto

Departamento de Bioquímica

Universidade de Maringá

E-mail: eliiwamoto@uem.br

Fax: 55-44-3261-4896

87.020-900 Maringá, Brasil

Resumo

Os efeitos da administração da droga imunossupressora ciclofosfamida e do anti-inflamatório não-esteroidal indometacina sobre as alterações metabólicas de fígados de ratos artríticos foram avaliados. O objetivo foi obter informações sobre os mecanismos implicados nas alterações hepáticas induzidas pela artrite. A artrite foi induzida em ratos pela injeção do adjuvante completo de Freund (ACF). Os ratos artríticos foram tratados com indometacina por via oral na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal desde o dia da injeção do ACF até o 18º dia. A ciclofosfamida foi administrada por via oral na dose de 10 mg/kg de peso corporal, desde o 4º dia da injeção do ACF até o 10º dia. A evolução da artrite foi acompanhada até o 22º dia após a injeção do ACF por medidas da formação de edema nas patas, do aparecimento de lesões secundárias, do perfil hematológico e do peso de órgãos imunocompetentes. Vias metabólicas hepáticas foram avaliadas em fígados em perfusão isolada de animais normais ou artríticos, tratados ou não com a indometacina e a ciclofosfamida. Foram avaliadas a gliconeogênese, a ureagênese, a produção de L-lactato, piruvato e amônia e o consumo de oxigênio a partir da infusão de L-alanina. A ciclofosfamida foi capaz de suprimir as manifestações inflamatórias sistêmicas da artrite induzida por adjuvante (AIA) e ao mesmo tempo impediu que as alterações hepáticas características da AIA se manifestassem. O tratamento com a indometacina, por outro lado, bloqueou apenas parcialmente a inflamação local e sistêmica das patas, mas não suprimiu o aparecimento das lesões secundárias. Os fluxos metabólicos decorrentes do metabolismo da L-alanina em fígados foram também apenas parcialmente normalizados pela indometacina. Em conclusão, os resultados indicaram que as alterações metabólicas hepáticas são também uma consequência da resposta celular imunológica à injeção do ACF e que outros mediadores, além dos produtos pro-inflamatórios das ciclooxigenases estão implicados nessas alterações metabólicas.

Introdução

A artrite induzida por adjuvante (AIA) se desenvolve após a injeção do adjuvante completo de Freund em ratos (Billingham, 1983). É uma doença sistêmica que compromete as articulações e alguns órgãos, sendo caracterizada pela sua evolução crônica. A AIA tem sido um modelo experimental amplamente estudado por possuir muitas semelhanças com a artrite reumatóide humana (AR) em termos de histopatologia e respostas a drogas anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Pearson, 1956). Embora a etiologia da AIA não seja totalmente conhecida, estudos indicam que os linfócitos T, macrófagos e células sinoviais proliferantes desempenham os principais papéis no desenvolvimento e manutenção da doença (Konttinen et al., 1981; Taurog, 1984; Bersani Amado et al., 1990). O fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas (IL-1 e IL-6) e as prostaglandinas têm sido apontadas como os principais mediadores da patogênese da AR por modular a migração de células, a ativação de células T e B, a destruição das cartilagens e a proliferação sinovial (Firestein et al., 1990; Anderson et al., 1996; Choy e Panayi, 2001; Simon et al., 2001).

O tratamento farmacológico da artrite reumatóide envolve usualmente a utilização de corticosteróides, anti-inflamatórios não-esteróides e drogas anti-reumáticas modificadoras da doença, sintéticas ou naturais (O'Dell, 2004). Essas drogas atuam por diferentes mecanismos e embora existam vários estudos demonstrando os benefícios que promovem na redução dos sintomas clínicos da doença, nem todas as alterações associadas à doença são corrigidas pelas diferentes drogas, incluindo a perda de peso corporal (Bendele et al., 1999; 2000).

Estudos realizados utilizando fígados em perfusão isolada revelaram que a artrite induzida por adjuvante induz uma série de modificações em vias metabólicas como a gliconeogênese (Caparroz-Assef et al., 1998; Fedatto-Júnior et al, 1999), a síntese de glicogênio (Fedatto-Júnior et al, 2002), a glicólise (Fedatto-Júnior et al, 2000), a ureagênese (Yassuda et al., 2003) e respostas a hormônios como o glucagon (Fedatto-Júnior et al, 2000). O significado fisiológico bem como os mediadores envolvidos nessas modificações hepáticas não são conhecidos. Existem evidências de que as citocinas (TNF- α e IL-1 β) estão implicadas, em parte, nessas alterações. Isto foi sugerido em um estudo prévio no qual uma redução na capacidade gliconeogênica de fígados de animais normais foi observada, após a infusão endovenosa de ambas as citocinas (dados não publicados).

O modelo da artrite induzida por adjuvante permite avaliar alguns parâmetros da resposta inflamatória, bem como da resposta imunológica. Um estudo comparativo entre animais artríticos tratados com drogas que interferem mais especificamente sobre a resposta inflamatória ou a resposta imunológica pode auxiliar no entendimento dos mecanismos implicados nas alterações hepáticas. Assim, a proposta deste estudo foi comparar parâmetros inflamatórios (edema das patas), imunológicos (peso de órgãos imunocompetentes como o baço, timo e linfonodos e aparecimento de lesões secundárias) e metabólicos (peso corporal e alterações hepáticas) de animais artríticos tratados com a indometacina, um anti-inflamatório não-esteróide, ou com a droga imunossupressora ciclofosfamida.

Materiais e métodos

Materiais

A L-alanina, a indometacina (Ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metil-1H-indol-3-acético), a ciclofosfamida (N,N-Bis(2-cloroetil)tetra-hidro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-amino 2-óxido monohidrato), as coenzimas NAD⁺ e NADH e a enzima L-lactato desidrogenase foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.). Os demais reagentes utilizados foram os de melhor pureza disponível.

Animais

Ratos machos albinos da linhagem Holtzman, pesando entre 200-220 g e alimentados *ad libitum* com uma dieta padrão (Nuvilab[®], São Paulo, Brasil) foram utilizados neste estudo. Para a indução da artrite os animais receberam injeção intradérmica de 0,1 ml da suspensão de adjuvante completo de Freund (ACF) em uma das patas posteriores. A evolução ponderal dos animais de todos os grupos experimentais foi acompanhada diariamente por um período de 22 dias a contar do dia da injeção do ACF. Para medidas dos pesos dos linfonodos, do timo e do baço, grupos experimentais de animais foram sacrificados no 14º dia após a injeção do ACF.

Preparo da suspensão de adjuvante completo de Freund (ACF)

Para o preparo da suspensão de adjuvante completo de Freund, uma amostra de

50 mg de uma preparação de *M. tuberculosis* mortas e secas foram trituradas em gral de porcelana durante 20 minutos. A seguir foi acrescentado 10,0 ml de óleo mineral, lentamente, mantendo-se a trituração. Uma emulsão de água em óleo foi obtida pela adição lenta de 1,0 ml de água destilada. A suspensão foi considerada satisfatória quando uma gota do preparado, colocada sobre a água, não se desfez, mantendo contornos circulares nítidos (Gardner, 1992).

Tratamento dos animais

Ratos normais e artríticos foram tratados com indometacina e ciclofosfamida por via oral. A indometacina foi dissolvida em solução de TRIS (tris [hidróxi-metil]aminometano) 1,0 M, pH 8,6, imediatamente antes do uso, e administrada diariamente na dose de 1,5mg/kg de peso corporal desde o dia da injeção do ACF até o 18º dia após a injeção. A ciclofosfamida foi dissolvida em NaCl 0,9%, imediatamente antes do uso, e administrada diariamente na dose de 10mg/kg de peso corporal a partir do 4º dia após a injeção do ACF até o 10º dia. Os protocolos e as doses utilizadas foram baseados em estudos anteriores sobre as propriedades anti-artríticas da ciclofosfamida e da indometacina (Walz et al., 1971; Mackenzie et al., 1978; Yamaguchi et al., 1989; Gaffney and Scott, 1998; Bendele et al., 1999).

Avaliação da resposta inflamatória induzida pelo ACF

O desenvolvimento da artrite induzida pelo ACF nos animais tratados e não-tratados foi avaliado pelo aumento do volume das patas posteriores (injetada e não-injetada) e pelo aparecimento de lesões secundárias. O volume de cada pata até a articulação tíbio-társica foi medido por pletismografia conforme a técnica de Winder et al. (1957), ligeiramente modificada. As medidas foram realizadas em intervalos regulares por um período de até 22 dias. O resultado foi expresso em termos de aumento do volume da pata em relação ao seu volume inicial. As lesões secundárias foram avaliadas através do sistema de graduação numérica proposto por Rosenthale (1970). Foram atribuídos pontos para cada um dos seguintes eventos: aparecimento de nódulos na cauda (+1); aparecimento de nódulos em uma ou ambas as orelhas (+1 ou +2) e aumento de volume de uma ou ambas as patas anteriores (+1 ou +2). A gravidade das lesões foi graduada de 0 a 5, o valor 0 indicando ausência de lesão.

Perfusão do fígado

Os experimentos de perfusão foram realizados com 6 grupos experimentais de animais: 1, normal; 2, artrítico; 3, normal tratado com indometacina; 4, normal tratado com ciclofosfamida; 5, artrítico tratado com indometacina e 6, artrítico tratado com ciclofosfamida. Os experimentos foram realizados no 14º dia após a injeção do adjuvante e após ter mantido os animais em jejum prévio de 24 horas. Para a remoção cirúrgica do fígado, os ratos foram anestesiados com injeções intraperitoneais de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal). A técnica de perfusão utilizada foi aquela descrita por Scholz and Bücher (1965). Após canulação das veias porta e cava o fígado foi retirado e posicionado em uma câmara de acrílico. O fluxo foi mantido constante por meio de uma bomba peristáltica (30-35 ml/min). O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), saturado com mistura carbogênica (O₂:CO₂ ∴ 95:5%) por meio de um oxigenador de membrana, com ajuste simultâneo da temperatura (37°C). A L-alanina (2,5 mM) foi infundida e amostras do perfusado efluente foram colhidas em intervalos de 2 ou 4 minutos. A concentração venosa de oxigênio foi medida polarograficamente através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de prata/cloreto (Kelmer-Bracht et al., 1984). As variações na concentração venosa de oxigênio foram registradas e as velocidades de consumo foram calculadas das diferenças artério-venosas e da velocidade total do fluxo através do órgão e foram referidos ao peso úmido do fígado.

Analítica

Os seguintes compostos foram medidos no fluido de perfusão efluente através de métodos enzimáticos: glicose (Bergmeyer e Bernt, 1974); L-lactato (Gutman e Wahlefeld, 1974); piruvato (Czok e Lamprecht, 1974); uréia (Bergmeyer, 1974) e amônia (Kun e Kearney, 1974). Os fluxos metabólicos foram calculados das diferenças artério-venosas e da velocidade total do fluxo através do órgão e foram referidos ao peso úmido do fígado.

Análise estatística dos dados

A significância estatística das diferenças entre os diversos parâmetros nos diferentes grupos experimentais foi avaliada através do teste t de Student. As diferenças entre as médias de um mesmo parâmetro no mesmo grupo experimental (exemplo,

ganho de peso corpóreo em função de tempo) foram avaliadas pela análise de variância (medidas repetidas), sendo as diferenças significativas entre as médias identificadas pelo teste de Newman-Keuls. As diferenças entre um mesmo parâmetro medido em diferentes grupos experimentais foram avaliadas pela análise de variância, sendo as diferenças significativas entre os grupos identificadas pelo teste de Newman-Keuls. Os resultados estão mencionados como valores de probabilidade, adotando $p < 0,05$ como critério de significância. As análises estatísticas foram feitas através dos programas Statistica e GraphPad Prism. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM).

Resultados

Efeitos da administração de indometacina e de ciclofosfamida no desenvolvimento da artrite induzida por adjuvante completo de Freund (AIA). A evolução da artrite induzida por adjuvante foi acompanhada por um período de 22 dias após a injeção do ACF. Respostas típicas foram observadas após a injeção do ACF: uma fase de inflamação aguda caracterizada pela formação de edema na pata injetada, e que está presente até o 10º dia após a injeção do adjuvante (Fig. 1A). A partir deste dia, uma fase de inflamação sistêmica foi instalada, revelada pelo acentuado aumento do volume da pata injetada e pelo aparecimento de edema na pata contralateral não-injetada (Fig. 1B), bem como de lesões secundárias (Fig. 1C). A administração concomitante de indometacina na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal reduziu a intensidade do edema nas patas injetada ($p < 0,001$) e contralateral ($p = 0,0148$) quando comparada com animais artríticos não-tratados. No 14º dia, por exemplo, houve uma redução de 49,5% ($p = 0,0009$) e de 58,8 % ($p = 0,0159$) no edema das patas injetada e contralateral, respectivamente. A indometacina não foi efetiva, entretanto, em bloquear o aparecimento das lesões secundárias ($p = 0,809$). A administração da ciclofosfamida bloqueou totalmente a inflamação sistêmica revelada pela ausência de edema na pata contralateral (Fig. 1B, $p = 0,0011$), bem como de lesões secundárias (Fig. 1C, $p < 0,001$).

Efeitos da administração de indometacina e de ciclofosfamida nos pesos dos linfonodos e órgãos imunocompetentes. Como ilustrado na Figura 2, a artrite induzida por adjuvante aumentou em 6,35 e 5,85 vezes os pesos dos linfonodos poplíteos e inguinais, respectivamente. Houve também um aumento do peso do baço (+181%), mas uma redução de 45% no peso do timo. A administração de indometacina reverteu apenas parcialmente as modificações causadas pela AIA sobre os pesos dos linfonodos poplíteos e inguinais e do baço, os quais foram 21%, 34% e 44% menores que os valores obtidos nos animais artríticos, respectivamente. A indometacina foi eficaz, por sua vez, em bloquear totalmente a involução tímica induzida pela AIA. A ciclofosfamida reverteu com mais eficiência o aumento induzido pela AIA nos pesos dos linfonodos. Houve uma redução de 65,7 e 62,6% nos pesos dos linfonodos poplíteos e inguinais, respectivamente, quando comparados com os valores dos animais artríticos. O incremento no peso do baço induzido pela AIA foi totalmente suprimido pelo tratamento com ciclofosfamida. Um valor similar ao peso do baço de animais normais foi encontrado. Já o peso do timo foi reduzido para valores menores do que os obtidos em animais artríticos, indicando uma exacerbação da involução tímica.

