

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Efeitos do butafosfan sobre o processo
inflamatório em camundongas desafiadas com
endotoxina bacteriana**

Patrícia Mattei

Pelotas, 2017

Patrícia Mattei

**Efeitos do butafosfan sobre o processo inflamatório em camundongas
desafiadas com endotoxina bacteriana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientador(es): Carolina Bernalhok Jacometo

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M435e Mattei, Patrícia

Efeitos do butafosfan sobre o processo inflamatório em camundongas desafiadas com endotoxina bacteriana / Patrícia Mattei ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Carolina Bespalhok Jacometo, coorientadora. — Pelotas, 2017.

36 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Fósforo orgânico. 2. Imunidade celular. 3. Lipopolissacarídeo. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Jacometo, Carolina Bespalhok, coorient. III. Título.

CDD : 571.966

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Augusto Schneider (UFPeI, Faculdade de Nutrição)

Prof. Dr^a. Simone Pieniz (UFPeI, Faculdade de Nutrição)

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino (UFPeI, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos)

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador, UFPeI, Faculdade de Veterinária)

Para meus pais, Jurema e Vedemar, faróis da minha vida, com carinho e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Sempre em primeiro lugar e acima de tudo, obrigada aos meus pais, Jurema e Vedemar, pelo apoio, carinho e compreensão não só durante esses dois anos, mas por todo caminho trilhado para que eu chegasse a este momento. Obrigado por acreditarem em mim e iluminarem meu caminho nos momentos difíceis. Palavras jamais serão suficientes para expressar toda a minha gratidão.

Ao meu namorado, amigo e parceiro que tanto admiro, Pedro Genaro Alves Filho, por ser minha fortaleza em muitos momentos, pelo suporte emocional, pela paciência, compreensão, carinho e amor. Obrigada por trazer mais cor aos meus dias.

Ao meu orientador Marcio Nunes Corrêa, pela estrutura, incentivo, apoio e confiança no trabalho, contribuindo muito para meu amadurecimento pessoal e profissional.

À minha co-orientadora Carolina Besspalhok Jacometo, por ser mais do que isso. Por todos os ensinamentos, pela disponibilidade mesmo à distância, pela orientação, pelo apoio técnico e emocional. Agradeço por poder compartilhar minhas dúvidas e incertezas e ter em ti uma amiga querida e especial.

Aos professores do NUPEEC e pós-doutorandos, pelos ensinamentos, pelo suporte técnico, apoio e pela amizade.

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária da UFPel - colegas pós graduandos e colaboradores, pelo auxílio fundamental para a execução do projeto e pela troca de conhecimentos. Obrigada àqueles que durante esses seis anos de NUPEEC mudaram algo em mim, e em especial àqueles que se tornaram verdadeiros amigos, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao Biotério Central – UFPel, pela concessão do espaço e animais para realização do trabalho, e aos funcionários por todo auxílio.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realização do mestrado e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

A todos os meus amigos (injusto nomear apenas alguns) e àqueles que torcem pelo meu sucesso, de longe ou de perto, minha gratidão.

