

PAMELLI MARIA DE SOUZA SILVA

**INFLUÊNCIA DA ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE NAS PROPRIEDADES CÁLCIO-
DEPENDENTES DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS E NA
RESPOSTA GLICONEOGÊNICA DE FÍGADOS À
NORADRENALINA**

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
JUNHO - 2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Pamelli Maria de Souza Silva

**INFLUÊNCIA DA ARTRITE INDUZIDA POR
ADJUVANTE NAS PROPRIEDADES CÁLCIO-
DEPENDENTES DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS E NA
RESPOSTA GLICONEOGÊNICA DE FÍGADOS À
NORADRENALINA**

**Dissertação 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 Mestre.**

Orientadora: Dr^a. Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Co-orientadora: Dr^a. Clairce Luzia Salgueiro-Pagadigorria

Maringá

2007

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

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

1. Pamelli Maria de Souza Silva, Eduardo Tanabe, Aparecida Pinto Munhos Hermoso, Ciomar Aparecida Bersani-Amado, Adelar Bracht, Emy L. Ishii-Iwamoto and Clairce Luzia Salgueiro-Pagadigorria. Changes in calcium-dependent membrane permeability properties in mitochondria of livers from arthritic rats. A ser submetido ao periódico Cell Biochemistry and Function.
2. Pamelli Maria de Souza Silva, Lucas Jonatas da Silva, Camila Mariano Orathes, Isabela Maria Baldasso, Clairce Luzia Salgueiro-Pagadigorria, Adelar Bracht e Emy L. Ishii-Iwamoto. Efeitos da noradrenalina sobre a gliconeogênese em fígados de ratos artríticos. A ser submetido.

RESUMO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS — A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória autoimune dos tecidos sinoviais de etiologia desconhecida. Embora as juntas sejam os alvos principais da resposta imune patológica, a AR afeta muitos outros órgãos e cerca de dois terços dos pacientes humanos experimentam uma condição de perda muscular conhecida como caquexia reumatóide. A artrite induzida por adjuvante é um modelo experimental de poliartrite que apresenta muitas das características clínicas da AR. Modificações nas propriedades de sistemas de membranas isoladas, organelas ou órgãos intactos, incluindo o fígado, têm sido demonstradas em ratos com artrite induzida por adjuvante. Foi verificado que embora a artrite não altere a transdução de energia mitocondrial, as mitocôndrias apresentam uma maior sensibilidade aos efeitos induzidos pelo Ca^{2+} , tais como o desacoplamento da fosforilação oxidativa e o inchamento osmótico. É conhecido que as mitocôndrias desempenham funções importantes em várias situações fisio- e patológicas, participando na homeostase do Ca^{2+} celular, incluindo as respostas hepáticas aos agonistas α -adrenérgicos e em eventos celulares ligados à abertura do poro de transição de permeabilidade, tal como na apoptose celular. Levando em conta estas considerações, este trabalho tem dois objetivos principais: (a) verificar em mitocôndrias isoladas se as respostas alteradas ao Ca^{2+} estão relacionadas a uma disfunção da transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) e (b) examinar se a resposta gliconeogênica a um agonista cálcio-dependente está modificada em fígados de ratos artríticos.

MÉTODOS — Ratos machos da linhagem Holtzman, pesando entre 170-200 g e alimentados com uma dieta padrão de laboratório foram utilizados. A artrite 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. Os animais que apresentaram as lesões características da artrite, após 14 ou 15 dias da injeção do adjuvante, foram selecionados para os experimentos.

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas por centrifugação diferencial. O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas foi medido através de um eletrodo tipo

Clark e o inchamento osmótico mitocondrial induzido pela formação do poro de transição de permeabilidade foi monitorado espectrofotometricamente. A captação eletroforética mitocondrial de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi avaliada pela técnica de centrifugação, medindo o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ remanescente no sobrenadante. Todos esses parâmetros foram avaliados na ausência ou na presença de Ca^{2+} e ciclosporina A (CsA), um inibidor do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP).

Os fígados de animais mantidos em jejum prévio de 24 horas foram perfundidos no modo não-recirculante. O líquido de perfusão foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) saturado com uma mistura de O_2 e CO_2 (95:5) através de um oxigenador de membrana e simultaneamente aquecido a 37°C . Os substratos gliconeogênicos L-alanina (2,5 mM), piruvato (1,0 mM), L-lactato (2,0 mM) e sorbitol (2,5 mM) foram dissolvidos no fluido de perfusão. A noradrenalina foi dissolvida em uma solução de ácido ascórbico 1,0 mM e depois acrescida ao fluido de perfusão a uma concentração final de 1,0 μM . Os seguintes compostos foram medidos através de procedimentos enzimáticos padronizados: glicose, L-lactato e piruvato. A concentração de oxigênio no perfusado efluente foi monitorada por polarografia, através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de prata/cloreto.

RESULTADOS — 1) As mitocôndrias de ratos normais sofreram inchaço osmótico significativo somente após adição de Ca^{2+} 20 μM . Em mitocôndrias de ratos artríticos, por outro lado, o inchaço osmótico ocorreu mesmo a uma baixa concentração de Ca^{2+} (1,0 μM). A adição prévia de ciclosporina A, EGTA ou vermelho de rutênio preveniu o inchaço induzido por Ca^{2+} em mitocôndrias de ratos normais ou artríticos.

2) A adição de Ca^{2+} 1,0 μM em mitocôndrias de ratos normais estimulou o estado IV da respiração e causou um decréscimo parcial no coeficiente de controle respiratório (RC) e na razão ADP/O. Em mitocôndrias de ratos artríticos foi observada uma maior estimulação do estado IV da respiração e uma completa perda do controle respiratório. Estes efeitos foram totalmente suprimidos pela adição prévia de CsA.

3) As mitocôndrias de ratos artríticos exibiram um decréscimo significativo na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. O conteúdo máximo de Ca^{2+} na presença de succinato ou de ATP como substratos energizadores foram reduzidos em 83,3% e 22%, respectivamente, em comparação com os valores correspondentes encontrados em mitocôndrias de ratos

normais. Na presença de CsA, as mitocôndrias foram capazes de captar e acumular quantidades maiores de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

4) Em fígados perfundidos de animais normais, a noradrenalina estimulou a gliconeogênese a partir de todos os substratos gliconeogênicos testados. Em termos relativos, o estímulo foi mais pronunciado quando a L-alanina foi o substrato (+44%), seguido pelo L-lactato (+37%) e o sorbitol (+36%). Com piruvato como substrato o estímulo foi menos pronunciado (+4%).

5) Em fígados de ratos artríticos, as velocidades de produção de glicose na ausência da noradrenalina foram menores com L-alanina e piruvato como substratos, mas com L-lactato e sorbitol não foram encontradas diferenças quando comparadas com a condição normal. A noradrenalina estimulou a gliconeogênese quando os substratos foram o L-lactato (+41%) e o sorbitol (+57%), mas nenhuma estimulação significativa foi observada quando os substratos foram a L-alanina e o piruvato.

7) As variações no consumo de oxigênio que ocorreram após a infusão de noradrenalina na presença de vários substratos foram, em termos gerais, de estimulação tanto em fígados de ratos normais como de ratos artríticos. Entretanto, não houve alguma correlação com a gliconeogênese. Quando o substrato foi o piruvato, por exemplo, o incremento relativo no consumo de oxigênio foi igual a 80% e 77% em fígados de ratos normais e artríticos, respectivamente, mas a produção de glicose foi estimulada somente em 4% na condição normal e nenhuma estimulação significativa foi encontrada na condição artrítica.

8) Foram encontradas diferenças na produção de L-lactato e/ou piruvato entre os fígados de ratos normais e artríticos na ausência de noradrenalina. A produção de L-lactato e piruvato a partir de L-alanina foi menor na condição artrítica, mas a produção de L-lactato a partir de sorbitol e de piruvato foi maior quando comparada com a condição normal.

9) Os efeitos da noradrenalina sobre a produção de L-lactato e/ou piruvato dependeram do substrato. Em termos qualitativos os efeitos foram similares em fígados de ratos normais e artríticos, mas diferenças quantitativas e cinéticas foram observadas. A produção de L-lactato e piruvato a partir de sorbitol foi transitoriamente estimulada pela noradrenalina, mas foi encontrada inibição quando o substrato foi a L-alanina. A

noradrenalina inibiu a produção de piruvato a partir de L-lactato e L-alanina como substratos em fígados de ratos normais e artríticos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES — O presente trabalho forneceu evidências de que a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é o evento primário na redução da captação eletroforética de Ca^{2+} e no inchamento osmótico e desacoplamento mitocondrial induzidos pelo Ca^{2+} em mitocôndrias de ratos artríticos, porque estas modificações foram completamente prevenidas pela ciclosporina A, um conhecido inibidor do poro de transição de permeabilidade (PTP). A observação de que em mitocôndrias de ratos artríticos os efeitos induzidos pelo Ca^{2+} ocorreram a uma concentração menor (1,0 μM) do que na condição normal indica que a artrite aumenta a sensibilidade do poro de transição de permeabilidade ao Ca^{2+} . Esta alta sensibilidade poderia favorecer as ações de mediadores e antígenos que induzem a apoptose nas células sinoviais, contribuindo para a patogênese da artrite.

É pouco provável, entretanto, que este fenômeno afete a ação de hormônios que mobilizam Ca^{2+} , porque o efeito estimulatório da noradrenalina sobre a gliconeogênese a partir de L-Lactato e sorbitol, que é Ca^{2+} -dependente, não foi alterado em fígados de animais artríticos. O estímulo da gliconeogênese a partir de L-alanina e piruvato, entretanto, foi suprimido na condição artrítica. Estas diferentes respostas do rato artrítico estão provavelmente relacionadas: a) a capacidade gliconeogênica prejudicada dos fígados quando a L-alanina e o piruvato, mas não o L-lactato e o sorbitol são os precursores gliconeogênicos; b) necessidades específicas dos diferentes substratos para produzir glicose e c) diversidade nos mecanismos de estímulo da gliconeogênese induzida pela noradrenalina a partir dos substratos específicos. O estímulo gliconeogênico da noradrenalina a partir de substratos reduzidos tais como o L-lactato e o sorbitol tem sido atribuído a um aumento na transferência de equivalentes de redução para a mitocôndria. A ativação Ca^{2+} -dependente da fosfoenolpiruvato-carboxicinase e da α -cetoglutarato-desidrogenase com conseqüente aumento na atividade da piruvato-carboxilase são outros mecanismos propostos. Estes mecanismos não foram alterados na artrite induzida por adjuvante já que o estímulo da gliconeogênese a partir de L-lactato e de sorbitol foi preservado. Foi sugerido, por outro lado, que a regulação da gliconeogênese com piruvato como substrato ocorre em um sítio entre a fosfoenolpiruvato e a glicose. Assim, a explicação mais provável para a supressão do

estímulo da gliconeogênese quando o piruvato e a L-alanina foram os substratos é a de que uma inibição em uma etapa que precede a síntese da fosfoenolpiruvato e que não está envolvida na gliconeogênese a partir de L-lactato tenha limitado os mecanismos regulatórios induzidos pela noradrenalina. Esta etapa poderia ser a transferência de equivalentes de redução da mitocôndria para o citosol e, para a L-alanina como substrato, também a reação da alanina-aminotransferase.

ABSTRACT

INTRODUCTION AND AIMS — Rheumatoid arthritis (RA) is a synovial inflammatory autoimmune disease of unknown etiology. Although the joints are the main targets of the pathologic immune response, RA affects many other organs and two-thirds of human patients experience a muscle wasting condition known as rheumatoid cachexia. Adjuvant-induced arthritis is an experimental model of polyarthritis, which presents many of the clinical characteristics of RA. Modifications in the properties of isolated membrane systems, organelles and intact organs, including the liver, have been demonstrated in adjuvant-induced arthritic rats. It was demonstrated that although the mitochondrial energy transduction is not altered, the mitochondria present greater sensitivity to Ca^{2+} addition, including the uncoupling of oxidative phosphorylation and a faster rate of osmotic swelling. It is known that mitochondria play a role in various physio- and pathologic conditions through their participation in the intracellular Ca^{2+} homeostasis, including the liver responses to α -adrenergic agonists and in cellular events linked to permeability transition pore (PTP) opening, such as cellular apoptosis. Taken these considerations in account, this work has two main purposes: (a) to verify in isolated mitochondria if the altered responses to Ca^{2+} are due to a mitochondrial permeability transition dysfunction and (b) to examine if the gluconeogenic responses to a Ca^{2+} -dependent agonist are modified in livers from adjuvant-induced arthritic rats.

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 μl 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. Animals presenting the characteristic lesions at 14 or 15 days after the adjuvant injection were selected for the experiments.