Efeitos da administração de indometacina e de ciclofosfamida no ganho de peso de animais artríticos. A Figura 3 mostra que os animais normais ganharam peso gradativamente durante o período experimental estudado. O incremento no 22º dia foi de 32% ($p < 0,001$) em relação ao peso médio inicial dos animais. O ganho de peso dos animais artríticos foi menor do que o dos animais normais até o 8º dia, a partir do qual não houve mais ganho adicional de peso, ocorrendo uma perda gradativa até o 16º dia. No final do período experimental (22º dia), o peso médio dos animais artríticos não diferiu do seu peso médio inicial, mas foi 27% menor do que o peso médio dos animais normais ($p < 0,001$). Tanto a indometacina quanto a ciclofosfamida não foram capazes de restaurar o ganho de peso dos animais artríticos para valores semelhantes aos dos animais normais em todas as fases da evolução da doença. Houve apenas uma atenuação da perda de peso observada na fase sistêmica da doença (10º ao 22º dias). No 14º dia, os pesos médios dos animais artríticos tratados com indometacina e ciclofosfamida foram 10,9% ($p = 0,0134$) e 10,62% ($p < 0,0002$) maiores do que o dos animais artríticos, respectivamente. Entretanto, se comparados com os animais normais os valores foram 13,5% ($p = 0,0006$) e 13,75% ($p < 0,0001$) menores, respectivamente.

Efeitos da administração da indometacina sobre os fluxos metabólicos decorrentes da infusão de L-alanina em fígados de animais normais ou artríticos. A Figura 4 mostra os resultados dos experimentos realizados com fígados de animais no 14º dia após a injeção do adjuvante. Os fígados foram perfundidos inicialmente na ausência de substratos exógenos e a partir do 10º minuto após o início da coleta das amostras, a L-alanina 2,5 mM foi infundida. Antes da infusão de L-alanina, a produção de glicose, L-lactato, piruvato, amônia ou uréia foi mínima em função dos baixos níveis de substratos endógenos (glicogênio e aminoácidos livres). Nestas condições, o consumo de oxigênio basal é essencialmente devido à oxidação de ácidos graxos endógenos (Kimmig et al., 1983). Confirmando observações prévias de Yassuda Filho et al. (2003), o consumo de oxigênio de fígados de animais artríticos, na ausência de substratos exógenos, foi menor do que o de fígados de animais normais (Fig. 4B). Os fígados de animais artríticos apresentaram várias modificações nos fluxos dos metabólitos gerados a partir da L-alanina, confirmando também observações anteriores (Yassuda Filho et al., 2003). As principais foram: menor consumo de oxigênio (Fig. 4B); menor produção de glicose (Fig. 4A), L-lactato (Fig. 4C), piruvato (Fig. 4D) e uréia (Fig. 4E), mas produção elevada de amônia (Fig. 4F). A tabela 01 foi construída para facilitar a comparação entre as séries experimentais. Os dados representam as quantidades totais médias dos metabólitos gerados durante a infusão da L-alanina, calculadas através das áreas sobre as curvas de tempo, após subtração dos valores encontrados antes da infusão da L-alanina. Foram também calculadas as quantidades totais de metabólitos de carbono liberados em unidades de três carbonos (C_3), como sendo a soma de ($2 \times$ glicose produzida) + L-lactato + piruvato liberados. A quantidade de metabólitos nitrogenados foi também calculada em unidade de um nitrogênio (N_1) como sendo a soma de ($2 \times$ uréia produzida) + amônia liberada. Os dados revelam que nos animais artríticos houve um decréscimo similar nas unidades de C_3 e N_1 . Houve, entretanto, uma modificação na proporção de unidades de nitrogênio que foram liberadas como uréia (redução) ou amônia (aumento). A administração da indometacina não foi efetiva em suprimir completamente os efeitos negativos da artrite induzida pelo ACF sobre a produção de glicose (Fig. 4A), mas houve um aumento na produção de L-lactato e piruvato, os quais alcançaram valores similares aos de animais normais (Figs. 4C e D). Assim, a produção total de metabólitos C_3 foi superior ao dos animais artríticos, mas inferior ao dos animais normais por conta da baixa produção de glicose (tabela 01). Esses efeitos não

foram decorrentes de ações diretas da indometacina, já que a indometacina não promoveu efeitos significativos sobre a produção de glicose, L-lactato e piruvato quando administrada em animais normais. A produção de unidades de N_1 foi também aumentada para valores similares ao dos animais normais. Entretanto, não houve uma supressão completa dos efeitos induzidos pela artrite, porque a produção de amônia continuou ainda muito acima da condição normal, mesmo tendo a indometacina exercido um efeito inibitório direto sobre a produção da amônia, conforme revelado nos experimentos realizados em animais normais (Fig. 4F). A indometacina também não atenuou o efeito inibitório da artrite sobre o consumo extra de oxigênio devido ao metabolismo da L-alanina, pois os valores permaneceram abaixo dos valores medidos nos fígados de animais normais (Fig. 4B).

Efeitos da administração da ciclofosfamida sobre os fluxos metabólicos decorrentes da infusão de L-alanina em fígados de animais normais ou artríticos. A Figura 5 compara os resultados dos experimentos realizados em fígados de animais normais e artríticos tratados ou não com ciclofosfamida. Os dados dos animais normais e artríticos são os mesmos mostrados na Figura 4. O tratamento com ciclofosfamida foi efetivo em suprimir os efeitos negativos da artrite induzida pelo ACF sobre a metabolização da L-alanina, conforme revelam os gráficos das Figuras 5 A a F e os dados da tabela 01. A capacidade gliconeogênica dos fígados de animais artríticos tratados com a ciclofosfamida foi superior se comparada com a de fígados de animais artríticos não tratados. A produção total de glicose se apresentou um pouco inferior à dos animais normais, provavelmente devido ao efeito inibitório direto da ciclofosfamida sobre a mesma, conforme revelada pela redução observada em animais normais tratados (tabela 01). As modificações causadas pela artrite nos outros parâmetros avaliados, inibição na produção de L-lactato, piruvato e uréia, bem como no consumo extra de oxigênio e aumento na produção de amônia, não mais se manifestaram nos animais tratados com a ciclofosfamida. De fato, como demonstrado na tabela 01, os valores obtidos em fígados de animais artríticos tratados com ciclofosfamida foram muito similares aos obtidos em fígados de animais normais. A ciclofosfamida, por outro lado, não modificou nenhum desses parâmetros quando administrada em animais normais, indicando que a droga não exerceu nenhum outro efeito direto a não ser a redução na produção de glicose.

Discussão

O presente trabalho revelou uma correlação entre o bloqueio da inflamação sistêmica (edema das patas e lesões secundárias) e das alterações nos pesos dos órgãos imunocompetentes pela ciclofosfamida e o bloqueio virtualmente completo das alterações metabólicas hepáticas induzidas pelo ACF. Por outro lado, não foi encontrada uma correlação simples entre os mesmos parâmetros nos animais artríticos tratados com a indometacina. A indometacina foi capaz de bloquear somente parcialmente a inflamação local e sistêmica, mas não foi eficaz em bloquear o aparecimento das lesões secundárias. A indometacina foi também pouco efetiva em reverter as alterações causadas pela AIA sobre os pesos dos linfonodos e do baço, embora tenha evitado a involução tímica causada pela AIA. As alterações hepáticas também não foram totalmente suprimidas pela indometacina. Deve-se enfatizar que as doses de indometacina, bem como de ciclofosfamida utilizadas neste trabalho foram doses supra-efetivas (Walz et al., 1971; Mackenzie et al., 1978; Yamaguchi et al., 1989; Gaffney e Scott, 1998; Bendele et al., 1999).

Tem sido demonstrado que a ciclofosfamida, na artrite reumatóide, suprime as funções das células Th, reduzindo o número de células T e B ativas (Berenbaum e Brown, 1963; Turk, 1973; Gaffney e Scott, 1998). O fato da ciclofosfamida ter bloqueado o aparecimento das alterações hepáticas indicam que essas alterações são também uma consequência da resposta imunológica na AIA. É reconhecido que há envolvimento das células T e B e macrófagos no desenvolvimento e manutenção da artrite induzida por adjuvante (Kontinen et al., 1981; Taurog, 1984; Bersani Amado et al., 1990). Acredita-se que diferentemente da inflamação na pata injetada, considerada uma inflamação não-imune (resposta primária), as reações secundárias como a inflamação na pata contralateral e o aparecimento de lesões secundárias (resposta secundária) são imunologicamente mediadas por uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia mediada por linfócitos T (Cohen, 1991). As alterações hepáticas estariam enquadradas dentre as reações secundárias já que se manifestaram na mesma fase. O fato dos animais tratados com ciclofosfamida não terem adquirido peso como os animais normais, mesmo com a supressão total das manifestações inflamatórias sistêmicas da artrite, pode estar relacionado com os efeitos citotóxicos da droga como indicado pela redução no peso do timo verificado neste estudo.

Tem sido demonstrado que vários mediadores liberados pelas células do sistema imune estão envolvidos na patogênese da artrite, entre eles as citocinas (IL-1 e TNF- α), interferon- γ e as prostaglandinas (Brennan et al., 1992; Silva et al., 2000; Choy e Panavy, 2001). A expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) tem sido relatada em tecidos sinoviais de pacientes com AR e em modelos animais como a artrite por adjuvante (Sano et al., 1992). Foi também demonstrado que diferentemente do nível da COX-2 mRNA, o nível de COX-1 mRNA não é modificado na AIA (Anderson et al., 1996). A indometacina é um inibidor clássico da síntese de prostaglandinas, por atuar tanto sobre a COX-1 como sobre a COX-2. Este efeito deve ter sido responsável pelo bloqueio da resposta inflamatória local e sistêmica observado em animais artríticos tratados com a indometacina. Entretanto, o fato da inflamação ter sido bloqueada apenas parcialmente, somada à observação de que a indometacina não foi efetiva em suprimir o aparecimento de lesões secundárias e nem de bloquear o aparecimento das alterações hepáticas características da AIA, sugere que outros mediadores, além dos produtos das COXs, devem estar envolvidos nessas respostas ao ACF.

Deve-se destacar, por outro lado, que estudos recentes sugerem que os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) regulam também a resposta inflamatória por mecanismos que podem ser independentes da inibição das COXs. Foram relatados que os AINEs suprimem a proliferação e a diferenciação de células linfóides, a produção de anticorpos antígeno-específicos e a resposta imune de linfócitos Th (Seng et al., 1990; Franch et al., 1994; Yamaki et al., 2003). Uma ação inibitória sobre a transcrição de fatores como o fator nuclear- κ B (NF- κ B) ou a proteína ativadora-1 (AP-1) tem sido considerada como um outro mecanismo de ação da indometacina (Lavagno et al., 2004). Uma super expressão do NF- κ B tem sido observado na sinóvia inflamada de humanos e animais e é atualmente reconhecido que o NF- κ B é um fator que estimula a expressão de muitos genes pró-inflamatórios, incluindo o do TNF- α , que por sua vez junto com outras citocinas como a interleucina-1 são potentes indutores da ativação do NF- κ B (Tak e Firestein, 2001). As citocinas pró-inflamatórias também são capazes de aumentar a expressão da COX-2 em várias células envolvidas na patogênese da artrite (Sano et al., 1992). Em face às essas interrelações entre os diversos mediadores é difícil precisar a contribuição de cada um deles na propriedade anti-inflamatória da indometacina, observada neste trabalho.

Por outro lado, existe um considerável número de evidências experimentais que atribuem aos AINEs uma propriedade pró-inflamatória. Este efeito seria decorrente de um aumento na expressão do TNF- α , secundário à inibição da COX e redução das prostaglandinas (Kast, 2000; Ullcar et al., 2004). Portanto, é plausível supor que o bloqueio parcial das alterações clínicas e metabólicas da AIA, esteja refletindo, pelo menos em parte, os efeitos pró-inflamatórios da indometacina mediados pelo TNF- α . Esta interpretação é corroborada por alguns resultados obtidos no presente estudo. Houve um incremento no metabolismo da L-alanina indicado pelo aumento na liberação de unidades C₃ e N₁, mas não houve aumento concomitante na produção de glicose, indicando que a capacidade gliconeogênica dos fígados manteve-se reduzida. É conhecido que TNF- α estimula a captação de aminoácidos pelo fígado (Pacitti et al., 1993) e parece estar implicado na redução da capacidade gliconeogênica de fígados perfundidos. Um nível elevado de TNF- α poderia explicar, também, a ausência de efeito benéfico do tratamento com a indometacina sobre o ganho de peso dos animais artríticos, visto que o TNF- α tem sido implicado como o principal mediador da caquexia (Souba, 1994).

Referências bibliográficas

Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverse inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest*, 97: 2672-2679, 1996.

Bendele AM, Chlipala ES, Schereer J, Frazier J, Sennello G, Rich WJ, Edwards CKIII. Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 2648-2659, 2000.

Bendele AM, McComb J, Gould T, Frazier J, Chlipala ES, Seely J, Kieft G, Wolf J, Edwards CKIII. Combination benefit of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEGsTNF-TI) and dexamethasone or indomethacin in adjuvant arthritic rats. *Inflam Res*, 48: 453-460, 1999.

Berenbaum MC, Brown IN. Prolongation of homograft survival in mice with single doses of cyclophosphamide. *Nature*, 5: 200-284, 1963.

Bergmeyer HU, Bernt E. Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In: HU Bergmeyer (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1205-1212.

Bergmeyer HU. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. In: HU Bergmeyer (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1794-1801.

Bersani-Amado CA, Barbuto JAM, Jancar S. Comparative study of adjuvant induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. I. Effect of cyclophosphamide. *J Rheumatol*, 17: 149-152, 1990.

Billingham MEJ. Models of arthritis and the search for antirheumatic drugs. *Pharmacol Ther*, 21: 389, 1983.

Brennam FM, Maini RN, Feldmann M. TNF- α : pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol*, 31: 293-298, 1992.

Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Nascimento EA, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide on energy metabolism in livers from adjuvant-induced arthritic rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 99: 93-116, 1998.

Choy EHS, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344: 907-916, 2001.

Cohen IR. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Ann Rev Pharmacol*, 9: 567-589, 1991.

Czok R, Lamprecht W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and glycerate-2-phosphate. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1446-1451.

Fedatto Jr Z, Ishii-Iwamoto EL, Bersani Amado CA, Martins Maciel ER, D'Urso Panerari A, Bracht A, Kelmer-Bracht AM. Glucose phosphorylation capacity and glycolysis in the liver of arthritic rats. *Inflamm Res*, 49: 128-132, 2000.

Fedatto Jr Z, Ishii-Iwamoto EL, Caparroz-Assef SM, Vicentini G, Bracht A, Kelmer-Bracht AM. Glycogen levels and glycogen catabolism in livers from arthritic rats. *Mol Cell Biochem*, 229: 1-7, 2002.