Resumo

MATTEI, Patrícia. **Efeitos do butafosfan sobre o processo inflamatório em camundongas desafiadas com endotoxina bacteriana**. 2017. 35f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O butafosfan constitui uma fonte orgânica de fósforo, utilizada para melhorar a produção de energia celular, sendo demonstrado que sua utilização pode potencializar a resposta imune humoral e celular; no entanto, o meio por qual ele age ainda não é bem compreendido. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da administração subcutânea de butafosfan sobre marcadores pró-inflamatórios e de atividade de neutrófilos em camundongas desafiadas com lipopolissacarídeo bacteriano. Quarenta e duas camundongas foram aleatoriamente divididas em três grupos: Butafosfan 50 (BUT50, n=14), que recebeu injeções subcutâneas de 50mg/kg de butafosfan; Butafosfan 200 (BUT200, n=14), que recebeu injeções subcutâneas de 200 mg/kg de butafosfan e Controle (CTL, n=15), que receberam placebo via subcutânea. Foram realizadas injeções durante oito dias consecutivos, duas vezes ao dia, e uma vez ao dia os animais foram pesados. No último dia experimental, metade dos animais de cada grupo foi aleatoriamente selecionado para ser desafiado com endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo – LPS). Duas horas após o desafio os animais foram eutanasiados, e foram coletados sangue e baço para a análise de parâmetros hematológico, níveis circulantes de interleucina 6 (IL-6), 1 β (IL-1B) e atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO). Animais do grupo BUT200 apresentaram redução de peso durante o experimento (P = 0.024). Grupos tratados com butafosfan, independentemente da dose apresentaram maior contagem de células vermelhas em relação ao controle (P < 0.05). Foi observada uma diminuição acentuada da contagem de células brancas no grupo BUT200/LPS, reflexo de uma diminuição de cerca de 50% na contagem de neutrófilos no mesmo grupo em relação aos demais grupos desafiados (P < 0.001). O desafio com LPS aumentou as concentrações de interleucina-6 (IL-6) em todos os grupos (P < 0.001). Animais não desafiados tratados com a maior dose de butafosfan apresentaram aumento na contagem de neutrófilos e linfócitos (P < 0.01 e P < 0.05), maior concentração de IL-6 (P < 0.001) e maior temperatura corporal (P = 0.019) antes do desafio com LPS em relação aos grupos BUT50 e CTL. A utilização de butafosfan em animais não desafiados mostrou ser positiva, com o aumento da hematopoiese, independente da dose utilizada, e o aumento do *pool* circulatório de células de defesa, das concentrações de IL-6 e da temperatura corporal no grupo tratado com a maior dose. Este efeito modulatório pode mostrar-se interessante na prevenção de situações de grande desafio imune, onde um número aumentado de marcadores inflamatórios é importante, como o câncer e o período de transição, em animais de produção. Frente ao desafio com endotoxina bacteriana, o grupo tratado com a maior dose de butafosfan manteve os níveis de neutrófilos semelhantes ao grupo não desafiado, reiterando o efeito modulador. Assim, é primordial que os estudos que envolvam a relação do fósforo e sistema imune sejam aprofundados, para que esta molécula que está presente em diversas reações energéticas dos organismos possa ser direcionada para a melhora do *status* imune e de saúde geral, tanto em animais quanto em humanos.

Palavras-chave: Fósforo orgânico, imunidade celular, lipopolissacarídeo.

Abstract

MATTEI, Patrícia. **Effects of butaphosphan on inflammatory process in mice challenged with bacterial endotoxin.** 2016. 35f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Butafosfan is an organic source of phosphorus, used to improve cellular energy production, and it has been demonstrated that its use may potentiate the humoral and cellular immune response; however, the means by which it acts is still not clear. Thus, the aim of the study was to evaluate the effect of subcutaneous administration of butaphosphan on pro-inflammatory markers and neutrophil activity index in mice challenged with bacterial lipopolysaccharide. Forty-two mice were randomly divided into three groups: Butaphosphan 50 (BUT50, n=14), that received subcutaneous injections of 50 mg/kg of butaphosphan; Butaphosphan 200 (BUT200, n=14), that received subcutaneous injections of 200 mg/kg of butaphosphan and Control (CTL, n=15), that received placebo via subcutaneous. Injections were realized by eight consecutive days, twice a day, and once a day the animals were weighed. In the last experimental day, half of animals per group were randomly selected to be challenged with bacterial endotoxin (lipopolysaccharide – LPS). Two hours after the challenge animals were euthanized and blood and spleen were collected to analyze hematological parameters, circulating levels of interleukin 6 (IL-6), 1 β (IL-1B) and myeloperoxidase (MPO) tissue activity. Animals of BUT200 group demonstrated reduction of body weight during the experiment (P = 0.024). Groups treated with butaphosphan, independent of dose had higher red cell count than control (P < 0.05). A marked decrease was observed in white cell count in BUT200/LPS group, as a result of 50% [decrease in neutrophil count in the same group compared to the other two challenged groups (P < 0.001)]. The challenge with LPS increased the concentrations of interleukin-6 (IL-6) in all groups (P < 0.001). Animals not challenged, treated with the highest butaphosphan dose had increased neutrophil (P < 0.01) and lymphocyte (P < 0.05) counts, higher IL-6 concentration (P < 0.001), and higher body temperature (P = 0.019) prior to challenge with LPS related to BUT 50 and CTL groups. The use of butafosfan in non-challenged animals was demonstrated to be positive, with increased hematopoiesis, independent of the dose used, and the increase in the circulatory pool of defense cells, IL-6 concentrations and body temperature in the group treated with the highest dose. This modulatory effect could be interesting in the prevention of situations of great immune challenge, where an increased number of inflammatory markers is important, as cancer and the transition period, in production animals. Faced with the challenge with bacterial endotoxin, the group treated with the highest dose of butafosfan maintained neutrophil levels similar to the not challenged group, reiterating the modulating effect. Thus, it is primordial that studies involving the relationship of phosphorus and immune system be enhanced, to this molecule that is present in several energetic reactions of the organisms could be directed to the improvement of the immune and general health status, both in animals and humans.