Hepatic mitochondria were isolated by differential centrifugation. Oxygen uptake of isolated mitochondria was measured using a Clark-type electrode and mitochondrial osmotic swelling induced by the formation of permeability transition pore (PTP) was recorded spectrophotometrically. The electrophoretic mitochondrial $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake was evaluated by a centrifugation technique measuring the remained $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in

the supernatant. All these parameters were evaluated in the absence or in the presence of Ca^{2+} and cyclosporin A (CsA), an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore (PTP).

The livers from 24-hours fasted rats were perfused in the non-recirculating system. The perfusion fluid was Krebs/Henseleit-bicarbonate buffer (pH 7.4) saturated with a mixture of O_2 and CO_2 (95:5) by means of a membrane oxygenator and simultaneously heated to 37°C . The gluconeogenic substrates L-alanine (2.5 mM), pyruvate (1.0 mM), L-lactate (2.0 mM) and sorbitol (2.5 mM) were dissolved in the perfusion fluid. Norepinephrine was dissolved in a 1.0 μM ascorbic acid solution and then added to perfusion fluid at a final concentration of 1.0 μM . The following compounds were assayed in the effluent perfusion fluid by means of standard enzymatic procedures: glucose, L-lactate and pyruvate. The oxygen concentration in the outflowing perfusate was monitored continuously, employing a teflon-shielded platinum electrode.

RESULTS — 1) Mitochondria from normal rats suffered significant osmotic swelling only after addition of 20 μM Ca^{2+} . In mitochondria from arthritic rats, on the other hand, osmotic swelling occurred even at a low Ca^{2+} concentration (1.0 μM). The previous addition of cyclosporin A, EGTA or ruthenium red prevented Ca^{2+} -induced swelling in mitochondria from both normal and arthritic rats.

2) The 1.0 μM Ca^{2+} addition in mitochondria from normal rats stimulated the state IV respiration and caused a partial decrease in the respiratory control coefficient (RC) and ADP/O ratio. In mitochondria from arthritic rats a higher stimulation of state IV respiration and a complete abolishment of the respiratory control were found. These effects of Ca^{2+} were also totally suppressed by previous addition of CsA.

3) Mitochondria from arthritic rats exhibited a significant decrease in Ca^{2+} uptake. The maximal Ca^{2+} content in the presence of succinate or ATP was 83.3% and 22% reduced, respectively, in comparison with the correspondent values found in mitochondria from normal rats. In the presence of CsA mitochondria were able to take up and to accumulate higher amounts of Ca^{2+} .

4) In perfused livers from normal rats, norepinephrine increased gluconeogenesis with all gluconeogenic substrates assayed. In relative terms,

stimulation was more pronounced when L-alanine was the substrate (+44%), followed by L-lactate (+37%) and sorbitol (+36%). With pyruvate, the stimulus was less pronounced (+4%).

5) In livers from arthritic rats, the rates of glucose production in the absence of norepinephrine were lower with L-alanine and pyruvate as the substrates, but with L-lactate and sorbitol no differences were found when compared to the normal condition. Norepinephrine increased gluconeogenesis when the substrates were L-lactate (+41%) and sorbitol (+57%), but no significant stimulation was observed when the substrates were L-alanine and pyruvate.

7) The changes in oxygen consumption which occurred upon the infusion of norepinephrine in the presence of various substrates were in general terms of stimulation in both livers from normal and arthritic rats. However, there was not a correlation with the effects on gluconeogenesis. When the substrate was pyruvate, for example, the relative increment in oxygen consumption was equal to 80% and 77% in livers from normal and arthritic rats, respectively, but glucose production was only 4% stimulated in the normal condition and no significant stimulation was found in the arthritic condition.

8) Differences in the lactate and/or pyruvate production were found between the livers from normal and arthritic rats in the absence of norepinephrine. L-lactate and pyruvate productions from L-alanine were lower in the arthritic condition, but L-lactate production from sorbitol and pyruvate production from L-lactate were higher when compared to the values found in livers from normal rats.

9) The effects of norepinephrine on L-lactate and/or pyruvate production depended on the substrate. In qualitative terms the effects were similar in livers from normal and arthritic rats, but quantitative and kinetics differences were found. L-lactate production from pyruvate and sorbitol was transiently stimulated by norepinephrine, but inhibition was found when L-alanine was the substrate. Norepinephrine inhibited pyruvate production from L-lactate and L-alanine as substrates in both normal and arthritic rats.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS — The present work provides evidence that the mitochondrial permeability transition (MPT) is the primary event in the reduction of the electrophoretic Ca^{2+} uptake and in the Ca^{2+} -induced osmotic swelling and

uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria from arthritic rats, because these changes were completely prevented by cyclosporin A, a well known inhibitor of mitochondrial PTP. The observation that in mitochondria from arthritic rats the effects of Ca^{2+} occurred at a lower Ca^{2+} concentration (1.0 μM) than in the normal condition indicates that the arthritis disease increases the sensitivity of the MPT pore to Ca^{2+} . This higher sensitivity may favor the actions of mediators and antigens which trigger apoptosis in the synovium cells, contributing to the pathogenesis of the arthritis disease.

It is unlikely, however, that this phenomenon influences the actions of Ca^{2+} mobilizing hormones, because the stimulatory effect of norepinephrine on gluconeogenesis from L-Lactate and sorbitol, which is known to be Ca^{2+} -dependent, was not altered in livers from arthritic rats. The stimulation of gluconeogenesis from L-alanine and pyruvate, however, was suppressed in the arthritic condition. These different responses in arthritic rats are probably related to: a) an impaired gluconeogenic capacity of livers with L-alanine and pyruvate, but not with L-lactate and sorbitol as the gluconeogenic precursors; b) specific requirements of different substrates to produce glucose and c) diversity in the mechanisms of norepinephrine-induced gluconeogenesis stimulation from specific substrates. The stimulus of gluconeogenesis by norepinephrine from reduced substrate such as L-lactate and sorbitol has been attributed to an increased rate of transfer of reducing equivalent to the mitochondria. A Ca^{2+} -induced stimulation of phosphoenolpyruvate-carboxykinase and of α -ketoglutarate-dehydrogenase with consequent increase in the activity of pyruvate-carboxylase are other proposed mechanisms. These mechanisms seem not to be modified in the arthritis disease, because the gluconeogenesis stimulation from L-lactate and sorbitol was preserved. It was suggested, on the other hand, that regulation of gluconeogenesis stimulation with pyruvate as the substrate occurs at a site between phosphoenolpyruvate and glucose. Therefore, a more likely explanation for the suppression of gluconeogenesis stimulation when pyruvate and L-alanine were the substrates is that an inhibition in a step preceding phosphoenolpyruvate synthesis and not involved in the gluconeogenesis from L-lactate caused a limitation in the norepinephrine-induced regulatory mechanisms. This step could be the transfer of reducing equivalents from mitochondria to the cytosol and, for L-alanine as the substrate, also the reaction of the alanine-aminotransferase.

**Changes in calcium-dependent membrane
permeability properties in mitochondria of livers from
arthritic rats**

Pamelli Maria de Souza Silva, Eduardo Tanabe, Aparecida Pinto Munhos Hermoso,
Ciomar A. Bersani-Amado, Adelar Bracht, Emy L. Ishii-Iwamoto and Clairce Luzia
Salgueiro-Pagadigorria.

*Laboratory of Biological Oxidations, Department of Biochemistry, University of Maringá,
87020900 Maringá, Brazil.*

Addressee for correspondence:

Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Department of Biochemistry

University of Maringá

E-mail: eliwamoto@uem.br

Fax: 55-44-32614896

87.020.900 Maringá, Brazil

ABSTRACT

The involvement of the mitochondrial permeability transition pore in the responses of mitochondria from adjuvant-induced arthritic rats to Ca^{2+} addition was investigated. The respiratory activity, the Ca^{2+} -induced osmotic swelling and the electrophoretic $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake were evaluated in the absence and in the presence of cyclosporin A (CsA), a well known inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore (PTP). The Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition (MPT) process occurred in mitochondria from arthritic rats even in the presence of a low Ca^{2+} concentration. Whereas in the normal condition, the Ca^{2+} -induced uncoupling of oxidative phosphorylation and osmotic swelling were observed in the presence of 10 μM or 20 μM Ca^{2+} concentration, in the arthritic condition, these events occurred at 1.0 μM concentration. In addition, mitochondria from arthritic rats presented an impaired ability to accumulate $^{45}\text{Ca}^{2+}$. All these effects were completely prevented by the administration of cyclosporin A. The results of the present study suggest that the higher sensitivity of mitochondria from arthritic rats to Ca^{2+} -induced MPT may be an important factor in the pathogenesis of the arthritis disease.

Keywords: mitochondria, mitochondrial permeability transition, calcium, arthritis,

Abbreviations: CsA, cyclosporin A; PMSF, phenylmethyl-sulfonylfluoride; MPT, mitochondrial permeability transition; PTP, mitochondrial permeability transition pore; RR, ruthenium red.

Short title: Arthritis and mitochondrial calcium-dependent permeability properties

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a synovial inflammatory autoimmune disease of unknown etiology. Although the joint is the main target of the pathologic immune response, RA affects many other organs and two-thirds of human patients experience a muscle wasting condition known as rheumatoid cachexia¹.

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.² It has been shown that adjuvant arthritis induces modifications in the phospholipid and fatty acid membrane composition as well as in the fluidity of microsomes, mitochondria and plasma membranes.^{3,4,5} The reported changes in membrane-bound enzyme activities, including microsomal drug metabolizing enzymes^{6,7} and glucose-6 phosphatase activity⁸ have been attributed to modification of the membrane properties. Changes in mitochondria from arthritic rats have also been demonstrated. Barrit and Whitehouse⁷ verified that they present greater sensitivity to the uncoupling action of Ca^{2+} , as indicated by stimulation of succinate oxidation, a decreased ability to accumulate Ca^{2+} and a faster rate of Ca^{2+} -induced osmotic swelling. In a previous work we have also found an impaired capacity of energy-dependent swelling and an increased sensitivity to the uncoupling action of the anti-inflammatory drug nimesulide.^{9,10} All these changes seem not to be consequences of an impairment of the protonmotive force generator, because we have not found differences in the NADH oxidase and ATPase activities nor in the ADP/O ratios and in the respiratory control ratios.¹⁰

It has been accepted that, apart from their essential function in energy-generation within the cells, mitochondria are involved in many physiological and pathological

processes, through the regulation of an inner membrane channel, the permeability transition pore (PTP). PTP is responsible for the mitochondrial permeability transition (MPT) when mitochondria become nonspecifically permeable to ions and solutes of sizes ≤ 1500 Da.^{11,12}

It is likely that many of the previously reported alterations of the mitochondria from arthritic rats, particularly the responses to Ca^{2+} addition⁷ are related to the mitochondrial permeability transition. Thus, this work was planned in order to test this possibility. The effects of calcium in inducing a permeability transition and uncoupling of oxidative phosphorylation as well as the electrophoretic $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake were evaluated in the absence and in the presence of cyclosporin A (CsA), a well known inhibitor of PTP.¹³

MATERIALS AND METHODS

Materials

ADP, ATP, succinate and ruthenium red were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). $^{45}\text{CaCl}_2$ was purchased from NEN Life Science Products (Boston, MA, USA). Cyclosporin A (CsA) was provided by Dr. Willian S. Taguchi (Maringá, Brazil). All the other reagents were of 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). Adjuvant arthritis was induced by an intradermal injection of 100 μl 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. Animals showing the characteristic lesions at 14 or 15 days of adjuvant injection were selected for the experiments.¹⁴ All experiments were done in accordance with the world-wide accepted ethical guidelines for animal experimentation.

Preparation of mitochondria

The livers were homogenized in a specific extraction medium, using a loose-fitting Dounce homogenizer.¹⁵ The homogenate was fractionated by sequential centrifugations at $536 \times g$ and $7080 \times g$, for 10 min. After two wash cycles by suspension and centrifugation at $6392 \times g$, the final mitochondrial pellet was suspended in a small volume of medium to give a protein concentration of 70-80 mg/ml. All operations were performed at 0-4 °C. For the measurement of oxygen and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake, the extraction medium contained: 0.2 M mannitol, 0.075 M sucrose, 1.0 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 mM EGTA, 0.1 mM PMSF and 50 mg% fatty acid-free bovine serum albumin (w/v). The final mitochondrial pellet was washed and suspended in the same medium, without EGTA. For swelling measurements, the extraction medium was composed of 0.25 M sucrose, 0.01 M Hepes buffer (pH 7.4) and 0.1 mM PMSF. The same medium was used for suspending the final mitochondrial pellet.

Protein determination

The protein content of mitochondria was determined according to Lowry *et al.*¹⁶ using bovine serum albumin as standard.