Fedatto Jr Z, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL, Constantin J, Bracht A. Gluconeogenesis in the liver of arthritic rats. *Cell Biochem Funct*, 17:71-278, 1999.

Firestein GS, Alvaro-Garcia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 144: 3347-3353, 1990.

Franch A, Castellote C, Castell M. Effect of acetylsalicylic acid and dexamethasone on antibody production in adjuvant arthritis. *Rheumatol Int*, 14: 27-31, 1994.

Gaffney K, Scott DGI. Azathioprine and cyclophosphamide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Brit J Rheumatol*, 37: 824-836, 1998.

Gardner DL. Rheumatoid arthritis: cell and tissue pathology. In: Gradner DL (ed), *Pathological basis of connective tissue diseases*. Edward Arnold, London, 1992, pp. 345-358.

Gutman I, Wahlefeld AW. (+)Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1464-1468.

Kast RE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs might also be pro-inflammatory by increasing tumor necrosis factor. *Biomem Pharmacother*, 54: 168-169, 2000.

Kelmer-Bracht AM, Ishii EL, de Andrade PVM, Bracht A. Construction of a liver perfusion apparatus for studies of metabolic regulation and mechanism of drug action. *Arq Biol Technol*, 27: 419-438, 1984.

Kimmig R, Mauch TJ, Kerzl W, Schwabe U, Scholz R. Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of the inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis. *Eur J Biochem* 136: 609-616, 1983.

Konttinen YT, Reitamo S, Ranki A, Hayry P, Kankaanapaa U, Wegelius O. Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates. *Arth Rheuma*, 24: 71-79, 1981.

Kun F, Kearney EB. Ammonia. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1801-1806.

Lavagno L, Gunella G, Bardelli C, Spina S, Fresu LG, Viano I, Brunelleschi S. Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factor- α production from monocytes: role of transcription factor NF- κ B and implication for rheumatoid arthritis therapy. *Eur J Pharmacol*, 501: 199-208, 2004.

Mackenzie AR, Pick CR, Sibley PR, White BP. Suppression of rat adjuvant disease by cyclophosphamide pretreatment: evidence for an antibody mediated component in the pathogenesis of the disease. *Clin Exp Immunol*, 33: 86-96, 1978.

O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350: 2591-2602, 2004.

Pacitti AJ, Inoue Y, Souba WW. Tumor necrosis factor stimulates Na⁺-dependent amino acid uptake in plasma membrane vesicles. *J Clin Invest*, 91: 474-478, 1993.

Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis, and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 91: 95-101, 1956.

Rosenthal ME. A comparative study of the Lewis and Sprague Dawley rat in adjuvant arthritis. *Arch Int Pharmacod*, 188: 12-22, 1970.

Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest*, 89: 97-108, 1992.

Scholz R, Bücher T. Hemoglobin-free perfusion of rat liver. In: B. Chance, RW Estabrook, JR Williamson (eds.), *Control of Energy Metabolism*. Academic Press, New York, 1965, pp 393-414.

Seng GF, Benensohn J, Bayer BM. Changes in T and B lymphocyte proliferative responses in adjuvant-arthritic rats: antagonism by indomethacin. *Eur J Pharmacol*, 178: 267-273, 1990.

Silva JCR, Rocha MFG, Lima AAM, Brito GAC, de Menezes DB, Rao VSN. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 β and TNF α in rats with adjuvant arthritis. *Inflamm Res*, 49: 14-19, 2000.

Simon J, Surber R, Kleinstäuber G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, Brauer R. Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. *J Autoimmun*, 17: 127-136, 2001.

Souba WW. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness. *Curr Probl Surg*, 587-643, 1994.

Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 107: 7-11, 2001.

Taurog JD. Studies of the cellular basis of adjuvant arthritis in the rat. *Adv Inflamm Res*, 7: 161-169, 1984.

Turk JL. Evidence for preferential effect of cyclophosphamide on B-cells. *Proc R Soc Med*, 66: 805-808, 1973.

Ulcár R, Peskar BA, Schuligoi R, Heinemann A, Kessler HH, Santner BI, Amann R. Cyclooxygenase inhibition in human monocytes increases endotoxin-induced TNF α without affecting cyclooxygenase-2 expression. *Eur J Pharmacol*, 501: 9-17, 2004.

Walz DT, DiMartino MJ, Misher A. Adjuvant-induced arthritis in rats. II. Drug effects on physiologic, biochemical and immunologic parameters. *J Pharmacol Exp Ther*, 178: 223-231, 1971.

Winder CV, Max J, Been MA. Rapid foot volume measurements on unanesthetized rats and the question of a phenyl-butazone effect on anaphyloctoid edema. *Arch Int Pharmacody Ther*, 112: 174-187, 1957.

Yamaguchi Y, Tanaka Y, Yamada K, Bandô Y, Kunitomo M. Abnormal lipid metabolism in adjuvant arthritic rats. *Japan J Pharmacol*, 50: 377-386, 1989.

Yamaki Y, Uchida H, Harada Y, Yanagisawa R, Takano H, Hayashi H, Mori Y, Yoshino S. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on Th1 and Th2 immune responses in mice. *J Pharmac Sci.*, 92: 1723-1728, 2003.

Yassuda Filho P, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Lousano SH, Bracht L, Kelmer-Bracht A. The urea cycle in the liver of arthritic rats. *Mol Cell Biochem*, 243: 97-106, 2003.

Tabela 01. Efeitos da indometacina e da ciclofosfamida sobre os fluxos metabólicos resultantes da metabolização de L-alanina em fígados de animais normais e artríticos. Os dados foram obtidos dos experimentos mostrados na Figura 4 e 5 e representam os valores médios \pm EPM das áreas sobre as curvas de tempo, após subtração dos valores dos metabólitos liberados antes da infusão da L-alanina. Em cada linha, os pares de letras indicam as médias que diferem estatisticamente um do outro, de acordo com o teste *t* de Student ($P < 0,05$).

Parâmetro	Normal (n = 8)	Artrítico (n = 10)	Normal +INDO (n = 4)	Normal +CICLO (n = 4)	Artrítico +INDO (n = 6)	Artrítico +CICLO (n = 6)
Glicose	9,09 \pm 0,45 ^{a,b,c,d}	3,46 \pm 0,29 ^{a,f}	7,57 \pm 0,62 ^e	6,99 \pm 0,84 ^b	4,14 \pm 0,44 ^{c,e}	5,93 \pm 0,26 ^{d,f}
L-lactato	7,19 \pm 0,70 ^a	4,27 \pm 0,31 ^{a,b,c}	6,68 \pm 1,30	7,52 \pm 1,01	8,85 \pm 1,06 ^b	9,19 \pm 0,68 ^c
Piruvato	4,08 \pm 0,52 ^a	2,16 \pm 0,37 ^{ab,c}	5,77 \pm 1,33	5,53 \pm 0,66	4,58 \pm 1,16 ^b	6,20 \pm 1,32 ^c
Uréia	9,03 \pm 0,78 ^a	3,08 \pm 0,48 ^{a,b,c}	9,53 \pm 1,70	9,25 \pm 1,21	6,63 \pm 0,94 ^b	10,95 \pm 0,45 ^c
Amônia	2,21 \pm 0,21 ^{a,b,c}	5,06 \pm 0,78 ^{a,d}	0,98 \pm 0,07 ^{b,e}	1,76 \pm 0,31	3,82 \pm 0,23 ^{c,e}	2,26 \pm 0,35 ^d
Oxigênio	16,75 \pm 0,97 ^{a,b}	10,89 \pm 1,69 ^a	14,03 \pm 0,33 ^c	13,40 \pm 1,70	9,08 \pm 1,30 ^{b,c}	12,97 \pm 1,93
Unidades C ₃	29,46 \pm 1,15 ^{a,b}	13,35 \pm 0,94 ^{a,c,d}	27,58 \pm 3,35	27,04 \pm 2,81	21,71 \pm 2,97 ^{b,c}	27,25 \pm 1,46 ^d
Unidades N ₁	20,27 \pm 1,52 ^a	11,22 \pm 1,61 ^{a,b,c}	20,04 \pm 3,46	20,27 \pm 2,38	17,07 \pm 1,94 ^b	24,15 \pm 1,08 ^c

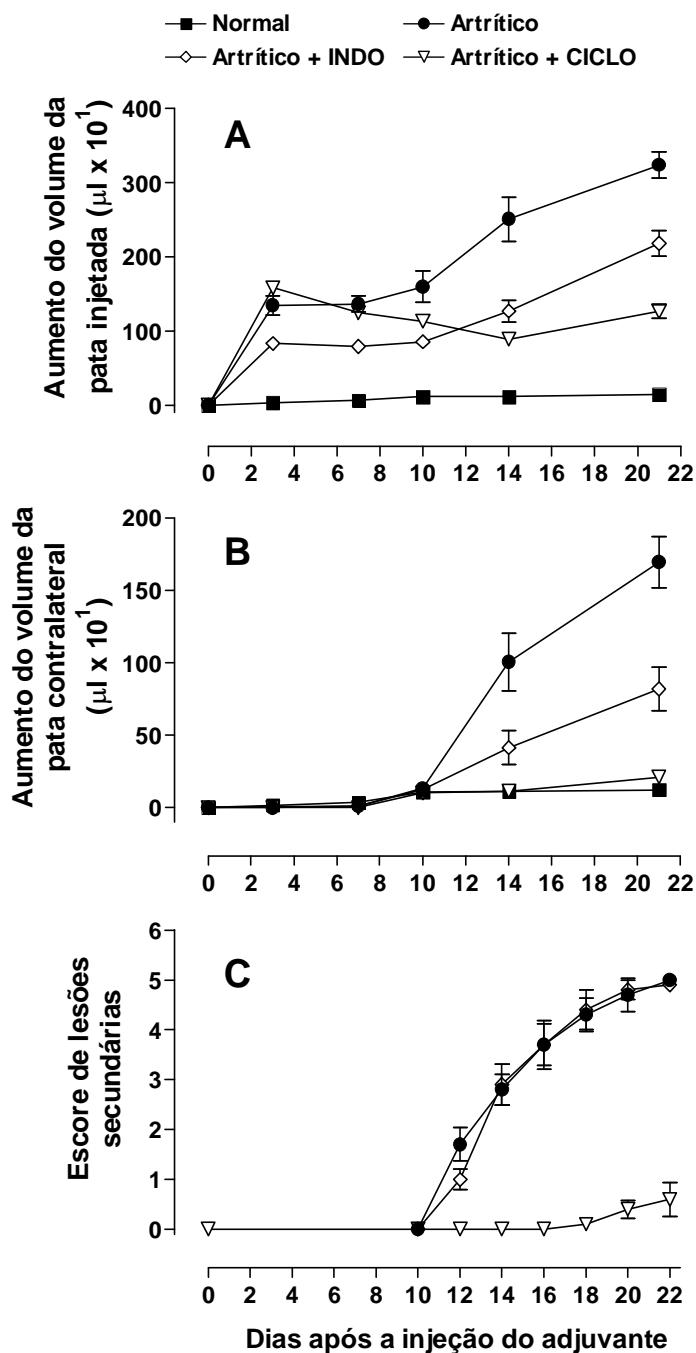


Figura 1. Efeitos da administração de indometacina e de ciclofosfamida no edema da pata injetada (A) e contralateral (B), e no aparecimento de lesões secundárias (C) induzidas pela injeção do ACF. A indometacina foi administrada por via oral na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal desde o dia da injeção do ACF até o 18º dia. A ciclofosfamida foi administrada por via oral na dose de 10 mg/kg de peso corporal desde o 4º dia da injeção do ACF até o 10º dia. Cada ponto representa o valor médio \pm EPM de 6-10 animais.

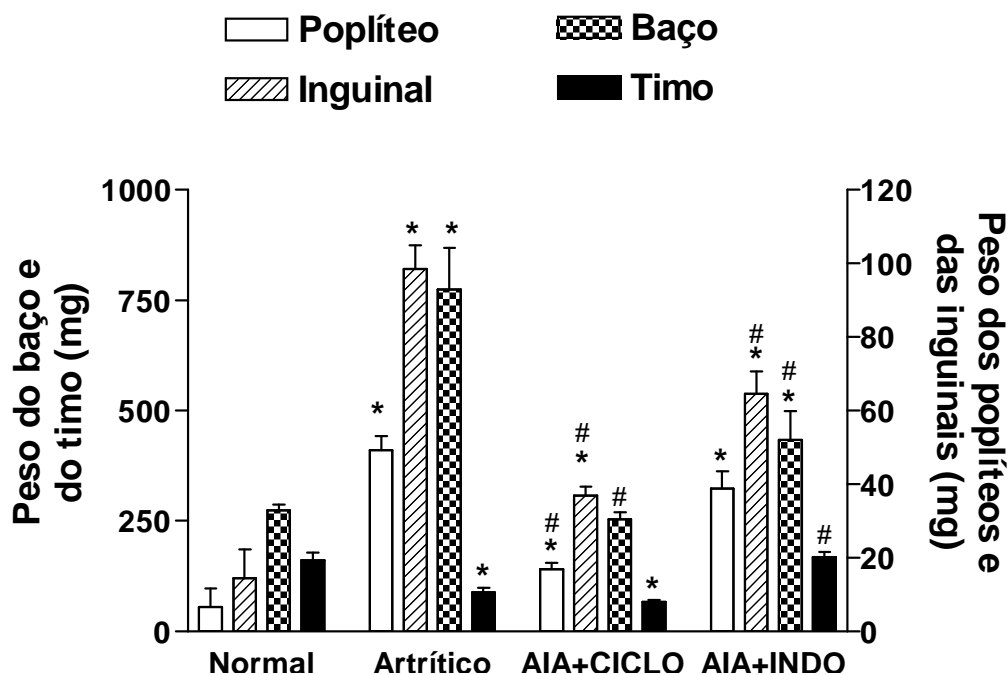


Figura 2. Efeitos da administração da indometacina e da ciclofosfamida no peso dos linfonodos poplíteos e inguinais, do baço e do timo. Os ratos artríticos foram tratados com indometacina por via oral na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal desde o primeiro dia da injeção do ACF até o 14º dia. A ciclofosfamida foi administrada por via oral na dose de 10 mg/kg de peso corporal desde o 4º dia da injeção do ACF até o 10º dia. Os animais foram sacrificados no 14º dia para a pesagem dos linfonodos e órgãos. Os valores do poplíteo e da inguinal referem-se à soma dos pesos dos linfonodos direito e esquerdo. Os dados são as médias \pm EPM de 10-11 animais. (*) Valores que diferem estatisticamente dos valores dos animais normais; (#)Valores que diferem estatisticamente dos valores dos animais artríticos, de acordo com o teste *t* de Student ($P < 0,05$).

