

## ADMINISTRAÇÃO DE BUTAFOSFAN REDUZ A CONTAGEM DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES EM CAMUNDONGAS DESAFIADAS COM LPS

PATRÍCIA MATTEI<sup>1</sup>; CAROLINA BESPALHOK JACOMETO<sup>2</sup>; CAROLINA LUCHESE VASEM<sup>1</sup>; CARLOS LOURES PIRES<sup>1</sup>; RUBENS ALVES PEREIRA<sup>1</sup>; MARCIO NUNES CORRÊA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – UFPel - nupec@ufpel.edu.br

<sup>2</sup>Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá DC, Colombia, cbjacometo@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O fósforo é um mineral chave na regulação de diversas moléculas envolvidas no metabolismo energético, especialmente por ser um dos principais constituintes da molécula de armazenamento de energia, a adenosina trifosfato (ATP) (BERG et al., 2006). Em animais de produção, diversos estudos demonstram os benefícios da utilização deste mineral, associado a outras moléculas, resultando numa melhora do metabolismo de carboidratos e lipídios, reduzindo a ocorrência de transtornos metabólicos e melhorando o status de saúde em períodos de grande desafio imunológico (FÜRLL et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; TEMIZEL et al., 2015).

Neste sentido, estudos demonstram que o status imune também pode ser modulado pela administração de fósforo. Dietas ricas em fósforo levam ao aumento da resposta blastogênica de linfócitos em leitões (KEGLEY et al., 2001), e dietas com baixos níveis de fósforo prejudicam a fagocitose de células polimorfonucleadas em ratos, cães e seres humanos (CRADDOCK et al., 1974), além de diminuírem a sobrevivência de granulócitos após desafio bacteriano em vacas (EISENBERG et al., 2014). No entanto, estes estudos se referem ao fósforo dietético, ou seja, o mineral na sua forma inorgânica.

Atualmente, a utilização de minerais orgânicos é preconizada por apresentar um aumento da eficiência de absorção e consequentemente uma maior biodisponibilidade, em relação a minerais na forma inorgânica (AFFCO, 1997). Além disso, há também redução do risco de antagonismo com outros minerais, pela ligação do metal a uma molécula orgânica (SWECKER et al., 1974) e a redução do nível de inclusão na dieta, consequência da maior biodisponibilidade.

Fonte orgânica de fósforo, o butafosfan é um derivado do ácido fosfórico (DENIZ et al., 2008; FÜRLL et al., 2010), e geralmente é utilizado em associação com cianocobalamina, um cofator enzimático da metilmalonil-CoA mutase, que converte propionato em succinil CoA, passo essencial para a entrada deste no ciclo de Krebs para ser utilizado na gliconeogênese (KENNEDY et al., 1990), resultando em melhora no metabolismo lipídico e energético. Entretanto, pouco se sabe sobre a ação isolada da molécula de butafosfan sobre o sistema imune.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes doses de butafosfan na contagem de leucócitos de camundongas desafiadas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

### 2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas/UFPel, sob o número 6936. O experimento foi conduzido no Biotério Central da UFPel, utilizando 43 fêmeas adultas de *Mus musculus*/linhagem C57BL/6, com 180 dias de idade, sob condições adequadas de experimentação. Os animais receberam

água e dieta comercial padrão *ad libitum*, com controle diário da ingestão, e foram divididos aleatoriamente em três grupos: grupo Controle (CTL; n=15), que recebeu injeções de 50mg/kg de água para injetáveis via subcutânea; grupo Butafosfan 50 (BUT50; n = 14), que recebeu injeções subcutâneas de 50mg/kg de butafosfan e Butafosfan 200 (BUT200; n = 14), que recebeu injeções subcutâneas de 200mg/kg de butafosfan. O tratamento teve duração de oito dias, com aplicações de 12 em 12 horas.