Determination of mitochondrial oxygen consumption, ADP/O ratio and respiratory control ratio (RC)

Oxygen uptake was measured at 37 °C using a Clark-type electrode positioned in a closed plexi-glass chamber. The reaction medium contained 0.25 M mannitol, 10 mM KCl, 5 mM potassium phosphate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 50 mg% fatty acid-free bovine serum albumin (w/v). Mitochondria were added at varying amounts of protein concentrations (0.75 – 1.0 mg/ml). When required, the following compounds were added to the incubation medium either alone or in association: 0.2 mM EGTA; CaCl₂ (1.0, 10 or 20 µM) and 1.0 µM cyclosporin A. The reaction was initiated by the addition of 10 mM succinate. After nearly five min, ADP-stimulated respiration (state III respiration) was measured by addition of 0.25 µmoles ADP. The ADP/O ratio was calculated according to Chance and Williams.¹⁷ The respiratory control ratio (RC) was determined as the rate of active respiration (state III respiration) divided by the rate of respiration after ADP exhaustion (state IV respiration).

Mitochondrial swelling

The formation of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) was assayed essentially as described by Bernardi.¹⁸ Mitochondria (0.2 - 0.4 mg/ml) were suspended in a medium containing 0.125 M sucrose, 0.065 M KCl, 2 µM rotenone, 0.1 mM potassium phosphate and 0.01 M Hepes buffer (pH 7.4) in a final volume of 2.0 ml, at 25 °C. After a 3 min equilibration period, the following substances were added alone or in different combinations: CaCl₂ (1.0 or 20 µM); 5 µM ruthenium red; 1.0 µM cyclosporin A and 0.2 mM EGTA. Mitochondria were energized by the addition of 5 mM succinate. The mitochondrial swelling was recorded spectrophotometrically as the decrease in extinction at 540 nm.

Mitochondrial calcium transport

The electrophoretic mitochondrial $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake was measured at 37 °C in the presence of 1.0 mM succinate¹⁹ or 5.0 mM ATP.²⁰ The incubation medium contained 0.125 M sucrose, 0.065 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.2 mM potassium phosphate, 3.0 mM Hepes buffer (pH 7.2) 2 μM rotenone, 20 μM CaCl_2 and 0.015 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$. Mitochondria (0.15 - 0.25 mg/ml) were incubated in final volumes of 1-2 ml. After 3 min, mitochondria were energized by the addition of 1.0 mM succinate or 5.0 mM ATP, in the absence or in the presence of 1.0 μM cyclosporin A. Uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was measured by centrifugation technique. The reaction was stopped at appropriate time intervals by v/v dilution of 200 μl aliquots in a cold medium containing 0.125 M sucrose, 0.065 M KCl, 0.2 mM potassium phosphate, 3.0 mM Hepes buffer (pH 7.2) 2 μM rotenone and 1.0 mM LaCl_3 . The samples were quickly centrifuged for 5 min at $13400 \times g$ and 100 μl aliquots were counted for $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by liquid scintillation spectrometry (Packard Tri-Carb 2100TR scintillation counter). The BCS (Amersham Bioscience) scintillation solution was used. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -uptake was calculated as the difference between the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ existing in the supernatant just before succinate addition and that after the addition of succinate. With this procedure, either the passive fluxes of calcium or the unspecific binding of calcium to the mitochondrial membrane were discounted.

Analysis of the data

The data in Figures and Tables were expressed as mean $\pm$ standard error (SEM). The statistical significance of the differences between parameters among the four

experimental series in the Ca^{2+} uptake experiments was evaluated by means of two-way analysis of variance. Significant differences among means were identified by Newman-Keuls testing. The respiratory and the swelling parameters were evaluated by means of Student's t-test. 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.

RESULTS

Mitochondrial swelling induced by the mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening in mitochondria from normal and arthritic rats

Fig. 1 illustrates typical experiments of swelling induced by Ca^{2+} in mitochondria from normal and arthritic rats. The mean values calculated from the curves, i.e., the maximal amplitude of swelling at 15 minutes and the lag phase time are also indicated. Although similar mitochondrial protein contents were used in the assays: 0.49 ± 0.08 mg/ml ($n = 6$) for normal condition and 0.40 ± 0.03 ($n=6$) for arthritic condition, the initial absorbance of the suspensions was lower with mitochondria isolated from arthritic rats in comparison with mitochondria from normal rats. The initial absorbance varied from 0.4 to 0.65 and from 0.7 to 1.43 in the arthritic and normal conditions, respectively. When $1.0 \mu\text{M}$ Ca^{2+} was added to mitochondria from normal rats, no significant swelling was observed for nearly 13 min (Fig. 1A). After this time a slow and progressive swelling occurred. With $20 \mu\text{M}$ Ca^{2+} the lag phase was significantly reduced and the amplitude of swelling at 15 min was higher than that one

observed with 1.0 μM Ca^{2+} . In the presence of 1.0 μM cyclosporin A, 0.2 mM EGTA or 5.0 μM ruthenium red, a strong prevention of swelling was found. The responses of mitochondria from arthritic rats were significantly modified (Fig. 1B). Even at a low Ca^{2+} concentration (1.0 μM), swelling occurred with a shorter lag phase and with an amplitude similar to that observed in the presence of a high Ca^{2+} concentration (20 μM). The previous addition of 1.0 μM cyclosporin A, 0.2 mM EGTA or 5.0 μM ruthenium red also prevented swelling induced by 20 μM Ca^{2+} .

Oxygen consumption of liver mitochondria from normal and arthritic rats and the influence of calcium and cyclosporin A

Table 1 shows the effects of Ca^{2+} and CsA on the oxygen consumption rates (state IV respiration) and the respiratory parameters RC and ADP/O ratios of mitochondria from normal and arthritic rats. In the absence of Ca^{2+} the state IV respiration and the RC and ADP/O ratios of mitochondria from arthritic rats did not differ from those ones of the normal condition. However, significant modifications were observed in the presence of Ca^{2+} . Whereas in mitochondria from normal rats, 1.0 μM Ca^{2+} addition caused a stimulation of nearly 40% in state IV respiration and partial decreases in the RC and ADP/O ratios, in mitochondria from arthritic rats a higher stimulation of state IV respiration (+170%) and a complete abolishment of the respiratory control were found. Similar changes in mitochondria from normal rats were observed only with 10 μM Ca^{2+} or 20 μM Ca^{2+} . In mitochondria from arthritic rats, further stimulation of state IV respiration was found in the presence of 10 and 20 μM Ca^{2+} .

When cyclosporin A was previously added to the incubation medium the effects caused by Ca^{2+} addition were totally suppressed in mitochondria from both normal and arthritic rats and the values of all respiratory parameters approached those of the respective controls in the absence of Ca^{2+} ions. The only exception was the respiratory control ratios of mitochondria from arthritic rats in the presence of $20\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$ which were only partially prevented by CsA.

Calcium uptake by rat liver mitochondria from normal and arthritic rats and the effects of CsA

Fig. 2 shows the time courses of electrophoretic $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in mitochondria energized with ATP (panel A) or succinate (panel B). The addition of ATP to mitochondria from normal rats caused a progressive increase in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake during the first 10 min. After this time, the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ content remained at high levels during the rest of the incubation period (up to 20 min). CsA addition caused a slight modification in the Ca^{2+} uptake kinetics. The initial rates were lower until 10 min, but after this time Ca^{2+} uptake increased, achieving a mean steady-state rate 25% higher than that one observed in the absence of CsA. In mitochondria from arthritic rats, there was a decrease in both the initial rates of Ca^{2+} uptake and in the steady-state rates, so that the maximum value of Ca^{2+} content (at 20 min) was 22 % reduced in comparison with the normal condition. In the presence of CsA, however, mitochondria from arthritic rats were able to take up and to accumulate Ca^{2+} at rates comparable to those of mitochondria from normal rats in the presence of CsA.

The kinetics of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake driven by succinate oxidation differed substantially from that one observed with ATP (Fig. 2B). In mitochondria from normal rats, there

was a rapid increase in the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ content, with a maximum around 5 min. After this maximum, the amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ progressively decreased, reaching negligible values after 20 minutes of incubation. This release of accumulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ is probably the consequence of an imbalance between uptake and efflux rates, the latter being the dominant process after five minutes of succinate addition. In our previous work we have attributed this phenomenon to the opening of a permeability transition pore, because CsA addition was able to prevent the Ca^{2+} release during the entire incubation time.¹⁵ In the present work, however, CsA did not prevent totally the release of Ca^{2+} from mitochondria and modifications in the Ca^{2+} uptake kinetics were also found. The initial rates of Ca^{2+} uptake were lower, as was also found with ATP, and the maximum value was achieved 5 min later. In spite of this, during the rest of the incubation period the mitochondria were able to accumulate higher amounts of Ca^{2+} when compared with the values found in the absence of CsA.

Mitochondria from arthritic rats exhibited a significant decrease in Ca^{2+} uptake when compared with mitochondria from normal rats. The maximal Ca^{2+} content which was reached at 2 min of incubation was only 16.7% of the maximum value found in mitochondria from normal rats. When mitochondria were pre-incubated with CsA, the mitochondrial Ca^{2+} content was substantially increased. The maximum Ca^{2+} content, which was equal to $15.25 \pm 3.11 \text{ nmol mg}^{-1}$ protein at 2 min was increased to $43.71 \pm 3.11 \text{ nmol mg}^{-1}$ protein. After this time, the Ca^{2+} contents progressively decreased but they remained higher than those observed in the absence of CsA.

DISCUSSION

The present work provides evidence that the mitochondrial permeability transition (MPT) is the primary event in the reduction of electrophoretic Ca^{2+} uptake and in the Ca^{2+} -induced swelling and uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria from arthritic rats, because these changes were completely prevented by cyclosporin A, a well known inhibitor of mitochondrial PTP.¹³

It is accepted that MPT is due to the opening of the inner mitochondrial pore (PTP) under the influence of several factors, including high intramitochondrial Ca^{2+} levels.^{18,21,22} Most of the intramitochondrial calcium content is regulated by a voltage-dependent calcium uniport and a Na-independent $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ transport which catalyse, respectively, the calcium uptake and efflux through the inner mitochondrial membranes. Consistently, we observed that ruthenium red, a classical inhibitor of the voltage-dependent calcium uniport system, was able to prevent the Ca^{2+} -induced swelling in liver mitochondria from both normal and arthritic rats.

It is likely that the different lag phase times observed in mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} at low (1.0 μM) and at high (20 μM) concentrations in the normal condition represent the different time period of intra-mitochondrial Ca^{2+} accumulation which is required to open the CsA-sensitive PTP.^{22,23} The finding that mitochondria from arthritic rats suffered Ca^{2+} -induced swelling at a lower Ca^{2+} concentration (1.0 μM) and with a shorter lag phase indicates that the CsA-sensitive PTP was more likely to be opened in the arthritic condition even if the mitochondria contain a low amount of Ca^{2+} . This interpretation is supported by the concomitant changes observed in the respiratory parameters and in the mitochondrial Ca^{2+} uptake. Whereas in normal conditions, mitochondria were only partially uncoupled by 1.0 μM Ca^{2+} , complete

uncoupling of oxidative phosphorylation was observed in the arthritic condition. It seems plausible to suppose that just after the initiation of Ca^{2+} accumulation, i.e., in the presence of low amounts of calcium, the CsA-sensitive PTP opened resulting in an increased influx of ions through the pore, including protons. Besides uncoupling of oxidative phosphorylation, the consequent collapse of the membrane potential led to an impairment of the electrophoretic Ca^{2+} uptake. A disturbance in the mitochondrial protonmotive force generators could also induce similar changes in mitochondrial Ca^{2+} uptake, but this possibility is unlikely because the respiratory parameters ADP/O and respiratory coefficient ratios in the absence of calcium ions or in the presence of calcium plus CsA were not modified in the arthritic state (Table 01), confirming a previous report.¹⁰

The identification of the changes in the permeability transition (MPT) properties could be relevant in attempts to understanding the pathogenesis of arthritis. Ca^{2+} -induced PTP opening has been implicated in some pathophysiological processes, mainly cellular apoptosis and necrosis.²⁴ It is believed that under certain conditions such as ischaemia, hypoxia and oxidative stress the cytoplasmic Ca^{2+} concentration progressively increases, triggering Ca^{2+} influx into the mitochondria. Mitochondrial Ca^{2+} overload promotes PTP opening initiating the complex sequence of the events that can lead cells to necrosis or apoptosis²⁴. It is also recognized that oxidative stress greatly increases the sensitivity of the MPT pore to Ca^{2+} .²³ Oxidants of pyridine nucleotides, glutathione and dithiols have been demonstrated to favor MPT pore opening.²⁵ The increased sensitivity of PTP opening to Ca^{2+} in arthritis may be explained in these terms, because it was earlier demonstrated that hepatocytes isolated

from arthritic rats present reduced levels of soluble thiol compounds and increased lipid peroxidation.³

Modifications in membrane lipid composition and properties have been demonstrated in organelles other than mitochondria and also in different tissues of arthritic animals, including liver microsomal and heart mitochondrial and sarcolemmal fractions.^{4,5} So, it is likely that modifications in the Ca^{2+} -dependent membrane permeability observed here in liver mitochondria are also present in mitochondria from other cell types in the arthritic animals.