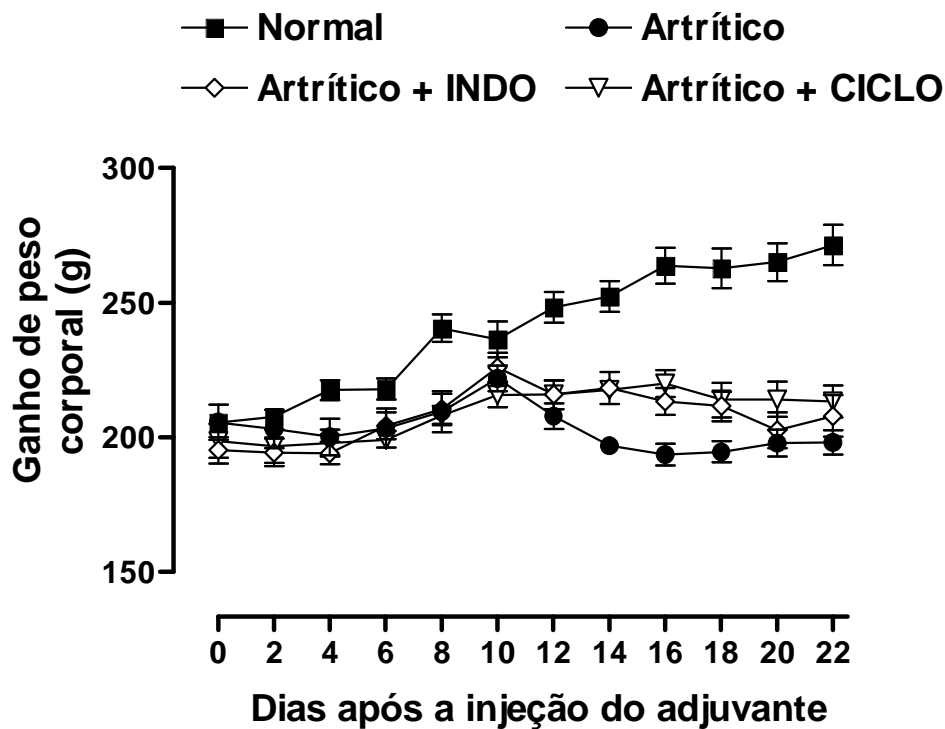


Figura 3. Efeitos da indometacina e da ciclofosfamida sobre o peso corporal de animais artríticos. Cada ponto representa o valor médio \pm EPM de 7-10 animais. Ganho de peso de animais normais (\square), animais artríticos não-tratados (\bullet), animais artríticos tratados com indometacina 1,5 mg/kg de peso corporal (\diamond), animais artríticos tratados com ciclofosfamida 10 mg/kg de peso corporal (∇).

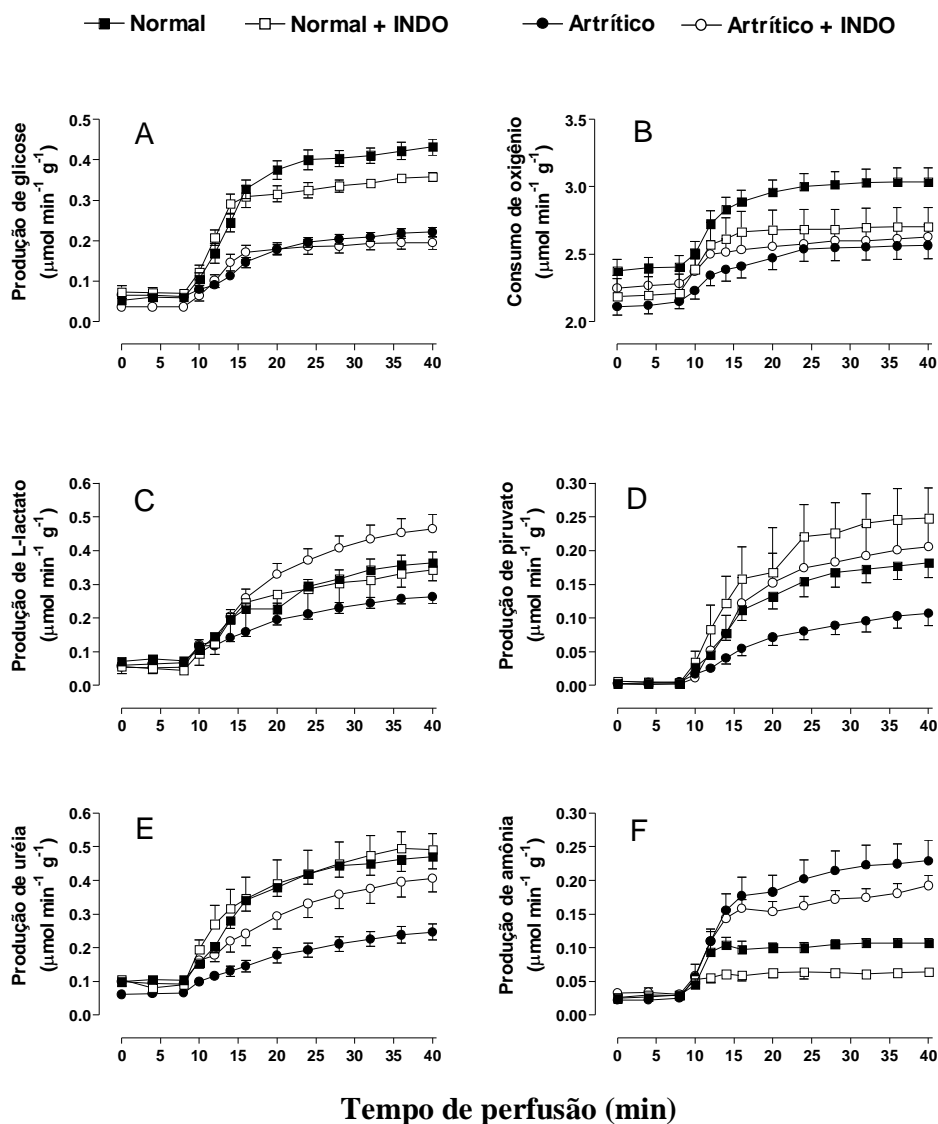


Figura 4. Fluxos metabólicos resultantes da infusão de L-alanina (2,5 mM) em fígados de animais normais (\square), artríticos (λ), normais tratados com indometacina (\square), artríticos tratados com indometacina (\circ). Os fígados foram isolados de animais no 14^o dia após a injeção do ACF e mantidos em jejum prévio de 24 h. A indometacina foi administrada diariamente por via oral na dose de 1,5 mg kg⁻¹ de peso corporal desde o dia do adjuvante até o 14^o dia do período experimental. Os fígados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 como descrito em Materiais e métodos. A L-alanina (2,5 mM) foi infundida no intervalo entre 10-40 min de perfusão. O perfusado efluente foi coletado em intervalos de 2-4 min e os conteúdos de glicose (A), L-lactato (C), piruvato (D), uréia (E) e amônia (F) foram analisados. O consumo de oxigênio (B) foi monitorado por polarografia. Cada ponto experimental representa o valor médio de 4-10 experimentos de perfusão. As barras verticais são os erros padrões das médias (EPM).

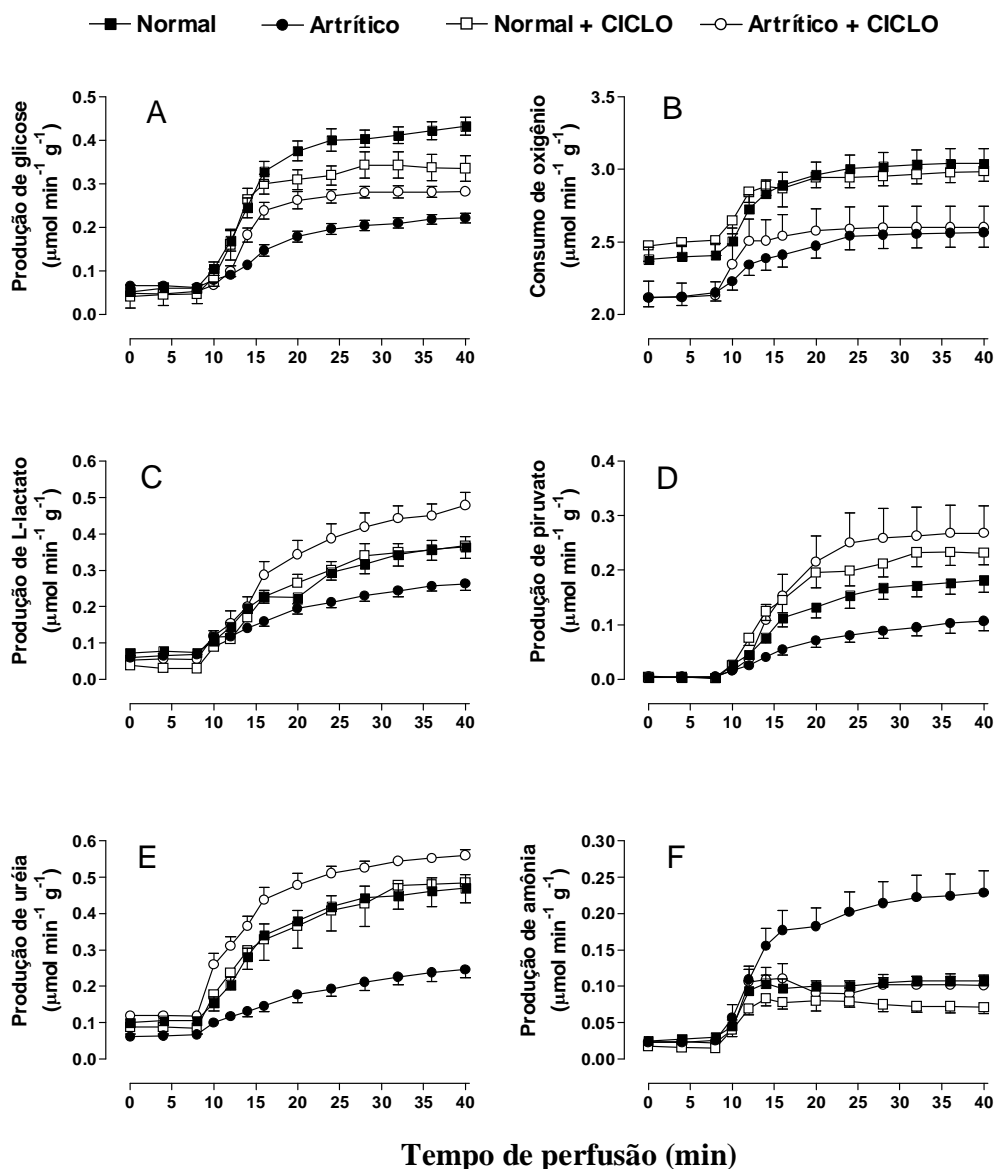


Figura 5. Fluxos metabólicos resultantes da infusão de L-alanina (2,5 mM) em fígados de animais normais (\square), artríticos (\bullet), normais tratados com ciclofosfamida (\square), artríticos tratados com ciclofosfamida (\circ). Os fígados foram isolados de animais no 14^o dia após a injeção do ACF e mantidos em jejum prévio de 24 h. A ciclofosfamida foi administrada diariamente por via oral na dose de 10 mg kg^{-1} de peso corporal entre o 4^o e o 10^o dia do período experimental. Os fígados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 como descrito em Materiais e métodos. A L-alanina (2,5 mM) foi infundida no intervalo entre 10-40 min de perfusão. O perfusado efluente foi coletado em intervalos de 2-4 min e os conteúdos de glicose (A), L-lactato (C), piruvato (D), uréia (E) e amônia (F) foram analisados. O consumo de oxigênio (B) foi monitorado por polarografia. Cada ponto experimental representa o valor médio de 4-10 experimentos de perfusão. As barras verticais são os erros padrões das médias (EPM).

**The metabolic changes caused by
dexamethasone in the
adjuvant-induced arthritic rat**

Silvana M. Caparroz-Assef, Ciomar A. Bersani-Amado, Ana M. Kelmer- Bracht, Adelar Bracht
and Emy L. Ishii-Iwamoto

*Laboratory of Liver Metabolism, Department of Biochemistry, University of Maringá, 87.020.900
Maringá, Brazil*

Correspondence to:

Emy L. Ishii-Iwamoto

Department of Biochemistry

University of Maringá

E-mail: eliiwamoto@uem.br

Fax: 55-44-3261-4896

87.020.900 Maringá, Brazil

Abstract

The action of orally administered dexamethasone ($0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) on metabolic parameters of adjuvant-induced arthritic rats was investigated. Data were obtained in vivo and in the isolated perfused liver. The body weight gain and the progression of the disease were also monitored. Dexamethasone was very effective in suppressing the Freund's adjuvant-induced paw edema and the appearance of secondary lesions. In contrast, the body weight of dexamethasone-treated arthritic rats was more accentuated than that of untreated arthritic or normal rats treated with dexamethasone, indicating additive harmful effects. The perfused livers from dexamethasone-treated arthritic rats presented many metabolic alterations. Initial basal rates of glucose release and oxygen uptake in the absence of exogenous substrates were increased in both fed and fasted conditions. The L-alanine metabolism was faster than in untreated arthritic rats, but there was a diversion of carbon flux from glucose to L-lactate and pyruvate. Stimulation of glycogen mobilization by glucagon was more accentuated in dexamethasone-treated rats. Many of these effects are opposite to those ones induced by the arthritis disease, but they were similar to those found in livers from normal rats treated with dexamethasone. There was, thus, a clear prevalence of the effects of dexamethasone on liver metabolism over those ones induced by the arthritis disease. Dexamethasone administration caused insulin resistance in both arthritic and normal rats as indicated by the high levels of plasma glucose and insulin. However, our data were not in accordance with a decreased in the responsiveness of liver glucose metabolism to insulin as suggested by the high content of hepatic glycogen even in the fasted condition. Possibly, the peripheral effects of dexamethasone in increasing the gluconeogenic aminoacids supply to the liver and the high glycogen levels contributed to the elevated blood glucose concentration found in both arthritic and normal rats following dexamethasone treatment.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a synovial inflammatory autoimmune disease of unknown etiology. However, it is now accepted that a wide spectrum of cellular and humoral elements of the immune system are activated and contribute to the disease pathology. Although the joint is the main target of the pathologic immune response, RA affects many other organs and earlier two-thirds of human patients experience a muscle wasting condition known as rheumatoid cachexia (Walsmith and Roubenoff, 2002). The cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins-1 and 6 have been shown to have a pivotal role in the pathogenesis of arthritis disease. High synovial and serum concentrations of these cytokines have been detected in human patients and in animal models of arthritis (Silva et al., 2000; Choy and Panayi, 2001). TNF- α stimulates the production of other pro-inflammatory cytokines, as well as prostaglandins and matrix metalloproteinases (MMPs) from synovial cells that could be responsible for joint destruction (Brennan et al., 1992). The cytokines TNF- α and interleukins-1 have also been implicated as the mediators of weight loss that is observed in rheumatoid cachexia (Roubenoff et al., 1997). Adjuvant-induced arthritis is an experimental model of polyarthritis, which is widely used for evaluation of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs, because it presents many of the clinical characteristics of RA (Rosenthale, 1970). Previous studies with the isolated perfused rat liver reveal that adjuvant-induced arthritic rats present several metabolic alterations. Gluconeogenesis from a variety of substrates and glycogen content are reduced (Caparroz-Assef et al., 1998; Fedatto Júnior et al., 1999; 2002). On the other hand, glycolysis from exogenous glucose is more pronounced, a phenomenon that was attributed to an enhanced glucose phosphorylation capacity (Fedatto et al., 2000). Hepatic ureogenesis is also modified in arthritic rats. Urea production is lower, higher or equal to that in normal rats depending on the substrate (Yassuda-Filho et al., 2003). Changes in the perfused liver responses to hormones were also demonstrated. Gluconeogenesis stimulation by glucagon is more pronounced in arthritic rats, but the hormone is less effective in releasing glucose from glycogen (Fedatto-Júnior et al., 2002). The mechanisms implicated in these liver metabolic changes as well as their physiological meanings remain to be elucidated. However, given the role of the liver in glucose homeostasis, there may be a link between metabolic abnormalities and the cachectic condition reported in

human patients with RA and in animal models of arthritis (Svenson et al., 1987; Roubenoff et al., 1994; Walsmith et al., 2000; Walsmith and Roubenoff, 2002).