Keywords: Organic phosphorus, cellular immunity, lipopolysaccharide.

Lista de Abreviaturas

AGNE – Ácidos graxos não-esterificados
ATP – Adenosina Trifosfato
BHB – Betahidroxi-butirato
Co – Cobalto
Cu – Cobre
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
LPS – Lipopolissacarídeo
Mn - Manganês
MPO – Mieloperoxidase
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NETs – Neutrophil extracellular traps
NRC – National Research Council
P - Fósforo
PAMPs – pathogen-associated molecular patterns
pH – Potencial hidrogeniônico
PRRs – pattern recognition receptors
Se – Selênio
TLRs – Toll like receptors
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
Zn - Zinco

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Minerais orgânicos e imunidade.....	13
2.2 Relações entre fósforo e metabolismo energético do sistema imune	15
2.3 Modulação do sistema imune por meio da utilização de fósforo	17
2.4 Respostas do sistema imune inato frente a uma infecção	18
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	21
3.1 Hipótese.....	21
3.2 Objetivo Geral	21
3.3 Objetivos Específicos	21
4 CAPÍTULO 1	22
4.1 Artigo 1 – Pro-inflammatory response markers and neutrophil activity index of mice treated with butaphosphan and challenged with bacterial endotoxin.....	22
5 CONCLUSÃO GERAL.....	30
6 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO GERAL

Minerais são substâncias inorgânicas necessárias à manutenção de diversos processos bioquímicos, e todos os organismos vivos necessitam destas moléculas para o bom andamento de seus processos biológicos (Soetan et al., 2010). Dentre estes elementos, o fósforo (P) é um macromineral de importância vital para o crescimento e o bom funcionamento de todos os organismos vivos, e nenhum outro mineral é conhecido por ter um número tão grande de funções essenciais. Grande parcela desta molécula (80%) apresenta-se como constituinte de ossos e dentes (Takeda et al., 2012), sendo responsável, juntamente com o cálcio, pela característica de rigidez e estabilidade (Grunberg, 2014). Vinte por cento do fósforo restante está dividido entre várias funções: participa como componente dos ácidos nucleicos, importante no crescimento e diferenciação celular; participa como componente dos fosfolipídios das membranas celulares, atuando na permeabilidade e seletividade das mesmas e como consequência, da integridade celular; por fim, como fosfato inorgânico, é um tampão eficiente, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ácido-básico de fluidos biológicos (Cunningham, 2002; Grunberg, 2014).

Além das funções estruturais e de homeostase, o fósforo está relacionado à regulação do metabolismo energético, por meio de diversas vias metabólicas. No processo de fosforilação, o fósforo é adicionado a uma enzima ou outra molécula, modulando sua atividade (Grunberg, 2014); ele constitui a molécula de armazenamento de energia, a adenosina trifosfato (ATP), o principal combustível celular (Berg et al., 2006; Rollin et al., 2010) e também participa da regulação da respiração mitocondrial, especialmente em situações de baixo a moderado consumo de oxigênio (Beard, 2006), sendo taxa-limitante para a função da organela (Tanaka et al., 1989).

Dada a importância deste mineral, diversos estudos já foram conduzidos no sentido de modular o *status* energético e o metabolismo lipídico em relação à disponibilidade de P, principalmente em animais de produção. A administração de uma fonte orgânica de fósforo, associada à cianocobalamina (vitamina B12) ocasionou melhora do metabolismo de carboidratos e lipídios, por meio da diminuição das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE), colesterol (Pereira et al., 2013) e beta hidroxibutirato (BHB) (Furll et al., 2010) nas primeiras semanas após o parto em vacas, momento marcado por um grande desafio metabólico e imune (Bionaz et al., 2012; Trevisi et al., 2012). Concomitante à

melhora do *status* energético, a administração da combinação de butafosfan e vitamina B12 ocasionou uma melhora no *status* de saúde, com a redução da ocorrência de transtornos metabólicos como a cetose subclínica (Rollin et al., 2010) e infecções puerperais (Furll et al., 2010) em vacas no pós parto recente. Em outro estudo, a administração de uma combinação de butafosfan, vitamina B12 e vitamina C ocasionou uma redução da prevalência de infecções uterinas (metrite clínica e puerperal) e de mastite nos primeiros sete dias após o parto de vacas leiteiras, com efeito positivo sobre marcadores de fertilidade como intervalo parto – 1ª inseminação e intervalo parto-concepção (Bors et al., 2016).