There is increasing evidence to indicate that apoptosis of the cartilage and cells of the synovial fluid is associated with the development of RA in humans.^{26,27,28,29} It seems plausible, therefore, to suggest from our present work that the higher sensitivity of mitochondria in the arthritic condition to Ca^{2+} -induced MPT may favor the actions of mediators and antigens which trigger apoptosis in the synovium cells, contributing to the pathogenesis of the arthritis disease. In agreement with this suggestion it was demonstrated that fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis are more sensitive to apoptin-induced apoptosis than fibroblast-like synoviocytes from normal patients.³⁰

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX) / Fundação Araucária.

REFERENCES

1. Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol* 1002; **85**: 89-99.
2. Rosenthale ME. A comparative study of the Lewis and Sprague Dawley rat in adjuvant arthritis. *Arch Intern Pharmacodynamic* 1970; **188**: 12-22.
3. Ishizuki S, Fujihira E. Peroxidative status of isolate hepatocytes from adjuvant arthritics rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1984; **44**: 431-443.
4. Buchar E, Janku I. The effect of adjuvant-induced arthritis on rat liver microsomal phospholipid metabolism. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 1985; **7**: 468-472.
5. Nemez G, Bor P, Lepran I, Koltai M, Szekeres L (1986) Membrane phospholipids and fatty acid changes in the mitochondrial and sarcolemmal fractions in adjuvant arthritic rats. *J Mol Cell Cardiol* 1986; **18**: 739-747.
6. Morton DM, Chatfield DH. The effects of adjuvant- induced arthritis on the liver metabolism of drugs in rats. *Biochem Pharmacol* 1970; **19**: 473-481.
7. Barrit GJ, Whitehouse MW. Pathobiodynamics effects of extrahepatic inflammation on calcium transport and drug metabolism by rat liver mitochondria in vitro. *Biochem Medicine* 1977; **17**: 99-115.
8. Kelmer Bracht AM, Barbosa dos Santos CP, Ishii-Iwamoto EL, Broetto-Biazon AC, Bracht A. Kinetics properties of the glucose 6-phosphatase of the liver from arthritic rats. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1638**: 50-56.
9. Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Nascimento EA, Bracht A, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide

on energy metabolism in liver from adjuvant induced arthritic rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1998; **99**: 93-116.

10. Caparroz-Assef SM, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bersani-Amado CA, Bracht A, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. The uncoupling effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide in liver mitochondria from adjuvant-induced arthritic rats. *Cell Biochem Funct* 2001; **19**: 117-124.

11. Petrolini V, Nicole A, Contantini P, Colonna R, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1187**: 225-259.

12. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1241**: 139-176.

13. Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 1989; **264**: 7826-7830.

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

15. Salgueiro-Pagadigorria CL, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. Naproxen affects Ca^{2+} fluxes in mitochondria, microsomes and plasma membrane vesicles. *Chem-Biol Interact* 2005; **147**:49-63.

16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1982) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:131-138

17. Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation, *Nature* 1955; **175**: 1120-1121.

18. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 1992; **267**: 8834-8839.
19. Lehninger AL, Vercesi A, Bababunmi EA. Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 1690-1694.
20. Mori S, Yamaguchi M. Calcium-binding protein regucalcin stimulates the uptake of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. *Chem Pharm Bull* 1991; **39**: 224-226.
21. Hunter DR, Haworth RA, Southard JA (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 1976; **251**: 5069-5077.
22. Crompton M, Costi M. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur J Biochem* 1988; **178**: 489-501.
23. Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 1977; **272**: 3346-3354.
24. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; **341**: 233-249.
25. Fontaine E, Bernardi P. Progress on the mitochondrial pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**: 335-345.

26. Itoh K, Hase H, Kojima H, Saotome K, Nishioka K, Kobata T. Central role of mitochondria and p53 in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* 2005; **43**: 277-285.
27. Dubikov AI, Belogolovyykh LA, Medved EE. Apoptosis as a mechanism of autoimmune inflammation in human knee joint. *Bull Exp Biol Med* 2004; **6**: 568-570.
28. Lotz M, Hashimoto S, Kühn K. Mechanism of chondrocytes apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; **7**: 389-391.
29. Nishioka K, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, Kobata T. Apoptosis in rheumatoid arthritis: a novel pathway in the regulation of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 1-9.
30. Tolboom TCA, Zhang YH, Henriquez NV, Nelissen RGHH, Rem T, Noteborn MHM, Huizinga TWJ. Fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis are more sensitive to apoptosis induced by the viral protein, apoptin, than fibroblast-like synoviocytes from trauma patients. *Clin Exp Rheumatol* 2006; **24**: 142-147.

Table 01. *The effects of Ca^{2+} and CsA on oxygen consumption (state IV respiration), respiratory control (RC) and ADP/O ratios of mitochondria from normal or arthritic rats.* Mitochondria (0.75 – 1.0 mg/ml) were added to the reaction medium in the closed vessel of the oxygraph (temperature 37 °C). The reaction medium contained 0.2 mM EGTA or CaCl_2 (1.0, 10 or 20 μM). The reaction was initiated by the addition of 10 mM succinate and oxygen consumption was followed polarographically during nearly 5 min. After this time 250 nmoles ADP was added. Rates of oxygen consumption were computed from the slopes of the polarographic records. The state IV respiration is the rates of oxygen consumption after ADP exhaustion. The ADP/O the respiratory control ratios (RC) were determined as described in the Materials and methods. 1.0 μM cyclosporin A (CsA) was added to the reaction medium nearly 2.0 min before succinate addition. Values are means $\pm$ S.E.M.

Conditions	Ca^{2+} concentrations in the reaction medium						
	CaCl ₂ -free	1.0 μM CaCl ₂		10 μM CaCl ₂		20 μM CaCl ₂	
		- CsA	+ CsA	- CsA	+ CsA	- CsA	+ CsA
State IV respiration							
Normal	10.97 $\pm$ 1.34	15.39 $\pm$ 1.44*	11.52 $\pm$ 1.026	41.73 $\pm$ 3.34*	12.73 $\pm$ 0.41	36.01 $\pm$ 2.65*	16.53 $\pm$ 5.12
Arthritic	12.61 $\pm$ 1.28	37.71 $\pm$ 7.25 [‡]	17.40 $\pm$ 3.62	46.20 $\pm$ 6.78*	18.77 $\pm$ 1.74* [‡]	55.43 $\pm$ 9.29* [‡]	16.41 $\pm$ 2.21
Respiratory control ratios							
Normal	5.53 $\pm$ 0.67	3.12 $\pm$ 0.17*	4.26 $\pm$ 0.69	1.0 $\pm$ 0.0*	3.49 $\pm$ 0.12	1.0 $\pm$ 0.0*	3.09 $\pm$ 0.91
Arthritic	4.77 $\pm$ 0.59	1.0 $\pm$ 0.0* [‡]	3.08 $\pm$ 1.16	1.0 $\pm$ 0.0*	2.65 $\pm$ 0.87	1.0 $\pm$ 0.0*	2.38 $\pm$ 0.56*
ADP/O ratios							
Normal	1.98 $\pm$ 0.01	1.66 $\pm$ 0.12*	1.89 $\pm$ 0.11	N.D.	1.85 $\pm$ 0.08*	N.D.	1.44 $\pm$ 0.38
Arthritic	1.97 $\pm$ 0.04	N.D.	1.33 $\pm$ 0.67	N.D.	1.28 $\pm$ 0.64	N.D.	1.33 $\pm$ 0.46

*Values of normal or arthritic conditions differing statistically from corresponding CaCl₂-free medium values according to the Student's *t*-test ($P < 0.05$)

[‡]Values of arthritic condition differing statistically from corresponding normal condition, according to the Student's *t*-test ($P < 0.05$)

N.D.: Not determined.

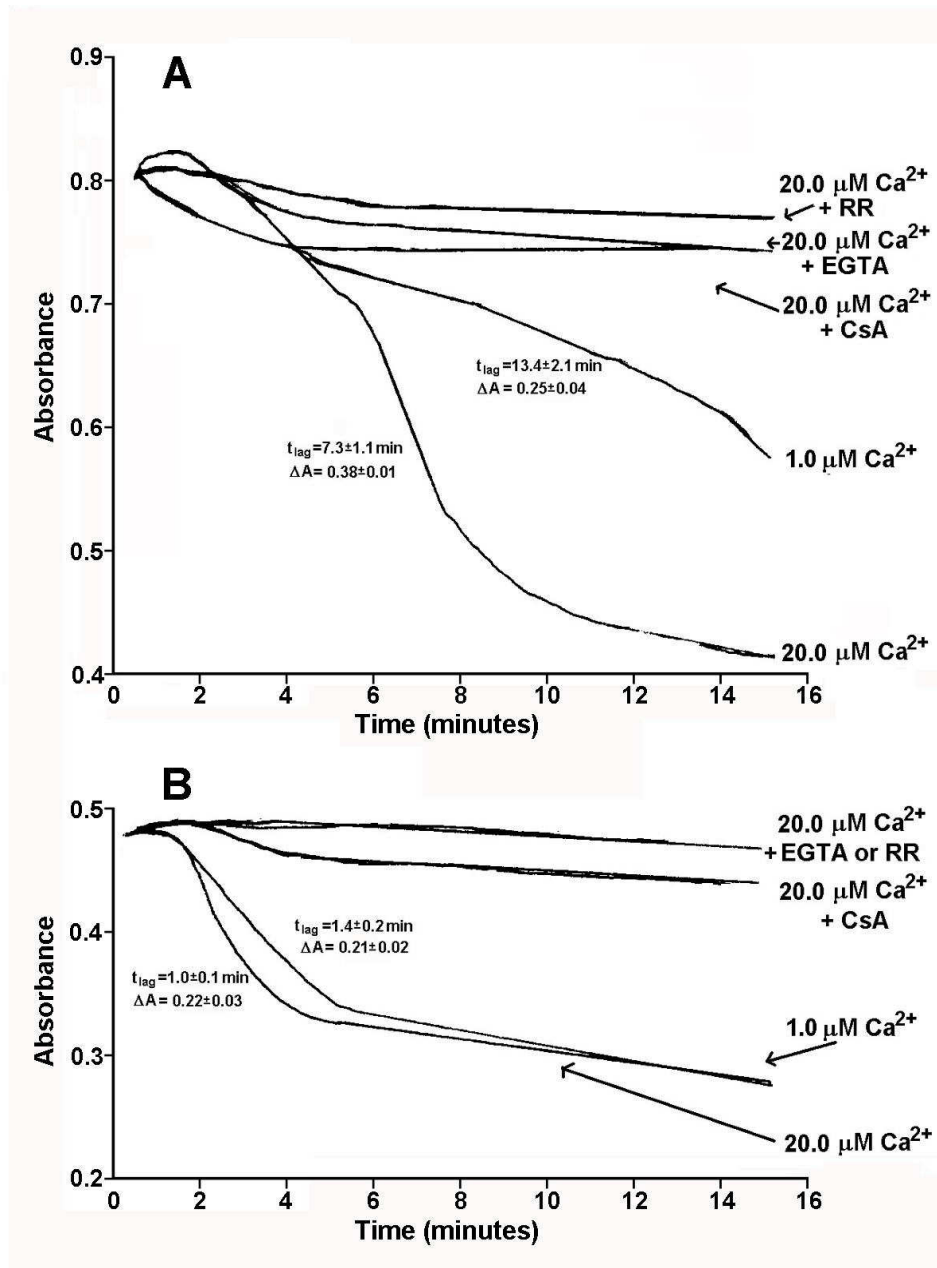


Figure 1. ***Osmotic swelling induced by mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening in mitochondria from normal (A) and arthritic rats (B).*** Mitochondria were incubated at 25 °C in a medium containing 0.125 M sucrose, 0.065 M KCl, 0.1 mM potassium phosphate, 2 μM rotenone and 0.01 M Hepes buffer (pH 7.4). After a 3 min equilibration, the following compounds were added either alone or in association: 1.0 μM or 20 μM CaCl_2 ; 0.2 mM EGTA; 5.0 μM ruthenium red (RR); 1.0 μM cyclosporin A (CsA) as indicated in the graphs. The reaction was initiated by the addition of 5.0 mM succinate. The mitochondrial swelling was recorded spectrophotometrically as the decrease in the extinction at 540 nm. The curves in the figure are typical ones from a representative experiment. The mean values of maximal amplitude of swelling at 15 minutes and the lag phase times calculated from 6 different mitochondrial preparations are indicated.