In contrast to numerous studies about the beneficial effects of steroids, nonsteroidal anti-inflammatories or disease-modifying drugs on joint damage and systemic inflammation there have been only few investigations aiming to evaluate whether drugs also normalize the metabolic alterations associated with the arthritis disease. This is an important question because there is evidence that many of the drugs used in the RA therapy do not diminish the body weight loss of the animals (Bendele et al., 1999; 2000). This may be an indication that different mediators other than those implicated in the clinical signs of arthritis are responsible for the metabolic abnormalities.

Glucocorticoids have potent immunosuppressive and anti-inflammatory effects and are widely used in the therapy of chronic inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis (Brinkman et al., 1995; Da Silva et al., 2000). Inhibition of the production and release of cytokines, including TNF- α , IL-1 and IL-6 and of arachidonic acid metabolism products, including prostaglandins and leukotrienes, has been suggested as their anti-inflammatory mechanism (Amano et al., 1992; Caldenhoven et al., 1995; Lavagno et al., 2004). However, it is known that long-term administration of glucocorticoids exerts a series of unwanted side effects, including muscle wasting, osteoporosis, glucose intolerance, lipid abnormalities, exacerbation of cardiovascular disease and miopathy (Dirlewanger et al., 2000; Moreland and O'Dell, 2002). The observation that glucocorticoids inhibit the production of cytokines that are implicated in the pathogenesis of the arthritis disease, but exert also a wide spectrum of systemic metabolic alterations, immediately raised the question about the metabolic consequences of dexamethasone administration to arthritic rats.

Taken all these considerations in account, this work has three main purposes: (a) to investigate the effects of dexamethasone (DEX) administration on metabolic parameters in isolated perfused livers from adjuvant-induced arthritic rats and to determine the possible contribution of the liver to metabolic parameters measured in vivo; (b) to verify if the changes in hepatic or in vivo metabolic parameters correlate with the clinical improvement of the arthritis disease by dexamethasone and c) to determine whether the metabolic changes can be attributed to the specific action of dexamethasone rather than to the arthritis disease. Gluconeogenesis,

ureogenesis, oxygen consumption, L-lactate, pyruvate and ammonia release from L-alanine were measured in isolated perfused livers and the body weight gain, plasmatic levels of glucose, insulin and some enzymes markers were evaluated in intact animals. The classic signs of inflammation, namely paws edema and secondary lesions appearance were also monitored.

Materials and methods

Materials. The liver perfusion apparatus was built in the workshops of the University of Maringá. L-Alanine, enzymes and coenzymes used in the enzymatic assays were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Dexamethasone ((11 β ,16 α)-9-fluoro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-diene-3,20-dione) was purchased from Galena (São Paulo, Brazil). Crystalline glucagon was purchased from Eli Lilly do Brasil. All reagent grade chemicals were from the best available grade.

Animals and induction of arthritis. Male Holtzman rats, weighing 170-200 g, were fed ad libitum with a standard laboratory diet (Nuvilab, São Paulo, Brazil). Rats were divided into four groups: (a) normal rats; (b) arthritic rats; (c) DEX-treated normal rats; (d) DEX-treated arthritic rats. Adjuvant arthritis was induced by an intradermal injection of 100 μ l of a suspension of Freund's adjuvant (heat inactivated *M. tuberculosis*) suspended in mineral oil at a concentration of 0.5% (w/v) into the left hind paw. Body weight and food intake were assessed daily always in the morning. Fasted rats are animals from which food was withdrawn 24 hours prior to the experiments. All experiments were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the University of Maringá.

Evaluation of adjuvant arthritis. The development of adjuvant-induced arthritis was assessed by paw volume changes and by secondary lesions appearance. The volume of the injected and non-injected hind paw was determined by digital plethysmography. The results were expressed as increase in paw volume compared with the initial volume. Measurements were done daily for 22 days. The secondary lesions severity was evaluated by a numerical grading system, as reported

by Rosenthale (1970). This was done by assigning points to each of the following events: appearance of nodules in the tail (+1); appearance of nodules in one or both ears (+1 or +2) and appearance of swelling in one or both forelimbs (+1 or +2). Accordingly, the severity of these secondary lesions was graded from 0 to 5, 0 indicating absence of lesions.

Dexamethasone treatment. Dexamethasone was administered to normal and adjuvant-induced arthritic rats once daily for a consecutive period of 14 days, starting on the day of Freund's adjuvant injection. The drug was dissolved in sterile saline immediately before use and administered orally at a dose of 0.2 mg/kg body weight (Simon, 1999).

Liver perfusion. The perfusion experiments were performed with rats of all experimental groups on the 14th day after adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation. For the surgical procedure fed or 24 hours fasted rats were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight). Hemoglobin-free, non-recirculating perfusion was performed. The surgical technique was that one described by Scholz and Bücher (1965). After cannulation of the portal and cava veins the liver was positioned in a plexiglass chamber. The flow was maintained constant by a peristaltic pump. The perfusion fluid was Krebs/Henseleit-bicarbonate buffer (pH 7.4), saturated with a mixture of oxygen and carbon dioxide (95:5) by means of a membrane oxygenator with simultaneous temperature adjustment at 37°C. Samples of the effluent perfusion fluid were collected according to the experimental protocol and analyzed for their metabolite contents. The oxygen concentration in the outflowing perfusate was monitored continuously, employing a teflon-shielded platinum electrode adequately positioned in a plexiglass chamber at the exit of the perfusate. L-Alanine (2.5 mM) or glucagon (10 nM) were dissolved in the perfusion fluid.

Analytical. The following compounds were assayed in the effluent perfusion fluid by means of standard enzymatic procedures: glucose (Bergmeyer and Bernt, 1974); L-lactate (Gutman and Wahlefeld, 1974); pyruvate (Czok and Lamprecht, 1974); urea (Bergmeyer, 1974) and ammonia

(Kun and Kearney, 1974). Metabolic rates were calculated from input-output differences and the total flow rates and were referred to the wet weight of the liver.

For measurements of enzyme activities and glucose and insulin plasma concentrations in intact animals, blood samples were taken from the inferior vena cava on day 14 post-adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation, after the animals had fasted overnight. A heparine-containing syringe was used and the plasma was separated by centrifugation at 1000g for 15 min.

The activities of alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) and transaminases (aspartate aminotransferase-AST and alanine aminotransferase-ALT) and the glucose concentration in plasma were estimated using Gold Analisa Diagnóstica® kits (Belo Horizonte MG, Brazil). Insulin was measured by radioimmunoassay employing a rat insulin kit (Linco, Research (St Charles, Missouri, USA).

Treatment of data. The statistical significance of the differences between parameters in the four experimental groups was evaluated by means of Student's **t**-test. Differences in the same experimental group were tested by repeated-measured one-way analysis of variance with significant differences among means being identified by Newman-Keuls testing. The results are given in the text as probability values (p). $p \leq 0.05$ was adopted as a criterion of significance. Statistical analysis was performed by means of the Statistica™ or GraphPAD Software programs. Areas under time-response curves were evaluated by means of the GraphPAD Software. The data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Effects of dexamethasone on the development of adjuvant-induced arthritis

Figures 1A and 1B show the effects of dexamethasone on the development of inflammation as indicated by edema formation in the injected and non-injected paws, respectively. An inflammatory reaction was observed on day 3 post-adjuvant in the injected paw, which intensified after the 10th day (Fig. 1A). The inflammatory response in the non-injected paw

started only at day 10 and progressed until day 22 (Fig. 1B). Treatment of arthritic rats with dexamethasone from 0 until 14 days reduced the intensity of the initial inflammatory response in the injected paw, but suppressed almost completely the second phase of inflammatory reaction (after the 10th day). On the other hand, the inflammatory reaction in the non-injected paw was completely suppressed by dexamethasone treatment (Fig. 1B).

The secondary lesions appeared at day 10 and reached high scores at the 22nd day after adjuvant injection (Fig. 1C). Dexamethasone inhibited the appearance of the secondary lesions until the 18th day. Since then the secondary lesions reappeared though with lower intensity.

Effects of dexamethasone treatment on body weight gain of normal and arthritic rats

Animals in each of four groups did not differ in body weight at the beginning of the experimental procedure (Fig. 1D). Control rats gained weight progressively until the end of experimental period (22 days). Their body mass increased by 32% ($p < 0.001$). The growth rate of adjuvant arthritic rats was significantly inhibited compared with the normal animals mainly after the 10th day after adjuvant injection. At day 22, the mean body weight was unchanged, relative to the initial value, but it was 27% lower than that of normal rats ($p < 0.001$). DEX-treated animals did not gain weight. In contrast, a progressive weight decrease was observed in both DEX-treated normal and DEX-treated arthritic rats. The decrease persisted until day 12 in the normal group and until day 16 in the arthritic group. At these time periods the body weight of arthritic rats was reduced by 18.6% ($p < 0.001$) and that of normal rats by 9.8% ($p < 0.001$) when compared with their initial body weight. After the 12th day the weights of DEX-treated arthritic rats were significantly lower than those of DEX-treated normal rats. Table 1 shows the mean food intake of the animals at the 9th day (local inflammation) and 14th day (systemic inflammation). Food intake of arthritic rats was 38% and 31% lower than those of the normal rats at day 9 and 14, respectively. However, when the arthritic rats were treated with dexamethasone the food intake was increased and approached those ones of the normal rats. At day 9, it was 20% higher than that of the normal rats. Actually, the food intake of DEX-treated arthritic rats both at the 9th and the 14th days is similar to that one of DEX-treated normal rats.

Effects of dexamethasone treatment on in vivo metabolic parameters

The blood glucose concentration and the insulin level measured in 24-h fasted rats at day 14 post adjuvant injection are presented in Table 02. The mean glucose concentration in arthritic rats was 14.9% higher than that one of the normal rats. Dexamethasone administration in normal or arthritic rats caused a substantial increase in the blood glucose concentration. Increases of 50% and 42% were found in DEX-treated normal rats and DEX-treated arthritic rats, respectively, when compared to their respective controls. Plasma insulin concentration was 41% lower in arthritic rats in comparison with normal rats. However, the level of insulin was increased nearly 34 fold in DEX-treated arthritic rats.

In arthritic rats, increased serum levels were found for γ -GT and AST, but the ALT and ALP levels were similar to those ones found in normal rats (Table 3). Following dexamethasone treatment, the level of γ -GT was restored towards the normal condition, but the levels of AST and ALT were increased when compared with the normal or arthritic rats. DEX-treated normal rats had also increased levels of AST and ALT, but their levels of ALP and γ -GT were similar to those ones of untreated normal rats.

Effects of dexamethasone treatment on the metabolic fluxes due to L-alanine infusion in perfused livers from normal and arthritic rats

Rats at the 14th day after adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation were used for liver perfusion experiments. The rats were fasted 24 hours prior to the experiments. After stabilization of oxygen uptake sampling of the outflowing perfusate for the measurement of metabolite production was initiated. After approximately 10 min, 2.5 mM L-alanine was infused during 30 min. Figure 2 allows comparison of the responses to L-alanine infusion of livers from normal rats (non-treated and DEX-treated) and arthritic rats (non-treated and DEX-treated). Before the initiation of L-alanine infusion glucose, L-lactate, pyruvate, urea and ammonia productions were negligible in livers from both normal and arthritic rats as can be seen respectively in panels A, C, D, E and F of Figure 2. However, livers from DEX-treated rats (normal or arthritic rats) released substantial amounts of glucose and L-lactate. Because no substrate was infused during this pre-perfusion period, glucose and L-lactate may arise mainly

from residual glycogen. Confirming previous observations (Yassuda Filho et al., 2003), oxygen uptake in livers from arthritic rats was smaller than that in livers from normal rats (Fig. 2B). Dexamethasone administration produced a considerable increase in oxygen uptake in livers from both normal and arthritic rats. The increase was more pronounced in livers from DEX-treated arthritic rats (+34.5%, $p < 0.0001$) than in livers from DEX-treated normal rats (+20%, $p = 0.0006$), abolishing the difference between the normal and arthritic conditions. When L-alanine was infused all metabolic parameters were increased in each of the four experimental conditions. However, the steady-state rates of glucose, L-lactate, pyruvate and urea production in arthritic rats were considerably lower than those of normal rats reproducing previous observations (Yassuda Filho et al., 2003). Oxygen uptake was also smaller, but the opposite occurred with ammonia production, which was significantly higher, also confirming previous observations (Yassuda Filho et al., 2003). The livers of dexamethasone-treated rats responded differently to L-alanine infusion when compared with livers from untreated-rats. No further increments in glucose production were detected in either DEX-treated normal or DEX-treated arthritic rats. However, the livers produced L-lactate, pyruvate, urea and ammonia at different rates compared to the corresponding values in untreated rats. Table 4 was constructed in order to discriminate the rates of the metabolites arising mainly from exogenously added L-alanine from those produced from endogenous sources. In this table, the total amounts of glucose, L-lactate, pyruvate, urea and ammonia that were released and the net increase in oxygen uptake due to L-alanine are shown. These data were calculated as the area under the curves, after subtracting the rates of the metabolites released before L-alanine infusion. The total amount of L-alanine released as nitrogen metabolites [ammonia + (2 × urea)] or as carbon metabolites [(2 × glucose) + (L-lactate + pyruvate)] expressed, respectively, as N_1 or C_3 units were also shown. The data reveal that the overall metabolism of L-alanine was reduced in arthritic rats, because similar reductions were found in the production of C_3 (-54%) and N_1 units (-49%). Dexamethasone treatment caused a significant increase in both C_3 and N_1 metabolites production in livers from arthritic rats. The sum of C_3 and N_1 metabolites approached those ones of the untreated-normal rats. However, the C_3 metabolites increment was totally due to the increased production of L-lactate and pyruvate. There was no net significant increase in glucose production from L-alanine. A similar trend was found in livers from DEX-treated normal rats. However, in comparison with their respective

controls (untreated rats) the increases in L-lactate and pyruvate production in livers from DEX-treated arthritic rats (233% and 581%, respectively) were more pronounced than those in DEX-treated normal rats (130% and 120%, respectively).