No último dia experimental, 30 minutos após a última aplicação dos tratamentos, cada um dos três grupos foi novamente dividido de forma aleatória, e sete animais de cada grupo foram desafiados com 500 $\mu$ g/kg de LPS de *Escherichia coli* (0111:B4, Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA), via intraperitoneal. Desta forma, formaram-se seis grupos ao total: controle (CTL; n=8), controle + LPS (CTL/LPS; n=7), Butafosfan 50 (BUT50; n=7), Butafosfan 50 + LPS (BUT50/LPS; n=7), Butafosfan 200 (BUT200; n=7) e Butafosfan 200 + LPS (BUT200/LPS, n=7). Duas horas após o desafio, os animais foram anestesiados por via inalatória e eutanasiados através de decapitação. Neste momento foram realizadas coletas de sangue, que foram posteriormente utilizadas para o leucograma através de reação de impedância, utilizando o contador de células semiautomático Celm CC-530 (Celm, São Caetano do Sul, SP, Brasil).

As análises estatísticas foram realizadas através do procedimento Mixed Models no Programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, EUA), tendo como efeitos fixos o tratamento, o desafio e sua interação, sendo considerados significativos valores de P < 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um número aumentado de leucócitos circulantes nos grupos desafiados com LPS (CTL/LPS e BUT50/LPS) em relação aos respectivos controles (CTL e BUT50, P <0,001 e P=0,05, respectivamente). Interessantemente, o grupo BUT200/LPS apresentou um menor número de leucócitos em relação ao seu controle, grupo BUT200 (P=0,05). Além disso, entre os animais desafiados, observou-se uma menor contagem de leucócitos circulantes no grupo BUT200/LPS em relação aos grupos CTL/LPS (P=0,007) e BUT50/LPS (P=0,005), que não diferiram entre si (P > 0,05).

Tabela 1 - Contagem de leucócitos circulantes de camundongas desafiadas ou não com LPS, tratados com diferentes níveis de butafosfan

Tratamento	Contagem de leucócitos (célula/mm <sup>3</sup> )
Controle	1087,50 ± 250,91 <sup>B</sup>
Controle LPS	2130,55 ± 268,67 <sup>Aa</sup>
Butafosfan 50	1559,12 ± 268,67 <sup>B</sup>
Butafosfan 50 LPS	2359,12 ± 268,67 <sup>Aab</sup>
Butafosfan 200	1873,41 ± 268,67 <sup>A</sup>
Butafosfan 200 LPS	1301,98 ± 268,67 <sup>Bc</sup>

Letras maiúsculas indicam diferenças entre animais desafiados ou não e letras minúsculas indicam diferenças entre tratamentos, em animais desafiados. Os resultados são mostrados como médias ± erro padrão da média.

Endotoxinas são componentes celulares de bactérias gram negativas, utilizadas há anos como modelo para o estudo da resposta inflamatória aguda, mediada pela imunidade inata (ZIELEN et al., 2015). Em humanos, alguns efeitos desencadeados por LPS são febre, aumento das proteínas de fase aguda e de mediadores pro-inflamatórios (LOWRY, 2005), além do aumento da contagem de leucócitos no sangue, devido à liberação de neutrófilos (COPELAND et al., 2005). Sabe-se que em camundongos, os linfócitos são os leucócitos mais numerosos na corrente sanguínea

(WEISS; WARDROP, 2010), o que pode explicar o aumento da contagem total de leucócitos dos grupos CTL/LPS e BUT50/LPS.

O grupo BUT200/LPS, no entanto, apresentou um comportamento inverso aos demais grupos desafiados com LPS quando relacionados com seu controle. Somado ao fato de que animais deste grupo apresentaram uma menor contagem de leucócitos em relação aos outros tratamentos, é possível que o butafosfan tenha sido capaz de atenuar a resposta inflamatória, refletido na menor migração de leucócitos para combater a infecção causada pela endotoxina baceriana, a exemplo de um estudo com voluntários saudáveis que foram desafiados com LPS e tratados com E5564, uma molécula sintética que bloqueia o efeito da endotoxina e atenua os sinais da inflamação (LYYN et al., 2003). Neste estudo, a dose mais alta do E5564 (200 $\mu$ g/kg) causou uma diminuição mais acentuada da contagem de leucócitos totais, bloqueando o efeito do LPS sobre essa variável. Outra hipótese é de que animais que receberam a dose mais alta de butafosfan foram beneficiados pela energia adicional fornecida pelo suplemento, pois a diferenciação de células estaminais hematopoiéticas requer altos níveis de energia (ITO; SUDA, 2014) e, assim, mesmo um número menor de leucócitos seria capaz de combater mais efetivamente a infecção. No entanto, análises complementares devem ser realizadas para melhor elucidar este mecanismo.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados indicam que o butafosfan atenua a resposta inflamatória, através da diminuição do número de leucócitos, em camundongas desafiadas com LPS.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Official Publication**. Atlanta: 1997.