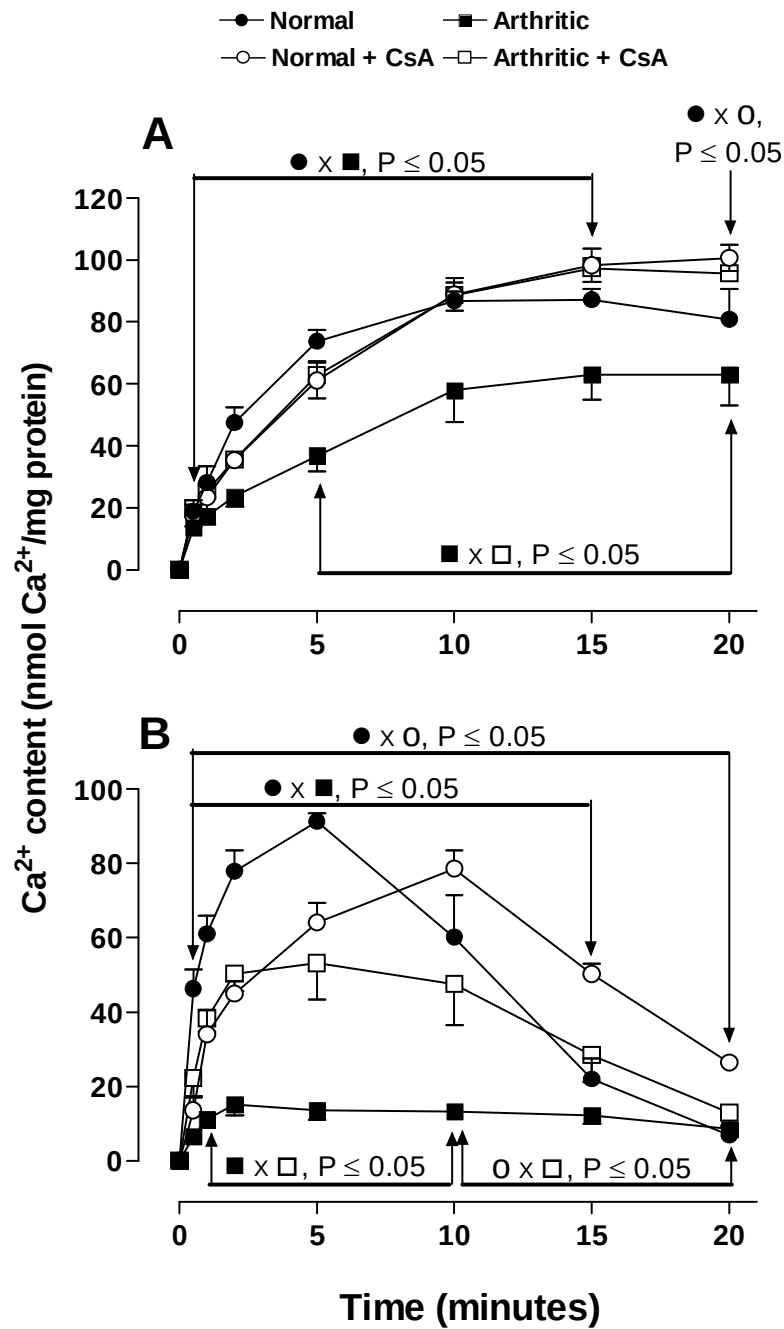


Figure 2. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in liver mitochondria from normal and arthritic rats energized with ATP (A) or succinate (B). Mitochondria (0.15-0.25 mg/ml) were incubated at 37 °C, in a medium containing 0.125 M sucrose, 0.065 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.2 mM potassium phosphate, 3.0 mM Hepes buffer (pH 7.2), 2 μM rotenone, 20 μM CaCl_2 and 0.015 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$. The reaction was initiated by the addition of 5.0 mM ATP (A) or 1.0 mM succinate (B) in the absence or in the presence of 1.0 μM CsA. The amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ associated with mitochondria was measured as described in Materials and methods. Each data point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3-5 (ATP series) or 3-6 (succinate series) experiments. The time spans presenting significant differences between the experimental series are indicated (two-way variance analysis, with post hoc Newman-Keuls testing).

Efeitos da noradrenalina sobre a gliconeogênese em fígados de ratos artríticos

Pamelli Maria de Souza Silva, Lucas Jonatas da Silva, Camila Mariano Orathes, Isabela Maria Baldasso, Clairce Luzia Salgueiro-Pagadigorría, Adelar Bracht e Emy L. Ishii-Iwamoto.

Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, 87020900 Maringá, Brasil.

Endereço para correspondência:

Emy L. Ishii-Iwamoto

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

E-mail: eliwamoto@uem.br

Fax:55-44-32614896

87.020.900 Maringá, Brasil

Resumo

Os efeitos da noradrenalina sobre a gliconeogênese em fígados de ratos artríticos foram investigados. Os substratos gliconeogênicos L-alanina, L-lactato, piruvato e sorbitol foram infundidos em fígados de animais normais e artríticos e a produção de glicose, L-lactato e/ou piruvato, bem como o consumo de oxigênio foram avaliados. Os efeitos da noradrenalina em fígados de animais artríticos foram dependentes do substrato utilizado. Enquanto que na condição normal, a noradrenalina estimulou a gliconeogênese a partir de todos os substratos, em fígados de animais artríticos o estímulo foi observado quando os substratos foram o L-Lactato e o sorbitol, mas não quando os substratos foram a L-alanina e o piruvato. As causas para esses efeitos diferenciais da noradrenalina estão provavelmente relacionadas com as modificações metabólicas causadas pela artrite no metabolismo da L-alanina e do piruvato, as diferentes rotas e requerimentos para a produção de glicose a partir dos diferentes substratos utilizados e os diferentes mecanismos de regulação da gliconeogênese pela noradrenalina. O conjunto de nossos resultados indica que uma interferência no sistema de transferência de equivalentes de redução da matriz mitocondrial para o citosol, bem como a baixa atividade da alanina-aminotransferase, no caso do substrato L-alanina, tenham limitado os mecanismos de estimulação da gliconeogênese a partir desses substratos pela noradrenalina.

Palavras chaves: artrite, noradrenalina, gliconeogênese, fígado.

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 é um modelo experimental amplamente estudado por possuir muitas semelhanças com a artrite reumatóide humana (AR) em termos da histopatologia e respostas a drogas anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Pearson, 1956). A AIA tem sido também utilizada como modelo de caquexia inflamatória (Roubenoff et al., 1997), uma condição que também acomete cerca de dois terços dos pacientes humanos com AR e que é caracterizada por uma redução de massa celular (Roubenoff et al., 1994). Embora a etiologia da artrite não seja totalmente conhecida, estudos indicam que os linfócitos T, macrófagos e células sinoviais proliferantes desempenham os papéis principais no desenvolvimento e manutenção da doença (Konttinen et al., 1981; Taurog, 1984; Bersani Amado et al., 1990).

O fígado pode estar implicado nas alterações metabólicas que se manifestam como a condição caquética visto que inúmeras modificações metabólicas têm sido relatadas. No fígado de rato em perfusão isolada foi observada redução na capacidade gliconeogênica em graus variáveis dependendo da natureza do substrato. A redução foi mais acentuada com os aminoácidos L-alanina e L-glutamina, enquanto que a produção de glicose a partir de glicerol e xilitol não foi afetada (Caparroz-Assef et al., 1998; Fedatto-Júnior et al., 1999). Os fígados de animais artríticos exibiram também um menor conteúdo de glicogênio (Fedatto-Júnior et al., 2002), ativação da glicólise a partir da glicose exógena (Fedatto-Júnior et al., 2000) e modificações na ureagênese, sendo que a disponibilidade de aspartato foi sugerida como um fator limitante na ureagênese dos animais artríticos (Yassuda et al., 2003). Pouco se conhece sobre as possíveis causas ou os mediadores envolvidos nessas modificações hepáticas. As citocinas fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β) estariam implicadas, ao menos em parte, em algumas dessas alterações já que a infusão endovenosa de ambas as citocinas em animais normais provoca uma redução da gliconeogênica hepática (Broetto-Biazon et al., 2006). É possível, também, que modificações nos níveis plasmáticos ou nas ações celulares de hormônios contribuam para as disfunções metabólicas hepáticas. Em um estudo recente, foi demonstrado que o nível plasmático

de insulina é menor em ratos artríticos (Caparroz-Assef et al., 2007), um fenômeno que poderia estar ligado ao menor conteúdo de glicogênio hepático dos animais. Por outro lado, foram observadas modificações nas respostas do fígado ao glucagon. O hormônio é menos efetivo em liberar glicose a partir de glicogênio e não afeta a glicólise hepática, contrastando com a característica inibição observada em animais normais (Fedatto-Júnior et al., 2002). Já o estímulo da gliconeogênese é mais pronunciado, em termos relativos, diminuindo a diferença observada entre os fígados de animais normais e artríticos (Fedatto-Júnior et al., 1999). Além disso, o efeito estimulador do glucagon sobre a gliconeogênese hepática mostrou maior dependência de íons cálcio (Kelmer-Bracht et al., 2002).

Está bem estabelecido que as mitocôndrias desempenham um papel importante na homeostase do cálcio celular, tanto em situações fisiológicas como na ação de alguns hormônios como a noradrenalina (Bootman et al., 2001), como em situações patológicas como na apoptose celular (Crompton, 1991). Estudos em mitocôndrias isoladas têm revelado algumas alterações nas respostas de mitocôndrias de ratos artríticos ao íon cálcio. Uma maior sensibilidade aos íons Ca^{2+} na indução do desacoplamento e do inchaço osmótico mitocondrial, além de redução na capacidade de acumular cálcio foram relatados por Barrit e Whitehouse (1977). Em um estudo recente (Silva et al., 2007) foi demonstrado que todas essas alterações são devidas a um aumento na sensibilidade das mitocôndrias de animais artríticos à transição de permeabilidade mitocondrial induzida por cálcio.

Os efeitos de hormônios que atuam predominantemente por mecanismos cálcio-dependentes em fígados de animais artríticos não foram ainda extensivamente estudados. Embora um estudo prévio tenha revelado que não há modificação significativa no estímulo da glicogenólise induzida pela noradrenalina (Caparroz-Assef et al., 1998), a resposta gliconeogênica de fígados de animais artríticos à noradrenalina não é conhecida. Por estas razões, no presente trabalho, os efeitos da noradrenalina sobre a gliconeogênese a partir de diferentes precursores foram avaliados em fígados de animais normais e artríticos.

Materiais e métodos

Materiais

A L-alanina, o sorbitol, o L-lactato, o piruvato, a noradrenalina, 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. Os animais que apresentaram lesões características da artrite, no 14^o ou no 15^o dia após a injeção do ACF, foram selecionados para os experimentos de perfusão.

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).

Perfusão do fígado

Os experimentos de perfusão foram realizados em animais normais e artríticos após um 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 e 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 ($O_2:CO_2$:: 95:5%) por meio de um oxigenador de membrana, com ajuste simultâneo da temperatura (37°C). A composição do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato foi a seguinte: NaCl 116,0 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; KCl 5,9 mM; Na_2SO_4 1,2 mM; $MgCl_2$ 1,2 mM; NaH_2PO_4 1,2 mM e $CaCl_2$ 1,3 mM. A L-alanina (2,5 mM), o sorbitol (2,5 mM), o L-lactato (2,0 mM) ou o piruvato (1,0 mM) foi dissolvido no líquido de perfusão. A noradrenalina foi dissolvida inicialmente em solução de ácido ascórbico 1,0 mM e adicionada ao líquido de perfusão, imediatamente antes do uso, na concentração final de 1,0 μ M. 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.