Dexamethasone treatment also produced a considerable increase in the production of urea plus ammonia from L-alanine. In comparison with the corresponding untreated rats, the total N_1 metabolites were increased by 67% in livers from DEX-treated normal rats, whereas the relative increase in DEX-treated arthritic rats was more pronounced (+210%). It should be remarked that the total N_1 metabolites production in the livers from arthritic rats was about 50% lower in comparison with the normal condition. So, the rates of urea plus ammonia production in livers from DEX-treated rats were approximately equal in both conditions. However, the patterns of the changes in urea and ammonia production were significantly different. Whereas in livers from DEX-treated normal rats urea production was 52% increased in livers from DEX-treated arthritic rats the increment in urea production was much more pronounced (+435%) when compared with the respective untreated rats. Moreover, ammonia production in livers from DEX-treated normal rats was 305% increased, but inhibition was found in livers from DEX-treated arthritic rats (-63%).

The observation that livers from dexamethasone-treated rats released substantial amounts of glucose in the fasted condition in the absence of exogenous gluconeogenic substrates suggests that these livers possess higher contents of residual glycogen. This could be consequence of a reduced capacity of these livers in releasing glucose from glycogen when stimulated by hormones such as glucagon. In order to test this possibility we measured the effects of glucagon on glycogen catabolism in the perfused liver from fed rats. The results are presented in Figure 3. After a pre-perfusion period with substrate-free medium 1.0 nM glucagon was infused for 30 minutes. Four parameters were measured: glucose, L-lactate and pyruvate release and oxygen uptake. The sum of glucose release + $\frac{1}{2}$ (L-lactate + pyruvate release) is a good approximation for the glycogenolytic activity under the present perfusion condition, because only a small fraction of pyruvate undergoes further transformation (Kimmig et al., 1983). Oxygen uptake in substrate-free perfused rat liver is essentially due to the β -oxidation of endogenous fatty acids (Kimmig et al., 1983). Thus, in the graph of Figure 3A the results were expressed as glucosyl

units release. The initial steady-state rates of glycogen catabolites release in livers from arthritic rats did not differ from that in the livers from normal rats. These were found to be equal to $1.01 \pm 0.059 \mu\text{mol glycosyl units min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in livers from normal rats and $1.25 \pm 0.098 \mu\text{mol glycosyl units min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in livers from arthritic rats. In livers from dexamethasone-treated rats, on the other hand, the rates of glycogen catabolites release were significantly increased. The mean steady-state rates were 2.98 ± 0.62 (+195%, $p = 0.0141$) and 2.44 ± 0.284 (+95.2%, $p = 0.019$) $\mu\text{mol glycosyl units min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in livers from DEX-treated normal and DEX-treated arthritic rats, respectively. Oxygen uptake was also higher in the livers from dexamethasone-treated rats both in the normal and arthritic conditions (Fig. 3B). Glucagon infusion increased the glycogen catabolites release and oxygen uptake in all experimental conditions. Confirming previous observations (Fedatto-Júnior et al., 2002), glycogenolysis stimulation by glucagon was less pronounced in livers from arthritic rats. The total extra glycogen catabolites released during the entire glucagon infusion period was equal to $57.25 \pm 4.19 \mu\text{mol g}^{-1}$ in the normal condition and $24.26 \pm 4.70 \mu\text{mol g}^{-1}$ in the arthritic condition ($p = 0.0003$). Increased values were found after dexamethasone treatment. These were $103.8 \pm 10.55 \mu\text{mol g}^{-1}$ in livers from DEX-treated normal rats and $64.42 \pm 9.51 \mu\text{mol g}^{-1}$ in livers from DEX-treated arthritic rats ($p = 0.017$). When compared with their respective untreated rats, the increment was more pronounced in the arthritic condition. It was increased by 81% ($p = 0.0027$) in the normal condition and by 165% ($p = 0.0024$) in the arthritic condition.

Discussion

Dexamethasone in oral doses of $0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ was very effective in suppressing the development of adjuvant arthritis, as indicated by the reductions of paws edemas and secondary lesions. However, the body weight loss of arthritic rats was exacerbated by dexamethasone administration and the perfused livers presented several modifications, which can be attributed mainly to drug effects rather than to its actions on the arthritis disease. Normal rats treated with dexamethasone weighed less than normal untreated rats despite similar food intake per 100 g body weight, confirming previous reports (Dumas et al., 2003; Roussel et al., 2003). On the other

hand, the reduction in the food intake could be contributing to a reduction in the body weight gain of arthritic rats. However, it cannot be the major factor because dexamethasone treatment improves the food intake of the arthritic rats, but their body weight loss was more accentuated than that of the untreated arthritic rats or of the normal rats treated with dexamethasone. The body weight decrease is unlikely to be the result of water loss, as indicated by the absence of significant differences in water ingestion and diuresis between the groups (data not shown). It has been proposed that the cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β are the central mediators of body weight loss in rheumatoid cachexia (Roubenoff et al., 1994; Roubenoff et al., 1997; Hamada et al., 2000; Walsmith et al., 2000; Walsmith and Roubenoff, 2002). Since dexamethasone has been shown to inhibit the formation and release of both proinflammatory cytokines (Allison and Lee, 1989; Amano et al., 1992) some improvement and not an exacerbation of the body weight loss would be expected following dexamethasone administration in arthritic rats. Therefore, our results did not support the hypothesis that the cytokines TNF- α and/or interleukin-1 β play a major role in the body weight loss in the arthritis disease. Against this hypothesis are also the data of Bendele et al. (2000) and Fathalla et al. (2004). The authors found that the therapy of arthritic rats with recombinant IL-1 β and TNF- α anticytokine agents results in amelioration of the clinical signs of arthritis, but no significant benefit on body weight gain.

The body weight loss caused by dexamethasone has been attributed to several factors, many of them similar to those ones reported for the arthritic disease, including muscle protein synthesis suppression, increase in protein degradation, increase in energy expenditure and decrease in energy intake (Odebra et al., 1983, Woodward and Emery, 1989; Tataranni et al., 1996; Minet-Quinard et al., 2000). The exact molecular mechanisms of these metabolic perturbations are also not fully understood. It is believed that the increase in the ATP-demanding pathways in organ such liver, kidney and skeletal muscle contribute to increase in the whole body energy expenditure. Our results are in agreement with this hypothesis, because the basal oxygen consumption rates in dexamethasone-treated rats were substantially higher than in untreated rats, irrespective on the experimental condition (normal or arthritic rats, fed or fasted state). The relative increment in the basal oxygen consumption caused by dexamethasone in the arthritic rats

was significantly higher than in the normal rats in the fasted condition, but the opposite effects were found in the fed condition. It remains, thus, an open question whether or not a difference in the energy expenditure may have contributed to the higher body weight loss observed in arthritic rats.

No indication of liver damage was found in arthritic rats, because the serum levels of ALT or ALP were not significantly different from those of normal rats. On the other hand, elevated γ -GT level was found in arthritic rats, which was normalized by dexamethasone treatment. This correlation between elevated serum γ -GT and the arthritis disease is in agreement with the suggestion that the increased γ -GT is a liver reaction to the inflammatory disease, similarly to that one displayed by acute-phase protein, such as fibrinogen and C-reactive protein (Lowe et al., 1978; Åkesson et al., 1980). Dexamethasone administration increased the levels of AST and ALT in both DEX-treated normal and DEX-treated arthritic rats. Although abnormal liver function tests have been described in patients or animals treated with drugs for arthritis disease (Hilton et al., 1974; Fries et al., 1990) the elevated AST and ALT levels do not necessarily indicate liver injury, because the enzymes are also found in skeletal muscles.

The liver perfusion experiments revealed a clear prevalence of the hepatic actions of dexamethasone over those ones exerted by the arthritis disease. Livers from adjuvant-induced arthritic rats present reduced glucose synthesis from L-alanine, as previously demonstrated (Caparroz-Assef et al., 1998; Fedatto Jr et al., 1999; Yassuda-Filho et al., 2003). Actually, the overall catabolism of L-alanine was nearly 50% reduced when compared with normal rats. Upon dexamethasone treatment the L-alanine metabolism reached values similar to those ones of untreated normal rats. It should be pointed out, however, that there was a diversion of the carbon flux from glucose production to L-lactate and pyruvate production. These findings indicate that although L-alanine uptake by the liver and probably the aminotransferase reaction were stimulated in DEX-treated arthritic rats, the gluconeogenic capacity of the livers was limited by some factors. The observation that a similar pattern of response was found in livers from DEX-treated normal rats (Table 4) reveals that these alterations are mainly due to the drug action.

It should be remarked that despite the lack of significant glucose production increment upon L-alanine infusion, the steady-state rates of basal glucose release by livers from

dexamethasone-treated rats (normal or arthritic conditions) were substantially higher than those ones of corresponding untreated rats suggesting that the livers presented a substantial amount of residual glycogen even after 24 hours of starvation. High contents of glycogen were indeed found by Exton et al. (1976) and Mokuda and Sakamoto (1997) in livers from glucocorticoid-treated fasted rats. The experiments performed in the perfused livers from fed rats reveal that the high glycogen content can be explained by a high capacity of the livers to accumulate glycogen and not by a reduced capacity of releasing glucose from glycogen under the influence of glucagon. Actually, the glucagon-induced glycogenolysis was more pronounced in livers from dexamethasone-treated rats, being the relative increment more accentuated in livers from arthritic rats. It should be remembered that without dexamethasone livers from arthritic rats present an impaired capacity of releasing glucose under the stimulus of glucagon (Fedatto-Júnior et al., 2002). Again, the positive effects of dexamethasone on glycogen synthesis and glucagon action predominated over the negative effects of the arthritis disease.

A question that must be raised is how the results found in the perfused livers can be reconciled with the changes in blood glucose and insulin concentrations measured *in vivo*. In the first place it should be considered that in isolated perfused liver experiments, the influences of hormonal and humoral factors are excluded, allowing to evaluate the metabolic capacity of the organ. It is generally accepted that the liver contributes to glucose intolerance following glucocorticoids administration through an increase of endogenous glucose production (Jones et al., 1993). A direct effect on the activities of gluconeogenic enzymes has been pointed as a part of the mechanisms by which glucocorticoids stimulate the hepatic glucose synthesis (Jones et al., 1993; Jin et al., 2004). However, such a stimulatory effect is not supported by the results obtained in the present work, because there was not significant extra glucose production from L-alanine in livers from fasted rats. Similar result was found earlier by Exton et al. (1976) who verified that cortisol treatment does not increase glucose production from L-lactate in perfused livers from fasted rats. There is, however, evidence that the rates of hepatic gluconeogenesis in dexamethasone-treated rats may be considerably higher *in vivo* than in the isolated perfused livers even in the absence of direct modulation on key enzymes of gluconeogenic pathways. It is well known that glucocorticoids increase the free aminoacids supply to the liver by their net protein catabolic effects on peripheral tissues (Smith and Long, 1967; Sutherland and Haynes,

1967; Wise et al., 1973). Moreover, glucose production from aminoacids in the perfused rat liver has been demonstrated to be half-maximal at physiologically normal aminoacid concentrations and approaches saturation only at three times the normal levels (Malette et al., 1969). Glucocorticoids have also a permissive action on the stimulation of hepatic gluconeogenesis by glucagon and catecholamines (Wise et al., 1973; Friedman et al., 1967; Exton et al., 1972, Mokuda and Sakamoto, 1997).

The increased content of glycogen found in dexamethasone-treated rats would also correlate with the increased production of glucose from exogenously supplied aminoacids. It is generally accepted that approximately two thirds of the hepatic glycogen originates from the novo formed glucose (Ku wajima et al., 1986). The gluconeogenic aminoacid supply was probably maintained elevated by dexamethasone-induced protein degradation in peripheral tissues allowing livers to accumulate substantial amounts of glycogen even in the fasting condition. It seems thus plausible to assume that both an increased gluconeogenesis and high glycogen levels contributed to the elevated blood glucose concentration found in fasted normal and arthritic rats following dexamethasone treatment.

Some of the metabolic changes induced by the arthritis disease or by dexamethasone administration may also be consequences of insulin actions. It is known that under physiological conditions, insulin in the liver suppresses protein catabolism, reduces the activity of the gluconeogenic pathways and activates glycogen synthesis acting by several hepatic and peripheral effects (Mondon and Mortimore, 1967; Pilks and Granner, 1992; Klein et al., 2002), including a inhibitory action on the activities of the key enzymes of gluconeogenesis (Jefferson et al., 1968; Pilks and Granner, 1992). In the fasted arthritic rats, the insulin level was 41% lower than that in the normal rats. The exact metabolic consequences of this reduction cannot be inferred from the available data, because information is lacking concerning the levels of conterregulatory hormones in the arthritic rats. However, the lower level of insulin could be an explanation for the increased level of blood glucose found in arthritic rats (Table 2) as well as for the reduced content of hepatic glycogen (Fedatto-Júnior et al., 2002).

The insulin level was markedly increased in arthritic rats following dexamethasone administration. Blood glucose concentration was also increased though less intensily. These

results are probably reflecting a condition of insulin resistance, a common consequence of glucocorticoid administration. Insulin resistance is characterized by a diminution of the ability of insulin to stimulate glucose utilization leading to several metabolic modifications, including glucose intolerance with hyperglycemia and a compensatory increase in plasma concentration of insulin. Glucocorticoid-induced insulin resistance in adipocytes and muscles is well characterized (Boyle, 1993). However, the data regarding the hepatic insulin resistance are contradictory: whereas insulin resistance was reported with respect to lipogenesis (Amatruda et al., 1982), lack of resistance or permissive effect on insulin action was reported regarding the glucose metabolism (Probst and Jungermann, 1983; Fleig et al., 1985; Mokuda et al., 1991; Klein et al., 2002). Our data are not in accordance with a decreased responsiveness of liver glucose metabolism toward insulin in dexamethasone-treated rats. Insulin is the only hormone that induces liver glycogen synthesis and we have found evidence that this pathway is stimulated in dexamethasone-treated rats under all experimental conditions (fed or fasted, normal or arthritic rats). It seems likely that the high insulin level contributed to elevated capacity of the livers from dexamethasone treated rats to accumulate glycogen and to increase blood glucose concentration.