Por outro lado, quando ocorreu a restrição de fósforo na dieta, houve um aumento dos níveis de triglicerídeos hepáticos de camundongos alimentados com dietas com altas taxas de colesterol, além de indução à esteatose hepática (Tanaka et al., 2013); aumento da produção endógena de glicose, por meio de um estímulo das rotas gliconeogênicas e de glicogenólise em camundongos, podendo ser parcialmente causal na intolerância à glicose e resistência à insulina (Xie et al., 1999; Xie et al., 2000). Em suínos, a restrição de fósforo levou a reduções dramáticas no crescimento e eficiência da conversão alimentar em neonatos, reduzindo também a proliferação de células tronco mesenquimais e células satélite musculares, podendo causar efeitos negativos no crescimento a longo prazo (Alexander et al., 2010).

A redução de transtornos metabólicos e a melhora do *status* de saúde em animais de produção e em humanos estão intimamente ligados à melhora do *status* imune. Os neutrófilos são os primeiros mediadores frente à invasão de um patógeno no organismo, participando de sua fagocitose e desencadeando uma resposta inflamatória de fase aguda (Segal, 2005). Por serem recrutados para uma resposta imediata, os neutrófilos têm preferência pela utilização da glicólise como via primária de obtenção de energia, uma vez que ela é 100 vezes mais rápida do que a fosforilação oxidativa (Pfeiffer et al., 2011). Entretanto, células imunes quiescentes em geral dependem fortemente da fosforilação oxidativa para serem ativadas e atuarem frente a uma invasão (Delmastro-Greenwood & Piganelli, 2013). Assim, todos esses processos metabólicos dependem fortemente de um aporte suficiente de fósforo, para a produção do ATP.

O butafosfan, derivado do ácido fosfônico e quimicamente conhecido como 1-butilamino-1-metil ácido fosfônico, constitui-se numa fonte orgânica de fósforo, que pode ser usado para melhorar a produção de energia celular (Berg et al., 2006; Füll et al., 2011). Ha e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos tratados com butafosfan tiveram a resposta imune potencializada, com o aumento do índice de fagocitose de macrófagos e estímulo da resposta imune humoral e celular; entretanto, ainda não se sabe de que forma o butafosfan atua como um potencializador.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Minerais orgânicos e imunidade

A utilização de minerais na forma orgânica na dieta animal tem sido preconizada nos últimos anos, por diversas vantagens que estes apresentam em relação aos minerais na forma inorgânica. Um mineral orgânico ou quelatado consiste de um íon de mineral ligado quimicamente a uma molécula orgânica (aminoácidos, proteínas, carboidratos ou cadeias carbonadas), formando uma estrutura com características únicas de estabilidade e alta disponibilidade mineral (AAFCO, 1997). Já os minerais inorgânicos, além de estarem presentes normalmente em alimentos de origem vegetal, são adicionados às dietas geralmente na forma de sais (óxidos e sulfatos) (Swiatkiewicz et al., 2014), podendo sofrer altas taxas de perdas durante os processos digestivos (Aksu et al., 2010). Neste contexto, as quantidades necessárias para suprir as necessidades animais podem ser aumentadas em até 10 vezes o recomendado pelo National Research Council - NRC (Inal et al., 2001), levando a perdas econômicas e contaminação do meio ambiente, pela excreção excessiva (Ao et al., 2009; Leeson, 2003).