Análítica

Os seguintes compostos foram medidos no líquido de perfusão efluente através de métodos enzimáticos: glicose (Bergmeyer e Bernt, 1974); L-lactato (Gutman e Wahlefeld, 1974) e piruvato (Czok e Lamprecht, 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 parâmetros medidos em função do tempo no mesmo grupo experimental de animais (normal ou artrítico) foi avaliada através de análise de variância (uma variável - medidas repetidas). As diferenças entre um mesmo parâmetro medido nos dois grupos experimentais foram avaliadas pela análise de variância (duas variáveis). Em ambos os casos, as diferenças significativas entre os valores foram identificadas pelo teste de Duncan. 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

O mesmo protocolo experimental foi utilizado para todos os substratos, e está ilustrado na Figura 1A e B para a L-alanina. Os fígados de animais normais ou artríticos, mantidos em jejum prévio de 24 horas, foram perfundidos com meio livre de substratos até a estabilização do consumo de oxigênio. Amostras do perfusado efluente passaram a ser coletadas (tempo zero na escala de tempo dos gráficos) e após 20 minutos, a L-alanina 2,5 mM foi infundida. Após mais 20 minutos, a noradrenalina 1,0 μ M foi acrescentada, prosseguindo a infusão conjunta por mais 30 minutos. Nas amostras coletadas foram determinados os conteúdos de glicose, L-lactato e piruvato. O consumo de oxigênio foi monitorado continuamente. As figuras 1A e 1B revelam que a velocidade de produção de todos os metabólitos derivados do metabolismo da L-alanina, na ausência de noradrenalina, foi cerca de 50% menor do que a encontrada em fígados de animais normais, confirmando estudos anteriores (Fedatto Júnior et al., 1999). A infusão da noradrenalina 1,0 μ M em fígados de animais normais induziu efeitos transitórios nos primeiros minutos. A produção de glicose foi ativada, enquanto que o consumo de oxigênio e as produções de L-lactato e piruvato foram reduzidas. Em seguida, houve um retorno gradual às condições anteriores. Com o decorrer da infusão da noradrenalina, a produção de piruvato estabilizou em valores de estado estacionários inferiores aos encontrados antes da infusão da noradrenalina, mas a produção de glicose e de L-lactato, bem como o consumo de oxigênio foram superiores. Já em fígados de animais artríticos os efeitos da noradrenalina não foram tão acentuados. Os efeitos transitórios não foram observados. Houve um pequeno estímulo no consumo de oxigênio e na produção de glicose, mas ao término da infusão do hormônio, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Por outro lado, tanto a produção de L-lactato como a de piruvato foi inibida, estabilizando em valores menores do que os de antes da infusão da noradrenalina.

Na Figura 2 estão mostrados os resultados obtidos com a infusão do piruvato 1,0 mM (Fig. 2A), o L-lactato 2,0 mM (Fig. 2B) e o sorbitol 2,5 mM (Fig. 2C). Alguns fluxos metabólicos bem como as respostas de fígados de animais artríticos à noradrenalina foram modificados na dependência do substrato utilizado.

Para facilitar a comparação entre os resultados obtidos, as variações nas velocidades de produção de glicose, L-lactato e/ou piruvato, bem como de consumo de

oxigênio que se seguiram à infusão dos substratos, na ausência ou na presença de noradrenalina, estão mostradas na Tabela 1. Os dados desta tabela são os valores de estado estacionários alcançados aos 20 minutos da infusão dos substratos ou dos substratos mais noradrenalina subtraídos dos valores anteriores à infusão dos substratos. Confirmando estudos anteriores, (Fedatto-Júnior et al., 1999) a produção de glicose a partir de L-alanina e de piruvato na ausência de noradrenalina foi menor nos fígados de animais artríticos, sendo a redução mais acentuada com a L-alanina (-53%) do que com o piruvato (-34%). Por outro lado, a produção de glicose a partir de L-lactato ou de sorbitol não foi modificada.

O incremento no consumo de oxigênio que se seguiu à infusão dos substratos gliconeogênicos em fígados de animais normais, foi maior com L-alanina e L-lactato e menor com sorbitol e piruvato (Figs. 1A e 2, Tabela 01). Em fígados de animais artríticos, observou-se em termos gerais uma concordância entre as variações na produção de glicose e no consumo de oxigênio, ou seja, quando a produção de glicose não foi afetada (sorbitol e L-lactato) o consumo de oxigênio também não diferiu de forma significativa quando comparado com a condição normal. Com L-alanina como substrato, houve uma redução similar na produção de glicose e no consumo de oxigênio. Com piruvato, o valor médio do incremento no consumo foi também menor, mas sem significância estatística. Acompanhando a redução na produção de glicose e no consumo de oxigênio a partir de L-alanina em fígados de animais artríticos, ocorreu também um decréscimo na produção de piruvato e de L-lactato, em percentuais similares (Fig. 1B, Tabela 1). Quando o substrato foi o sorbitol, entretanto, a produção de L-lactato foi maior na condição artrítica e não houve produção mensurável de piruvato. O piruvato foi produzido durante a infusão de L-lactato, sendo que em animais artríticos a produção foi praticamente o dobro se comparada com a de animais normais. Por outro lado, quando o piruvato foi o substrato infundido, os fígados liberaram L-lactato. Na condição artrítica, os valores foram ligeiramente maiores do que na condição normal.

Tal como foi descrito para a L-alanina, a infusão da noradrenalina durante a infusão do piruvato (Fig. 2A), do L-lactato (Fig. 2B) e do sorbitol (Fig. 2C) e promoveu efeitos imediatos e de natureza transitória, seguidos daqueles de ação mais duradoura e que tenderam a valores de estado estacionário ao final da infusão do hormônio.

Em fígados de animais normais, a produção de glicose foi estimulada pela noradrenalina. Em termos relativos os efeitos da noradrenalina foram mais duradouros e

pronunciados quando a L-alanina foi o substrato (+44%), seguida pelo sorbitol (+36%) e L-lactato (+37%). Quando o substrato foi o piruvato (Fig. 2A), os efeitos iniciais da noradrenalina foram muito similares aos observados com a L-alanina (Fig. 1A). Houve um estímulo transitório na produção de glicose aos dois minutos de infusão, mas após este tempo, o incremento médio observado foi somente ligeiramente maior do que o valor anterior à infusão da noradrenalina, sendo de apenas 4% ao término da infusão do hormônio. Em fígados de ratos artríticos, entretanto, o efeito estimulador da noradrenalina foi bastante atenuado quando os substratos foram a L-alanina e o piruvato, mas foi muito similar ao de animais normais quando os substratos foram o sorbitol e o L-lactato. No caso do sorbitol houve uma diferença na cinética inicial de produção de glicose (Fig. 2C). Logo no início da infusão da noradrenalina houve um decréscimo transitório, seguido de um estímulo progressivo, atingindo valores de estado estacionário idênticos aos da condição normal aos 16 minutos do início da infusão da noradrenalina (Tabela 1).

A ação da noradrenalina sobre o incremento do consumo de oxigênio foi, na maioria dos casos, de estimulação e nem sempre houve correlação com o incremento observado na produção de glicose, tanto em animais normais quanto nos artríticos. Por exemplo, o incremento no consumo de oxigênio a partir de piruvato, em termos relativos, foi de cerca de 80% nos animais normais e artríticos, mas a produção de glicose foi estimulada somente em 4% na condição normal e não foi ativada significativamente na condição artrítica. Quando o substrato foi a L-alanina o incremento na produção de glicose foi acompanhada por um incremento no consumo de oxigênio em fígados de animais normais, sendo que nos animais artríticos ambos os processos não foram significativamente ativados pela noradrenalina (Fig. 1B). Por outro lado, quando o substrato foi o L-lactato (Fig. 2B), o maior incremento no consumo de oxigênio na condição artrítica foi acompanhado também por um estímulo maior na produção glicose. O mesmo ocorreu quando o substrato foi o sorbitol (Fig 2. C).

A noradrenalina ativou de forma transitória a produção de L-lactato a partir de sorbitol tanto na condição normal quanto artrítica, mas ao término do período experimental, houve um incremento significativo somente nos animais normais (Fig. 2C). A produção de L-lactato a partir de piruvato também foi ativada transitoriamente pela noradrenalina nos dois grupos experimentais (Fig. 2A). Porém, a ativação foi seguida de decréscimo progressivo, estabilizando em valores inferiores aos de antes da infusão da noradrenalina nas duas condições, normal (-53%) e artrítico (-39%).

A infusão da noradrenalina exerceu um forte efeito inibidor sobre a produção de piruvato durante a infusão do L-lactato (Fig. 2B). Nos animais normais, os valores se mantiveram reduzidos em cerca 50% durante todo o período da infusão da noradrenalina. Já nos animais artríticos, houve uma lenta recuperação, estabilizando em valores 6% inferiores aos anteriores à infusão da noradrenalina.

Discussão

Os resultados do presente trabalho revelaram que os efeitos da noradrenalina sobre a gliconeogênese em fígados de animais artríticos são modificados em maior ou menor grau dependendo da natureza do substrato. Aparentemente, existe uma relação entre as modificações causadas pela artrite no metabolismo dos diferentes substratos e as respostas alteradas à noradrenalina. Isto porque, houve supressão do efeito estimulador da noradrenalina somente quando o piruvato e a L-alanina, mas não quando o L-lactato e o sorbitol foram os substratos empregados. A produção de glicose a partir de L-alanina e piruvato foi menor em fígados de animais artríticos, confirmando os relatos de Fedatto-Júnior et al. (1999). Os autores também verificaram que a gliconeogênese a partir de L-glutamina e de piruvato mais L-lactato, mas não a partir de xilitol e glicerol, encontra-se reduzida na condição artrítica. Uma inibição em alguma etapa da via gliconeogênica que precede a formação do fosfoenolpiruvato, como a reação da fosfoenolpiruvato-carboxicinase ou a piruvato-carboxilase, foi sugerida para explicar as diferenças observadas. Entretanto, no presente trabalho foi demonstrado que a produção de glicose a partir de L-lactato não foi modificada, fato que contraria a hipótese de uma alteração na atividade de ambas as enzimas, já que são igualmente requeridas para a gliconeogênese a partir de L-lactato.

É conhecido que a gliconeogênese a partir de alguns precursores de três carbonos como o L-lactato, o piruvato e a L-alanina necessitam de um alto poder redutor no citosol para a reação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. O L-lactato, o sorbitol, o glicerol e o xilitol, são substratos que têm em comum o fato de gerarem NADH, na primeira etapa de metabolização por ação das enzimas L-lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glicerol fosfato-desidrogenase e xilitol-desidrogenase, respectivamente. Esses equivalentes de redução são necessários para a

gliconeogênese a partir de L-lactato, mas não a partir de sorbitol e xilitol já que esses últimos fornecem trioses-fosfato para a via gliconeogênica.

Por outro lado, durante a gliconeogênese a partir de piruvato e L-alanina, substratos mais oxidados, o NADH deve ser produzido nas mitocôndrias e exportado para o citosol (Meijer e Williamson, 1974). A transferência de NADH ocorre simultaneamente com a transferência do malato gerado a partir do oxalacetato, que por sua vez é o produto da carboxilação do piruvato na matriz mitocondrial pela piruvato-carboxilase. O malato no citosol é convertido à oxalacetato pela malato-desidrogenase, liberando NADH (rota malato-desidrogenase). Quando o substrato é o L-lactato, outro sistema de transferência de oxalacetato pode ser usado, já que os equivalentes de redução já estão disponíveis no citosol. Neste caso, o oxalacetato é convertido à aspartato pela aspartato-aminotransferase, o aspartato é transportado para o citosol, onde é reconvertido à oxalacetato (rota aspartato aminotransferase). É também conhecido que as duas rotas podem atuar alternadamente para formar o transportador malato-aspartato, com o objetivo de transportar NADH do citosol para a matriz mitocondrial. Assim, parece razoável sugerir que a rota malato-desidrogenase está alterada em fígados de animais artríticos, mas não a rota aspartato-aminotransferase, comprometendo assim, somente a gliconeogênese a partir de substratos como o piruvato e a L-alanina.

Na metabolização da L-alanina, por outro lado, tal como ocorre com o L-lactato, a produção de piruvato é uma etapa que precede a conversão à glicose. Além de requerer a transferência de elétrons pela rota malato-desidrogenase, a metabolização da L-alanina depende da reação de transaminação catalisada pela L-alanina-aminotransferase (ALT). A ALT parece ser a etapa limitante na metabolização da L-alanina em fígados de animais artríticos, pois a redução na produção de glicose a partir da L-alanina foi mais acentuada se comparada com a redução observada com o piruvato e, além disso, todos os metabólitos derivados da L-alanina foram reduzidos em graus similares. Esta interpretação é apoiada pelos dados de Silva et al. (2005), que encontraram uma baixa atividade da ALT tanto no plasma quanto no fígado de animais artríticos.