In summary, the data of the present work reveal that the suppression of the development of clinical manifestations of adjuvant-induced arthritis by dexamethasone treatment is not associated with any benefits on the changes caused by the disease on body weight gain and on hepatic metabolism. In contrast, the metabolic alterations induced by dexamethasone were stronger, overcoming those ones induced by the arthritis disease. It seems that the peripheral effects of dexamethasone, including increased aminoacids supply and increased insulin levels are more important in controlling the hepatic metabolism in intact rats than its direct effects on the organ.

References

Åkesson A, Berglund K, Karlsson M. Liver function in some common rheumatic disorders. *Scand J Pharmacol*, 9: 81-88, 1980.

Allison AC, Lee SW. The mode of action of anti-rheumatic drugs. I. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects effects of glucocorticoids. *Prog Drug Res*, 33: 63-81, 1989.

Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol*, 43: 176-182, 1992.

Amatruda JM, Danahy SA, Chang CL. The effect of glucocorticoids on insulin-stimulated lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J*, 212: 135-141, 1982.

Bendele AM, Chlipala ES, Schereer J, Frazier J, Sennello G, Rich WJ, Edwards CKIII. Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 2648-2659, 2000.

Bendele AM, McComb J, Gould T, Frazier J, Chlipala ES, Seely J, Kieft G, Wolf J, Edwards CKIII. Combination benefit of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEGsTNF-TI) and dexamethasone or indomethacin in adjuvant arthritic rats. *Inflamm Res*, 48:453-460, 1999.

Bergmeyer HU, Bernt E. Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1205-1212.

Bergmeyer HU. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1794-1801.

Boyle PJ. Cushing's disease, glucocorticoid excess, glucocorticoid deficiency, and diabetes. *Diabetes Res*, 1: 301-308, 1993.

Brennam FM, Maini RN, Feldmann M. TNF- α : pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol*, 31: 293-298, 1992.

Brinkman V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th 1 and Th 2 cytokine production in human CD4⁺ effector T cells generated from CD45RO and CD45RO⁺ subsets. *J Immunol* 155: 3322-3328, 1995.

Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT. Negative cross-talk between RelA and the

glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the anti-inflammatory action of glucocorticoid. *Mol Endocrinol*, 9: 401-412, 1995.

Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Nascimento EA, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide on energy metabolism in livers from adjuvant-induced arthritic rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 99: 93-116, 1998.

Choy EHS, Panayi GS, 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344: 907-916, 2001.

Czok R, Lamprecht W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and glycerate-2-phosphate. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1446-1451.

Da Silva JAP, Bijlsma JWJ. Optimizing glucocorticoid therapy of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Amer*, 26: 859-880, 2000.

Dirlewanger M, Schneiter PH, Paquot N, Jequier E, Rey V, Tappy L Effects of glucocorticoids on hepatic sensitivity to insulin and glucagon in man. *Clin Nutr*, 19: 29-34, 2000.

Dumas JF, Simard G, Roussel D, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Brit J Nutr*, 90: 969-977, 2003.

Exton JH, Friedmann N, Wong EH, Brineaux JP, Corbin JD, Park CR. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J Biol Chem*, 247: 3579-3588, 1972.

Exton JH, Miller TB, Harper SC, Park CR. Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid-replaced rats. *Am J Physiol*, 230: 163-170, 1976.

Fathalla B, Hamada K, Vannier E, Smith D, Edwards C, Roubenoff R. Effects of aging and cytokine blockade on inflammatory cachexia. *Clin Exp Rheumatol*, 22: 85-90, 2004.

Fedatto-Júnior Z, Ishii-Iwamoto EL, Amado CB, Maciel ERM, Bracht A, Kelmer-Bracht AM. Glucose phosphorylation capacity and glycolysis in the liver of arthritic rats. *Inflamm Res*, 49: 128-132, 2000.

Fedatto-Júnior Z, Ishii-Iwamoto EL, Amado CB, Vicentini G, D'Urso-Panerari, Bracht A, Kelmer-Bracht AM. Gluconeogenesis in the liver of arthritic rats. *Cell Biochem Funct*, 17: 271-278, 1999.

Fedatto-Júnior Z, Ishii-Iwamoto EL, Caparroz- SM, Vicentini GE, Bracht A, Kelmer-Bracht AM. Glycogen levels and glycogen catabolism in livers from arthritic rats. *Mol Cell Biochem*, 229, 1-7, 2002.

Fleig WE, Nöther-Fleig G, Steudter S, Enderle D, Ditschuneit H. Regulation of insulin binding and glycogenolysis by insulin and dexamethasone in culture hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*, 1985: 847: 352-361

Friedmann N, Exton JH, Park CR. Interaction of adrenal steroids and glucagon on gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 29, 113-119, 1967.

Fries JF, Gurkirpal S, Lernerst L, Furst DE. Aspirin, hydroxychloroquine, and hepatic enzyme abnormalities with methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 33: 1611-1619, 1990.

Gutman I, Wahlefeld AW. (+)Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 1974, pp. 1464-1468.

Hamada K, Vannier E, Smith DE, Abad LW, Roubenoff R. Inflammatory cachexia induces sarcoactive cytokine gene expression in a rat model of adjuvant arthritis. *FASEP J*, 14; A572, 2000.

Hilton A, Boyes BE, Smith PJ, Sharp J, Dymock IW. Liver disease in patients with joint symptoms. *Ann Rheum Dis*, 33: 540-547, 1974.

Jefferson LS, Exton JH, Butcher RW, Sutherland EW, Park CR. Role of adenosine 3',5'-monophosphate in the effects of insulin and anti-insulin serum on liver metabolism. *J Biol Chem*, 243, 1031-1038, 1968.

Jin JY, DuBois DC, Alman RR, Jusko WJ. Receptor/Gene-mediated pharmacodynamic effects of methylprednisolone on phosphoenolpyruvate carboxykinase regulation in rat liver. *J Pharmacol Exper Therap*, 309: 328-339, 2004.

Jones CG, Hothi SK, Titheradge A. Effect of dexamethasone on gluconeogenesis, piruvato kinase, pyruvate carboxylase and piruvato dehydrogenase flux in isolated hepatocytes. *Biochem J*, 289: 821-828, 1993.

Kimmig R, Mauch TJ, Kerzl W, Schwabe U, Scholz R. Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of the inhibitory effect on glycolysis and the stimulatory effect on glycogenolysis. *Eur J Biochem*, 136: 609-616, 1983.

Klein HH, Ullmann S, Drenckhan M, Grimmsmann T, Unthan-Fechner K, Probst I. Differential modulation of insulin actions by dexamethasone: studies in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Hepatol*, 37: 432-440, 2002.

Kun F, Kearney EB. Ammonia. In: HU Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic press, New York, 1974, pp. 1801-1806.

Kuwajima M, Golden S, Katz J, Unger RH, Foster DW, McGarry JD. Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem*, 261: 2632-2337, 1986.

Lavagno L, Gunella G, Bardelli C, Soina S, Fresu LG, Viano I, Brunelleschi S. Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factors- α production: role of transcription factor NF- κ B and implication for rheumatoid arthritis therapy. *Eur J Pharmacol*, 501: 199-208, 2004.

Lowe JR, Pickup ME, Dixon JS, Leatham PA, Rhind VM, Wright V, Downie WW. Gamma glutamyl transpeptidase levels in arthritis- a correlation with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis*, 37: 428, 1978.

Mallete LE, Exton JH, Park CR. Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. *J Biol Chem*, 244: 5713-5723, 1969.

Minet-Quinard R, Moinard C, Walrand S, Villie F, Normand B, Vasson NP, Chopineau J, Cynober L. Induction of a catabolic state in rats by dexamethasone: dose or time dependency? *J. Parenter Enteral Nutr* 24, 30-36, 2000.

Mokuda O, Sakamoto Y, Ikeda T, Mashiba H. Sensitivity and responsiveness of glucose output to insulin in isolated perfused liver from dexamethasone-treated rats. *Horm Metab Res*, 23: 53-55, 1991.

Mokuda O, Sakamoto Y. Increased glucagon action on lactate gluconeogenesis in perfused liver of dexamethasone-treated rats. *Biochem Mol Medic*, 62: 65-69, 1997.

Mondon CE, Mortimore GE. Effects of insulin on net carbohydrate alterations in perfused rat liver. *Am J Physiol*, 212, 179-183, 1967.

Moreland LW, O'Deal JR. Glucocorticoids and Rheumatoid Arthritis: Back to the Future? *Arthr Rheumatol*, 46: 2553-2563, 2002.

Odebra BR, Bates PC, Minard DJ. Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem J*, 214, 617-627, 1983.

Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Physiol*, 54: 885-909, 1992.

Prost I, Jungermann K. Short-term regulation of glycolysis by insulin and dexamethasone in cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 135:151-156, 1983.

Rosenthale ME. A comparative study of the Lewis and Sprague Dawley rat in adjuvant arthritis. *Arch Intern Pharmacodyn*, 188: 12-22, 1970.

Roubenoff R, Freemann LM, Smith DE, Abad LW, Dinarello CA, Kehayias JJ. Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia. *Arthr Rheumat*, 40: 534-539, 1997.

Roubenoff R, Rall LC. Humoral mediation of changing body composition during aging and chronic inflammation. *Nutr Rev*, 51: 1-11, 1993.

Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest*, 93, 2379-2386, 1994.

Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthéry Y, Simard G, Titz P. Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, 541: 75-79, 2003.

Scholz R, Bücher T. Hemoglobin-free perfusion of rat liver. In: B. Chance, RW Estabrook, JR Williamson (eds.), *Control of Energy Metabolism*. Academic Press, New York, 1965, pp 393-414.

Silva JCR, Rocha MFG, Lima AAM, Brito GAC, de Menezes DB, Rao VSN. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 β and TNF α in rats with adjuvant arthritis. *Inflamm Res*, 49: 14-19, 2000.

Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*, 106:37S-42S, 1999.

Smith OK, Long CNH. Effect of cortisol on the plasma amino nitrogen of eviscerated adrenalectomized-diabetic rats. *Endocrinology*, 80: 561-566, 1967.

Sutherland EW III, Haynes RC Jr. Increased release of aminoacids from rats thymus after cortisol administration. *Endocrinology*, 80, 288-296, 1967.

Svenson KLG, Lundqvist G, Wide L, Hällgren R. Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: Effects of corticosteroids and antirheumatic treatment. *Metabolism*, 36: 944-948, 1987.

Tataranni PA, Larson DE, Sniker S, Young JB, Flatt JP, Ravussi E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in human. *Am J Physiol*, 271: E317-E325, 1996.

Walsmith J, Abad L, Snyderman L, Lundgren N, Roubenoff R. Interleukin 1- β and tumor necrosis factor- α exhibit different metabolic effects in rheumatoid arthritis. *FASEB J*, 14: A525, 2000.

Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Inter J Cardiol*, 85: 89-99, 2002.

Wise JK, Hendler R, Felig P. Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma aminoacid concentration in man. *J Clin Invest*, 52: 2774-2782, 1973.

Woodward CJH; Emery PW. Energy balance in rats given chronic hormone treatment. 2. effects of corticosterone. *Brit J Nutr*, 61: 445-452, 1989.

Yassuda Filho P, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Lousano SH, Bracht L, Kelmer-Bracht A. The urea cycle in the liver of arthritic rats. *Mol Cellular Biochem*, 243: 97-106, 2003.

Table 01. Effects of dexamethasone treatment on food intake in normal and adjuvant-induced arthritic rats. The results are the means \pm SEM of 7 animals. Pairs of the same letters in each line indicated that the differences between the mean values were statistically significant, as determined by Student's t test ($p < 0.05$).

Treatment duration (days)	Food intake ($\text{g} \times 100 \text{ g body weight}^{-1} \times \text{day}^{-1}$)			
	Normal	Normal + DX	Arthritic	Arthritic + DX
9	$10.50 \pm 0.45^{a,b,c}$	13.27 ± 1.04^a	$6.48 \pm 0.09^{b,d}$	$12.6 \pm 0.22^{c,d}$
14	10.26 ± 0.49^a	11.92 ± 0.84	$7.13 \pm 0.09^{a,b}$	11.33 ± 0.72^b

Tabel 02. Effects of dexamethasone treatment on plasma glucose and insulin levels in normal and adjuvant-induced arthritic rats. Both parameters were evaluated at the 14th day after adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation. The results are the means \pm SEM. Pairs of the same letters in each line indicated that the differences between the mean values were statistically significant, as determined by Student's t test ($p < 0.05$).

Parameters	Animals conditions			
	Normal	Arthritic	Normal + DX	Arthritic + DX
Glucose (mg/dl)	$78.96 \pm 2.88^{a,b}$ (n = 15)	$90.76 \pm 4.98^{a,c}$ (n = 8)	118.70 ± 4.20^b (n = 10)	129.01 ± 3.36^c (n = 8)
Insulin (ng/ml)	$0.26 \pm 0.028^{a,b}$ (n = 8)	$0.153 \pm 0.024^{a,c}$ (n = 10)	N.D.*	$5.36 \pm 0.80^{b,c}$ (n = 10)

(*): not determined.

Table 03. Effects of dexamethasone treatment on plasma enzymes activities in normal and adjuvant-induced arthritic rats. The enzyme activities were evaluated at the 14th day after adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation. The results are the means \pm SEM of 10 animals. Pairs of the same letters in each line indicated that the differences between the mean values were statistically significant, as determined by Student's t test ($p < 0.05$).

Parameters (U/L)	Animals conditions			
	Normal	Arthritic	Arthritic + DX	Control + DX
ALT	$61.33 \pm 1.66^{a,b}$	$51.63 \pm 4.93^{c,d}$	$150 \pm 10.02^{b,c}$	$122.65 \pm 14.38^{a,d}$
AST	$81.33 \pm 3.23^{a,b,c}$	$95.57 \pm 5.0^{a,d,e}$	$167 \pm 15.45^{b,d}$	$176.25 \pm 13.9^{c,e}$
ALP	199.1 ± 11.97^a	235.46 ± 33.75	245.74 ± 15.99^a	203.69 ± 18.48
γ -GT	$1.89 \pm 0.33^{a,b}$	$4.66 \pm 0.49^{a,c,d}$	$0.78 \pm 0.24^{b,c}$	1.11 ± 0.23^d

Table 04. Effects of dexamethasone treatment on metabolic parameters related to L-alanine metabolism in livers from normal and arthritic rats. The data were obtained from the experiments shown in Figure 2 and represent the mean values \pm SEM of the area under the time curves, after subtracting the rates of the metabolites released before L-alanine infusion. Pairs of the same letters in each line indicated that the differences between the mean values were statistically significant, as determined by Student's t test ($p < 0.05$). N_1 represents the sum of ammonia plus ($2 \times$ urea) released, and C_3 the sum of ($2 \times$ glucose) plus (L-lactate + pyruvate) released.