BERG, J.M.; TYMOCZO, J.L.; STRYER, L. Glycolysis and gluconeogenesis. In: BERG, J.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: Freeman and Company, 2006. p. 433-474.

CRADDOCK, P.R.; YAWATA, Y.; VANSANTEN, L.; GILBERSTADT, S.; SILVIS, S.; JACOB, H.S. Acquired phagocyte dysfunction. A complication of the hypophosphatemia of parenteral hyperalimentation. **New England Journal of Medicine**, v.290, n.25, p.1403-1407, 1974.

COPELAND, S.; WARREN, H.S.; LOWRY,S.F.; CALVANO, S.E.; REMICK, D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.1, p. 60–67, 2005.

DENIZ A, WESTPHAL B, ILLING C. Effects of prepartum metaphylactic treatment with Catosal on postpartum metabolic functions in cows. In: **XXVth World Buiatrics Congress**, Budapest, 2008. Proc. XXVth World Buiatrics Congress. Hungary, 2008, p. 26-31.

EISENBERG, S.W.F. RAVESLOOT, L.; KOETS, A.P.; GRÜNBERG, W. Influence of feeding a low-phosphorus diet on leucocyte function in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n.8 p. 5176–5184, 2014.

FÜRLL, M.; DENIZ, A.; WESTPHAL, B.; ILLING, C.; CONSTABLE, P.D. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the

metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.9 p. 4155-4164, 2010.

ITO K, SUDA T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v.15, n.4 p. 243–256, 2014.

KEGLEY, E. B., SPEARS, J.W.; AUMAN, S.K. Dietary phosphorus and an inflammatory challenge affect performance and immune function of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 79, n.2, p. 413–419, 2001.

KENNEDY, D. G.; CANNAVAN, A.; MOLLOY, A.; O'HARTE, F.; TAYLOR, S.M.; KENNEDY, S.; BLANCHFLOWER, W. J. Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthetase (EC 2.1.1.13) in the tissues of cobalt-vitamin B12 deficient sheep. **British Journal of Nutrition**. v. 64, n.3, p. 721–732, 1990.

LYNN, M.; ROSSIGNOL, D.P.; WHEELER, J.L.; KAO, R.J.; PERDOMO, C.A.; NOVECK, R.; VARGAS, R.; D'ANGELO, T.; GOTZKOWSKY, S.; MCMAHON, G. Blocking of responses to endotoxin by E5564 in healthy volunteers with experimental endotoxemia. **Journal of Infection Disease**, v. 187, p. 631-639, 2003.

LOWRY, S.F. Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. **Shock**, Dec:24, Suppl , p. 94-100,2005.

PEREIRA, R.A.; SILVEIRA, P.A.S.; MONTAGNER, P.; A. SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.; RABASSA, V.R.; PFEIFER, L.F.M.; DELPINO, F.A.B; PULGA, M.E.; CORREA, M.N. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. **Animal**,v.7,n.7, p.1143-1147, 2013.

SWECKER, W.S. Trace mineral feeding and assessment. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 30, n.3, p. 671-688, 2014.

TEMIZEL, E.M.; BATMAZ, H.; KESKIN, A; ORMAN, A; GENCOGLU, H.; CATIKA, S.; TOPAL, O. Butaphosphan and cyanocobalamin treatment of pregnant ewes: Metabolic effects and potential prophylactic effect for pregnancy toxæmia. **Small Ruminant Research**, v. 125, p.163–172, 2015.

ZIELEN, S.; TRISCHLER, J.; SCHUBERT, R. Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans. **Expert Review of Clinical Immunology**, v.11, n.3, p. 1-10, 2015.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Veterinary Hematology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.