No que concerne às respostas variáveis dos fígados de animais artríticos à noradrenalina, vale lembrar que mesmo na condição normal, os efeitos da noradrenalina sobre a gliconeogênese são complexos e dependentes de vários fatores, como a natureza do substrato e do potencial redox citoplasmático (Sugano et al., 1989; Kneer et al., 1979; Kneer e Lardy, 1983). Além disso, foi demonstrado que cálcio é necessário para a

ativação da gliconeogênese a partir de substratos que reduzem o NAD^+ citosólico, mas não para substratos que fornecem trioses fosfato para a via da gliconeogênese e que induzem um estado mais oxidado, como a diidroxiacetona ou frutose (Kneer et al., 1979; Kneer e Lardy, 1983). O cálcio parece influenciar o potencial redox citoplasmático, atuando na velocidade de transferência de equivalentes de redução do citosol para a matriz mitocondrial, e com isso permitindo a mais rápida regeneração de NAD^+ necessário para a oxidação inicial dos substratos reduzidos. Tem sido sugerido que tanto a rota malato-aspartato quanto a via glicerol fosfato-desidrogenase/diidroxiacetina fosfato são estimulados por agonistas Ca^{2+} -dependentes (Yip e Lardy, 1981; Kneer e Lardy, 1983; Taylor et al., 1983). O Ca^{2+} parece induzir também um estímulo na atividade da fosfoenolpiruvato-carboxicinase (Kneer e Lardy, 1983). Estes mecanismos estariam operando normalmente em fígados de animais artríticos, considerando que o estímulo na produção de glicose a partir de L-lactato e sorbitol não foi modificado.

No caso da produção de glicose a partir do L-lactato parece haver mecanismos adicionais de regulação pela noradrenalina (Patel e Olson, 1986). O potencial redox citoplasmático mais oxidado favoreceria também o equilíbrio da reação malato-oxalacetato no sentido do oxalacetato e assim, aumentando o fluxo para a reação da fosfoenolpiruvato- carboxicinase. Patel e Olson (1986) demonstraram adicionalmente que o estímulo na produção de glicose por agonistas cálcio-dependentes é acompanhado de aumento na produção de $^{14}\text{CO}_2$ somente quando o $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ L-lactato, mas não quando o $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ piruvato é infundido em fígados em perfusão isolada. Foi sugerido que os agonistas cálcio-dependentes estimulam a gliconeogênese a partir de piruvato por estimular alguma etapa posterior à formação do fosfoenolpiruvato.

Por outro lado, Sterniczuk et al. (1991) sugeriram que agonistas cálcio-dependentes influem também na etapa mitocondrial da gliconeogênese. Com base nos níveis de metabólitos gerados a partir da infusão de L-lactato e piruvato em fígados de ratos em perfusão, os autores propuseram que o Ca^{2+} aumenta o efluxo mitocondrial de aspartato por ativar a α -cetoglutarato-desidrogenase. A mais rápida utilização do oxalacetato por sua vez estimularia a enzima piruvato-carboxilase. Nossos resultados são coerentes com esta hipótese, pois o estímulo na produção de glicose a partir de L-lactato, em fígados de animais normais, foi acompanhado por uma redução na liberação de piruvato, possivelmente decorrente da maior velocidade de conversão à oxalacetato. Em fígados de animais artríticos, a produção de piruvato a partir de L-lactato foi

também reduzida logo após a infusão da noradrenalina, mas em seguida houve uma recuperação gradual sugerindo um aporte maior de piruvato.

Vale destacar que a velocidade de produção de piruvato antes da infusão da noradrenalina foi maior na condição artrítica. É difícil precisar as razões desta maior produção de piruvato, mas é possível que esteja vinculada a um defeito na regulação da piruvato-cinase. No jejum, a atividade desta enzima deve ser mantida baixa para favorecer a conversão de fosfoenolpiruvato a glicose. É conhecido que a inibição da piruvato-cinase é um dos mecanismos de ativação da gliconeogênese pelo glucagon, mas não pelas catecolaminas (Groen et al., 1986). Se a enzima encontra-se anormalmente elevada no jejum, haverá um ciclo fútil, onde uma fração do fosfoenolpiruvato produzido é convertida a piruvato.

Esta hipótese é também consistente com a maior produção de L-lactato verificada quando o substrato foi o sorbitol. O L-lactato derivado do metabolismo de sorbitol é proveniente do catabolismo das trioses fosfato. Embora o piruvato seja o precursor do L-lactato liberado, não houve liberação de quantidades apreciáveis de piruvato pelo fígado, em virtude do aumento da razão NADH/NAD^+ citosólico, resultado da oxidação inicial do sorbitol. É bem conhecido que a L-lactato-desidrogenase citosólica é uma enzima que opera próximo ao equilíbrio (Williamson et al., 1967) e num estado mais reduzido ocorre uma rápida conversão do piruvato para L-lactato. Uma ativação da piruvato-cinase favoreceria a velocidade de metabolização das trioses-fosfato a piruvato e L-lactato, sem comprometimento da produção de glicose, desde que acompanhada por um aumento na velocidade de metabolização do sorbitol, o que parece ser plausível.

Acredita-se que a noradrenalina estimula a produção de glicose a partir de substratos como o sorbitol por favorecer um potencial redox mais oxidado, resultante da ativação dos sistemas de transferência de equivalentes de redução do citosol para a matriz mitocondrial (Kneer et al., 1979; Yip e Lardy, 1981; Taylor et al., 1983). Além de favorecer a oxidação inicial do substrato reduzido e, em consequência, a produção de trioses-fosfato e glicose, a reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase também seria favorecida. De fato, houve um estímulo considerável na produção de L-lactato em fígados de animais normais na presença de noradrenalina. Em animais artríticos, por outro lado, não houve estímulo adicional significativo, possivelmente porque a via já se encontrava ativada antes mesmo da infusão da noradrenalina, conforme discutido anteriormente.

A hipótese de uma alteração na piruvato-cinase em fígados de animais artríticos é também coerente com o aumento da velocidade de oxidação de glicose exógena a L-lactato e piruvato observado por Fedatto-Júnior et al. (2002). Esta alteração foi atribuída a uma maior capacidade de fosforilação da glicose pela glicocinase. Entretanto, é possível que a maior atividade da piruvato-cinase também tenha contribuído para o aumento da oxidação da glicose. Uma outra indicação de que a regulação da piruvato-cinase pode estar de fato alterada em animais artríticos é a supressão do efeito inibidor do glucagon sobre a glicólise a partir da glicose liberada do glicogênio (Fedatto-Júnior et al., 2000). A piruvato-cinase é um dos sítios de regulação do hormônio tanto para a inibição da glicólise no estado alimentado, quanto para a ativação da gliconeogênese no estado de jejum (Kneer e Lardy, 1983; Groen et al., 1986).

A supressão do efeito estimulatório da noradrenalina sobre a gliconeogênese a partir de L-alanina e piruvato em fígados de animais artríticos contrasta com o que foi observado no estudo prévio com o glucagon (Fedatto-Júnior et al., 1999). Os efeitos do glucagon sobre a gliconeogênese a partir de L-alanina, L-glutamina e piruvato não são atenuados ou suprimidos, mas ao contrário, o estímulo é mais acentuado, em termos relativos, reduzindo a diferença entre a velocidade de produção de glicose de fígados de animais normais e artríticos (Fedatto-Júnior et al., 1999). Esta diferença se deve provavelmente aos distintos mecanismos de regulação da gliconeogênese hepática pelos dois hormônios. O glucagon atua predominantemente através de mecanismos AMPcíclico-dependentes, reduzindo os níveis do modulador frutose2,6-bifosfato, ativando a transcrição da fosfoenolpiruvato- carboxicinase e inibindo a atividade da piruvato-cinase. Por outro lado, é também conhecido que o glucagon induz um aumento do cálcio intracelular, sendo alguns de seus efeitos sobre a gliconeogênese influenciados por este íon, bem como pelo potencial redox citosólico (Kneer et al., 1979; Walajtys-Rhode et al., 1992; Kraus-Friedmann e Feng, 1996; Silva et al., 1997). Kelmer-Bracht et al. (2002), por sua vez, verificaram que o componente cálcio-dependente da ativação da gliconeogênese a partir de L-lactato 2,0 mM mais piruvato 0,2 mM em fígados de animais artríticos é mais importante do que em fígados de animais normais.

A ação da noradrenalina, por outro lado, ocorre via um mecanismo α -adrenérgico que funciona independentemente da formação do AMPc e que está associado predominantemente à mobilização de cálcio (Kneer et al., 1979). Entretanto, o hormônio atua também por mecanismos independentes de cálcio como já mencionado

(Kneer et al., 1979). Dada à complexidade da regulação hormonal da gliconeogênese é difícil explicar as razões da preservação dos efeitos estimulatórios do glucagon, mas não da noradrenalina, sobre a gliconeogênese a partir de L-alanina e piruvato. Aparentemente, os mecanismos de regulação AMPc-dependentes estão preservados e são intensos suficientes para superar os efeitos negativos induzidos pela artrite, o mesmo não estaria ocorrendo com as respostas ao estímulo α -adrenérgico.

É pouco provável, por outro lado, que as alterações observadas na gliconeogênese tenham alguma relação com os relatos de interferência nos fluxos celulares de cálcio observadas em mitocôndrias de animais artríticos (Barrit e Whitehouse, 1977; Silva et al., 2007), visto que a produção de glicose a partir de L-lactato e de sorbitol, que é dependente da mobilização de íons cálcio, não foi modificada. É mais provável que as modificações induzidas pela artrite no metabolismo do piruvato e da L-alanina, discutidas anteriormente, tenham limitado os mecanismos de estimulação da noradrenalina.

Referências bibliográficas

- Barrit GJ, Whitehouse MW. Pathobiodynamics: effects of extrahepatic inflammation on calium transport and drug metabolism by rat liver mitochondria in vitro. *Biochem Med*, 17: 99-117, 1977.
- 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.
- 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.
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp L. Calcium signalling - an overview, *Cell Develop Biol*, 12: 3-10, 2001.
- Broetto-Biazon AC, Ishii-Iwamoto EL, Kelmer-Bracht AM, Bracht A. Low doses of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta diminish hepatic gluconeogenesis from alanine in vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 99: 335-339, 2006.
- 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.
- Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Kelmer- Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. The metabolic changes caused by dexamethasone in the adjuvant-induced arthritic rat. *Mol Cel Biochem*, 2007 (no prelo).
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341: 233-249, 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-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-Assef 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.

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.

Groen AK, van Roermund AWT, Vervoorn RC, Tager JM. Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenesis pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem J*, 237: 379-389, 1986.

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.

Kelmer-Bracht AM, Fedatto-Júnior Z, Ishii-Iwamoto EL, Caparroz-Assef SM, Bracht A. The influence of Ca²⁺ on gluconeogenesis stimulation by glucagon in the liver of arthritic rats. *Braz Arch Biol Technol*, 45: 309-315, 2002.

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.

Kneer NM, Lardy HA. Regulation of gluconeogenesis by norepinephrine, vasopressin and angiotensin II: A comparative study in the absence and presence of extracellular Ca²⁺. *Arch Biochem Biophys*, 225: 187-195, 1983.

Kneer NM, Wagner MJ, Lardy HA. Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis. *J Biol Chem*, 254: 12160-12169, 1979.

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. *Arthritis Rheum*, 24: 71-79, 1981.

Kraus-Friedmann N, Feng Li. The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of gluconeogenesis. *Metabolism*, 45: 389-403, 1996.

Meijer AJ, Williamson JR. Transfer of reducing equivalents across mitochondrial membrane. 1. Transfer mechanism involved in reduction of pyruvate to lactate in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta*, 33: 1-11, 1974.

Patel TB, Olson MS. Regulation of gluconeogenesis from pyruvate and lactate in the isolated perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 888: 316-324, 1986.

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

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

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.

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 ACM, D'Avila RB, Ferrari AG, Kelmer-Bracht AM, Constantin J, Yamamoto NS, Bracht A. Ca^{2+} dependence of gluconeogenesis stimulation by glucagon at different cytosolic NAD^+ - NADH redox potentials. *Braz J Med Biol Res*, 30: 827-836, 1997.

Silva MARCP, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, Assef SMC, Cuman RK, Amado CAB. Efficiency of combined methotrexate/chloroquine therapy in adjuvant-induced arthritis. *Fund Clin Pharmacol*, 19: 479-489, 2005.

Silva PMS, Tanabe E, Munhos Hermoso AP, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Salgueiro-Pagadigorria CL. Changes in calcium-dependent membrane permeability properties in mitochondria of livers from arthritic rats, 2007 (a ser submetido).

Sterniczuk A, Hreniuk S, Scaduto Jr RC, LaNoue KF. The mechanism of Ca^{2+} -related control of gluconeogenesis in perfused liver. *Eur J Biochem*, 196: 143-150, 1991.

Sugano T, Shiota M, Tanaka T, Miyamae Y, Shimada M, Oshino N. Intracellular redox state and stimulation of gluconeogenesis by glucagon and norepinephrine in the perfused rat liver. *J Biochem*, 87: 153-166, 1989.