Parameter	Normal (n = 8)	Normal + DX (n = 5)	Arthritic (n = 10)	Arthritic + DX (n = 6)
Glucose	9.09 \pm 0.45 ^a	0	3.46 \pm 0.29 ^a	0
L-lactate	7.19 \pm 0.70 ^{a,b}	16.63 \pm 3.02 ^a	4.27 \pm 0.31 ^{b,c}	14.22 \pm 1.02 ^c
Pyruvate	4.08 \pm 0.52 ^{a,b}	8.95 \pm 0.85 ^{a,c}	2.16 \pm 0.37 ^{b,d}	14.71 \pm 0.493 ^{c,d}
Urea	9.03 \pm 0.78 ^{a,b}	13.74 \pm 0.68 ^{a,d}	3.08 \pm 0.49 ^{b,c}	16.49 \pm 0.87 ^{c,d}
Ammonia	2.21 \pm 0.21 ^{a,b}	8.95 \pm 0.85 ^{a,d}	5.06 \pm 0.78 ^{b,c}	1.87 \pm 0.53 ^{c,d}
Oxygen	16.75 \pm 0.97 ^a	16.35 \pm 2.60	10.89 \pm 1.69 ^a	14.75 \pm 1.51
C_3 units	29.46 \pm 1.15 ^a	25.58 \pm 3.65	13.35 \pm 0.94 ^{a,b}	28.93 \pm 1.07 ^b
N_1 units	20.27 \pm 1.52 ^{a,b}	36.42 \pm 2.04 ^a	11.22 \pm 1.61 ^{b,c}	34.85 \pm 1.83 ^c

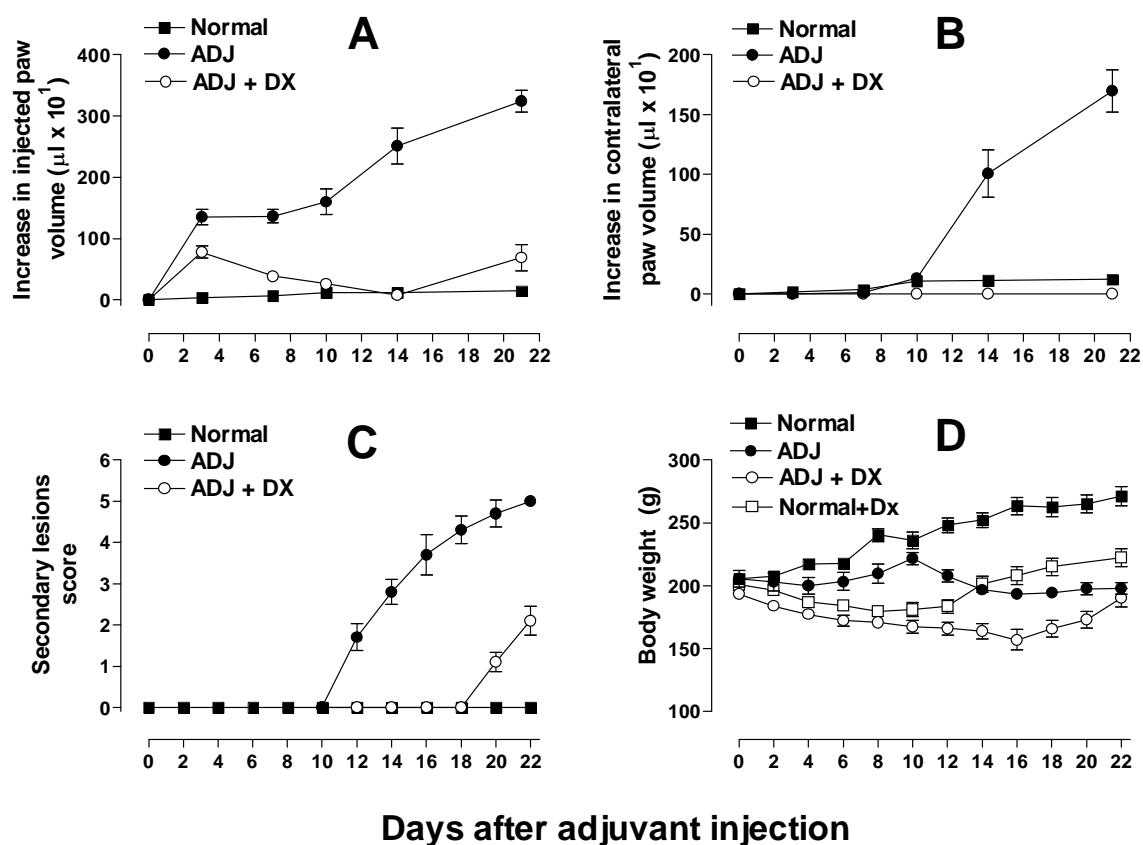


Figure 01. Effects of dexamethasone treatment on the development of the inflammatory response to Freund's adjuvant and on the body weight gain of normal and arthritic rats. (A), Injected paw edema; (B), contralateral paw edema, (C) secondary lesions score, (D) body weight gain. Normal rats (■); adjuvant-induced arthritic rats (▲); normal rats treated with dexamethasone $0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (□); arthritic rats treated with dexamethasone $0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (○). Values are the means \pm SEM of 6-10 experiments.

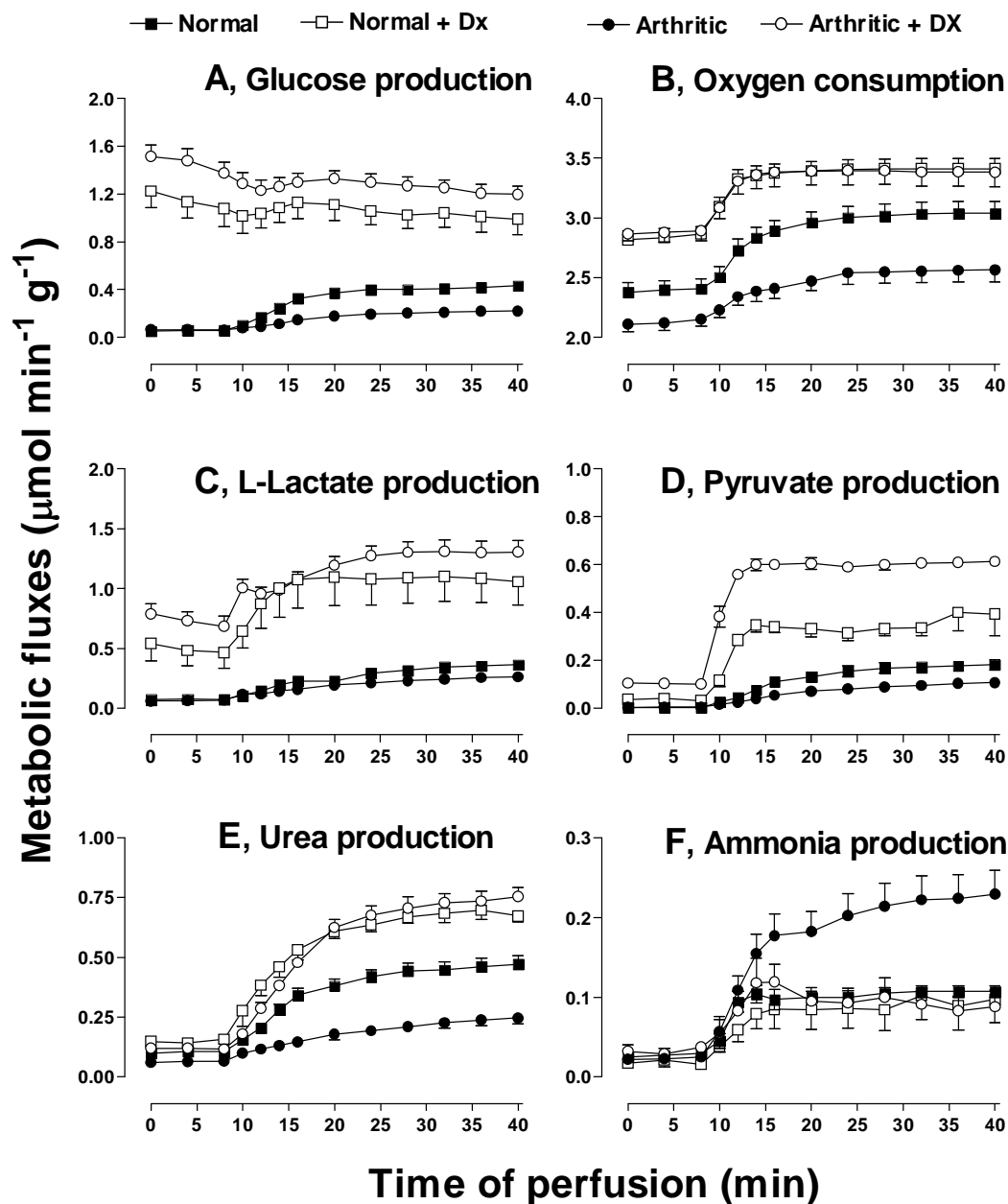


Figure 2. Parameters related to L-alanine metabolism in the perfused livers from normal rats (ν); arthritic rats (λ); dexamethasone-treated normal rats (\square) and dexamethasone-treated arthritic rats (\circ). The livers from 24 h fasted rats, on the 14th day after adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation, were perfused as described in Material and methods. L-alanine (2.5 mM) was infused at 10-40 min of perfusion. The effluent perfusate was sampled in 2-4 min intervals and analyzed for glucose (A), L-lactate (C), pyruvate (D), urea (E) and ammonia (F). Oxygen uptake (B) was followed polarographically. The results in each graph are the means of 5-10 perfusion experiments. Vertical bars represents standard errors of the means.

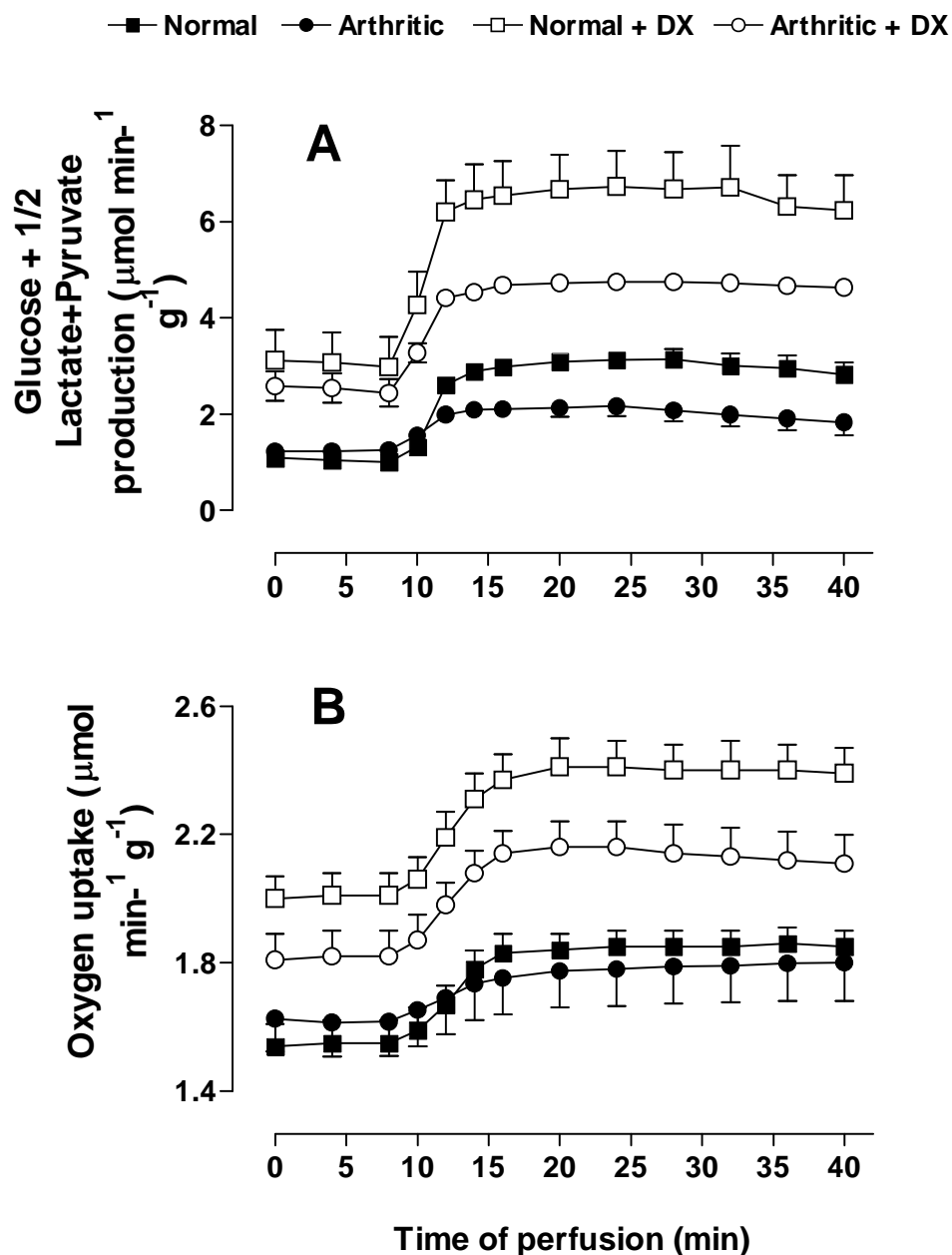


Figure 3. Glycogen catabolism in livers from normal rats (\square); arthritic rats (\bullet); dexamethasone-treated normal rats (\square) and dexamethasone-treated arthritic rats (\circ). The livers from fed rats on the 14th day after adjuvant injection and/or dexamethasone treatment initiation were perfused as described in Material and methods. Glucagon (1.0 nM) was infused at 10-40 min of perfusion. The effluent perfusate was sampled in 2-4 min intervals and analyzed for glucose, L-lactate and pyruvate. The results are expressed as glucose + 1/2 (lactate + pyruvate) productions. Oxygen uptake (B) was followed polarographically. The results in the graph are the means of 6-9 perfusion experiments. Vertical bars represents standard errors of the means.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)