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

Taylor WM, Reinhart PH, Bygrave FL. Stimulation by alpha-adrenergic agonists of Ca^{2+} fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem J*, 212: 555-565, 1983.

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.

Yip BE, Lardy HÁ. The role of calcium in the stimulation of gluconeogenesis by catecholamines. *Arch Biochem Biophys*, 212: 370-377, 1981.

Walajtys-Rhode E, Zapatero J, Moehren G, Hoek JB. The role of the matrix calcium level in the enhancement of mitochondrial pyruvate carboxylation by glucagon pretreatment. *J Biol Chem*, 267: 370-379, 1992.

Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J*, 103: 514-526, 1967.

Tabela 1. **Produção de glicose, L-lactato e/ou piruvato e consumo de oxigênio resultantes da metabolização de sorbitol (2,5 mM), L-alanina (2,5 mM), L-lactato (2,0 mM) ou piruvato (1,0 mM) em fígados de animais normais e artríticos.** Os dados foram obtidos dos experimentos mostrados nas Figura 1 e 2 e representam os valores de estado estacionários alcançados antes da infusão da noradrenalina (40 min) e ao final da infusão da noradrenalina (70 min), subtraídos dos valores dos metabólitos liberados antes da infusão dos substratos (20 min). As diferenças entre as médias em um mesmo grupo experimental em função de tempo foram avaliadas pela análise de variância (uma variável-medidas repetidas), e os valores que diferiram estatisticamente estão indicadas pelo símbolo *. As diferenças entre diferentes grupos experimentais foram avaliadas pela análise de variância (duas variáveis) e estão indicadas pelo símbolo §. Em ambos os casos, as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores foram identificadas pelo teste de Duncan.

Substratos/ Condições	Produção de glicose ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)		Produção de L-lactato ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)		Produção de piruvato ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)		Consumo de oxigênio ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	
	Normal	Artrítico	Normal	Artrítico	Normal	Artrítico	Normal	Artrítico
Sorbitol 2,5 mM	0,71± 0,057	0,603±0,033	0,28±0,048	0,62±0,122 [§] [§] (+121%)			0,16±0,045	0
Sorbitol 2,5 mM + NORA 1,0 μM	0,965±0,051* *(+36%)	0,946±0,045* *(+ 57%)	0,35±0,0061* *(+ 25%)	0,563±0,072			0,35±0,087* *(+ 120%)	0,26±0,088
L-alanina 2,5 mM	0,34±0,013	0,16±0,03 [§] [§] (-53%)	0,29±0,028	0,14±0,026 [§] [§] (-52%)	0,22±0,04	0,087±0,017 [§] [§] (-60%)	0,37±0,002	0,13±0,048 [§] [§] (-65%)
L-alanina 2,5 mM + NORA 1,0 μM	0,49±0,026* *(+44%)	0,22±0,018 [§] [§] (-55%)	0,43±0,019* *(+48%)	0,14±0,018 [§] [§] (-67%)	0,18±0,028* *(-20%)	0,084±0,031 ^{§*} [§] (-3,5%) [§] (-53%)	0,59±0,038* *(+62%)	0,34±0,07 [§] [§] (-43%)
L-lactato 2,0 mM	0,54±0,044	0,58±0,011			0,33±0,015	0,63±0,055 [§] [§] (+91%)	0,37±0,056	0,50±0,054
L-lactato 2,0 mM + NORA 1,0 μM	0,74±0,031* *(+ 37%)	0,82±0,07* *(+41%)			0,23±0,026* *(-30%)	0,59±0,063 ^{§*} *(-6,0%) [§] (+156)	0,66±0,059* *(+78.3%)	1,02±0,072 ^{§*} [§] (+54%) *(+104%)
Piruvato 1,0 mM	0,228±0,011	0,15±0,011 [§] [§] (-34%)	0,03±0,0047	0,078±0,0118			0,16±0,024	0,032±0,013
Piruvato 1,0 mM + NORA 1,0 μM	0,237±0,008* *(+4%)	0,173±0,0107 [§] [§] (-27%)	0,014±0,0047* *(-53%)	0,048±0,0045* *(-39%)			0,29±0,04* *(+ 80%)	0,057±0,023* *(+ 77%)

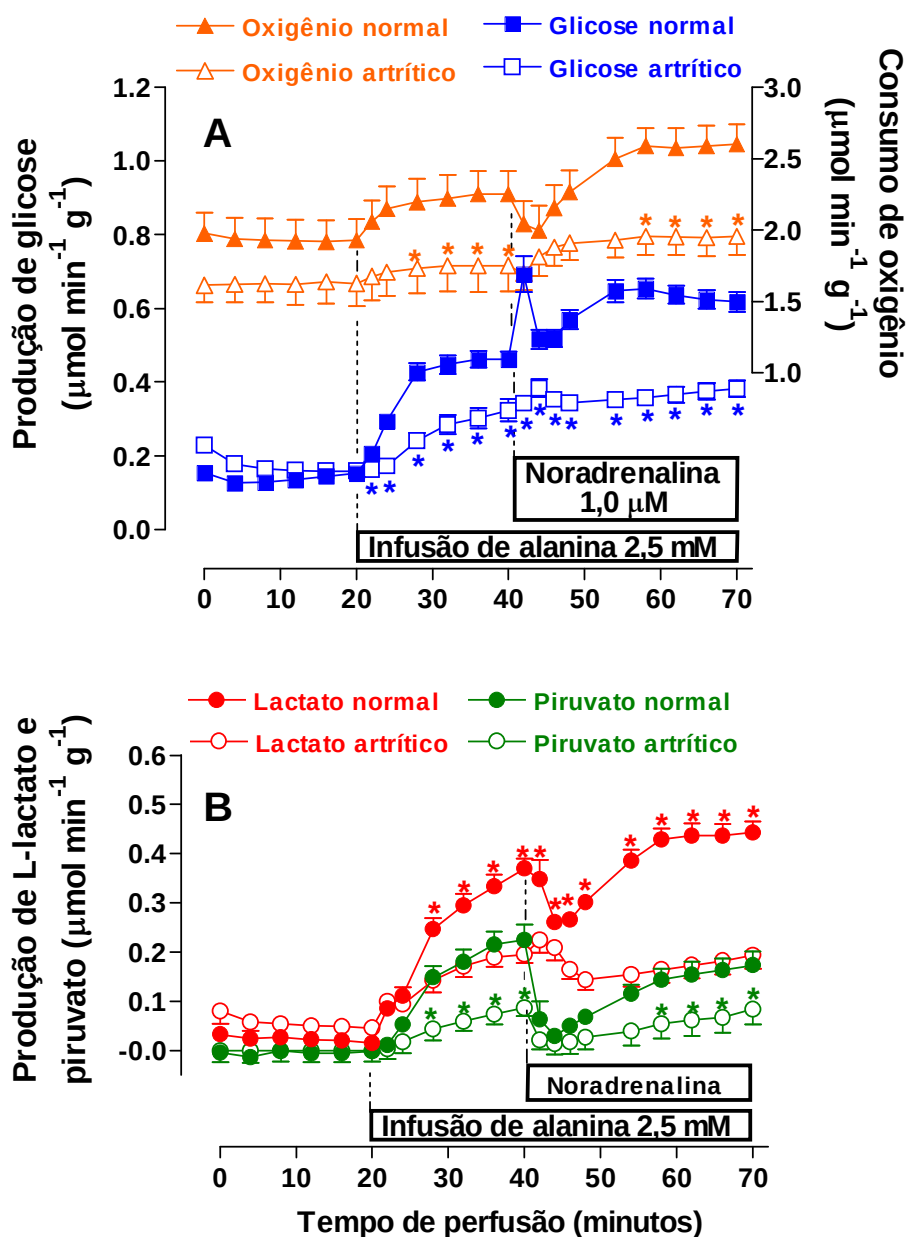


Figura 1. Gliconeogênese, consumo de oxigênio (A), produção de L-lactato e de piruvato (B) a partir da infusão de L-alanina em fígados de ratos normais e artríticos. Os fígados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 como descrito em Materiais e métodos. A L-alanina ($2,5 \text{ mM}$) e a noradrenalina ($1,0 \mu\text{M}$) foram infundidas nos intervalos de tempo indicados pelas barras horizontais abaixo dos gráficos. O perfusado efluente foi coletado em intervalos de 2-4 min e os conteúdos de glicose, L-lactato e piruvato foram analisados. O consumo de oxigênio (A) foi monitorado por polarografia. Cada ponto experimental representa o valor médio de 7 (normais) e 6 (artríticos) experimentos de perfusão. As barras verticais são os erros padrões das médias (EPM). Os símbolos (*) indicam as médias que diferem estatisticamente um do outro na comparação entre os fígados de animais normais e artríticos, de acordo com a análise de variância (duas variáveis), com teste de Duncan ($P < 0,05$). Para esta análise foram utilizados os valores subtraídos dos valores basais (antes da infusão do substrato).

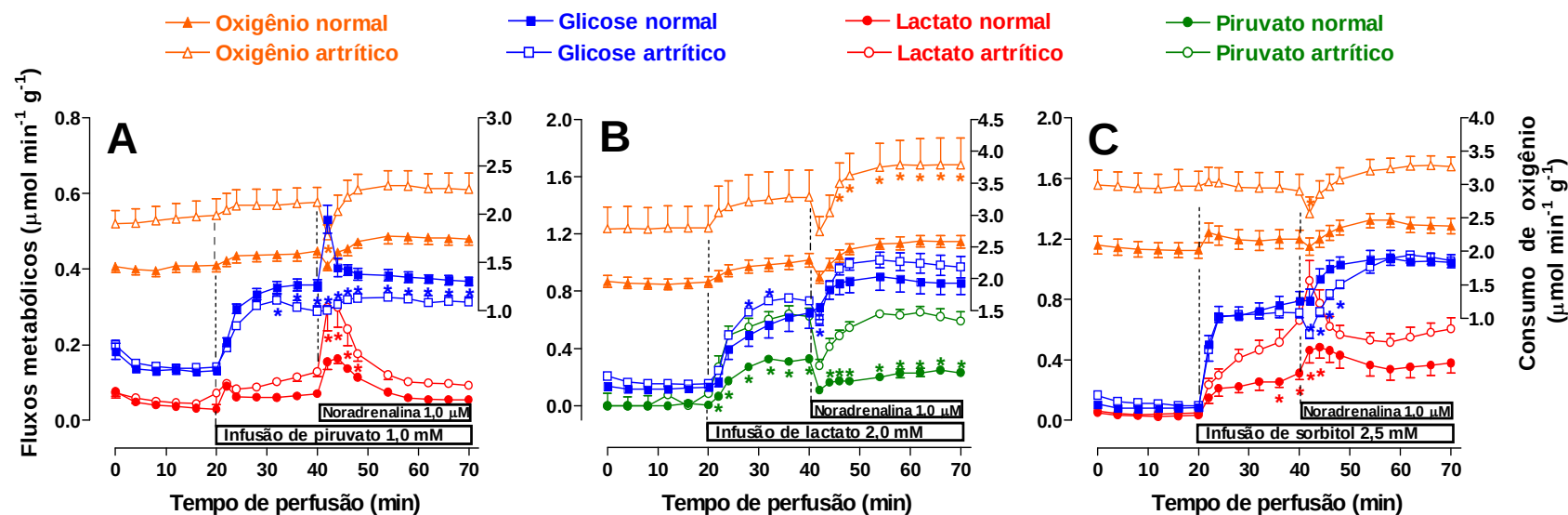


Figura 2. Gliconeogênese, consumo de oxigênio, produção de L-lactato e/ou de piruvato a partir da infusão de piruvato (A), L-lactato (B) e sorbitol (C) em fígados de ratos normais e artríticos. Os fígados foram perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 como descrito em Materiais e métodos. O piruvato (1,0 mM) o L-lactato (2,0 mM) ou o sorbitol (2,5 mM) foram infundidos no intervalo entre 20 e 70 minutos. Após 20 min da infusão dos substratos, a noradrenalina (1,0 μM) foi infundida até o final do período experimental (70 min), conforme indicados pelas barras horizontais abaixo dos gráficos. O perfusado efluente foi coletado em intervalos de 2-4 min e os conteúdos de glicose, L-lactato e/ou piruvato foram analisados. O consumo de oxigênio foi monitorado por polarografia. Cada ponto experimental representa o valor médio de 6-7 (normais) e 7-8 (artríticos) experimentos de perfusão. As barras verticais são os erros padrões das médias (EPM). Os símbolos (*) indicam as médias que diferem estatisticamente um do outro na comparação entre os fígados de animais normais e artríticos, de acordo com a análise de variância (duas variáveis), com teste de Duncan ($P < 0,05$). Para esta análise foram utilizados os valores subtraídos dos valores basais (antes da infusão do substrato).

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](#)