Quando utilizados na forma de sal inorgânico, alguns minerais tendem a dissociar-se ao alcançarem o trato gastrointestinal, devido ao baixo pH (Richards et al., 2010; Underwood & Suttle, 1999). Isso explica em parte a alta susceptibilidade a antagonismos com outros nutrientes e a formação de complexos insolúveis, prejudicando a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade dos minerais (Manangi et al., 2015). Em contraste, minerais quelatados possuem uma maior estabilidade, fornecida pela ligação do mineral à molécula orgânica, levando a um aumento da estabilidade da molécula no trato gastrintestinal (Aksu et al., 2010) e liberando o complexo para ser absorvido somente no intestino (Leeson, 2003). Há também a hipótese de que os minerais orgânicos utilizam mais comumente a via de absorção de moléculas orgânicas (peptídeos ou aminoácidos) em vez da via de absorção dos íons inorgânicos no intestino; além disso, pelos tipos de ligação entre a molécula orgânica e o mineral (covalente e iônica), o quelato tem a característica de ser eletricamente neutro, atravessando, desta forma, a membrana celular da mucosa e sendo absorvido intacto, justificando as maiores taxas de absorção em relação aos seus análogos inorgânicos (Power & Horgan, 2000). Desta forma, não

há a necessidade da inclusão de grandes quantidades minerais na dieta, e há também a redução das perdas nas excretas dos animais (Bao & Choct, 2009), tornando os minerais orgânicos uma alternativa ao uso tradicional dos sais inorgânicos.

Diversos estudos, com diferentes espécies animais comprovam os benefícios da administração de minerais orgânicos na função imune. Ao substituir a fonte inorgânica por uma orgânica de zinco (Zn) em 50 e 75%, Nagalakshmi e colaboradores (2016) observaram uma melhora das defesas antioxidantes, resultando em proteção contra dano oxidativo das células do sistema imune e fortalecendo a resposta imune inata e a adaptativa de ratos frente a uma infecção induzida. Em frangos de corte, uma dieta com suplementação de um *mix* mineral orgânico contendo Zn, cobre (Cu), manganês (Mn) e selênio (Se) foi capaz de regular a expressão de receptores da rota inflamatória e citocinas envolvidas na resposta imune inata, melhorando o *status* anti-inflamatório, comparado a uma dieta com suplementação inorgânica (Echeverry et al., 2016). Em aves poedeiras, a substituição de Zn, Cu e Mn da forma inorgânica para orgânica teve um efeito semelhante, com uma melhora na imunidade humoral (Mishra et al., 2014).

A suplementação de vacas leiteiras no final da gestação com um *mix* de minerais orgânicos (Zn, Mn, Cu, Co) influenciou na resposta imune de bezerros não desafiados, reduzindo a expressão de genes ligados à resposta pró-inflamatória nos neutrófilos e a concentração sanguínea de mieloperoxidase, um marcador da atividade de neutrófilos (Jacometo et al., 2015). Além disso, Teixeira e colaboradores (2014) demonstraram que bezerros suplementados com injeções subcutâneas dos mesmos minerais nos dias 3 e 30 após o nascimento demonstram uma maior atividade fagocitária de neutrófilos em relação aos que não receberam essas injeções.

Por meio destes e de diversos outros estudos (Batistel et al., 2016; Bun et al., 2011; Mishra et al., 2014) percebe-se que há fortes evidências que apontam para os benefícios advindos da utilização de minerais orgânicos sobre a performance do sistema imune de diversas espécies animais. Entretanto, os minerais citados nos estudos (Zn, Cu, Co, Mn, Se) já demonstraram ser essenciais para a função imune, através da participação como cofator enzimático, na atuação em sistemas antioxidantes, seja na proliferação e ativação de células de defesa (Mohanta & Garg,

2014). Além disso, o foco destes estudos são os minerais-traço, elementos que são necessários em quantidades muito diminutas para o perfeito funcionamento dos organismos (Murray et al., 2000).

O fósforo é considerado um macromineral, um dos mais abundantes nos organismos vivos, juntamente com o cálcio. Estudos com macrominerais e sua relação com a imunidade, especialmente o fósforo, são escassos; entretanto, há evidências de que estes também são capazes de modular a resposta imune. Dietas com baixos níveis de fósforo prejudicam a fagocitose de células polimorfonucleadas em cães (Craddock et al., 1974) e ratos (Kiersztejn et al., 1992). Kegley e colaboradores (2001) demonstraram que dietas ricas em fósforo levam ao aumento da resposta blastogênica de linfócitos em leitões, e mais recentemente, Eisenberg e colaboradores (2014) observaram que a restrição do mineral pode diminuir a sobrevivência de granulócitos após desafio bacteriano em vacas. Desta forma, percebe-se que há uma estreita relação entre o fósforo e o sistema imune.

2.2 Relações entre fósforo e metabolismo energético do sistema imune

A resposta imune em vertebrados pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adquirida/adaptativa ou, imunidade mediada por células e imunidade mediada por anticorpos, com a imunidade inata sendo a primeira linha de defesa contra patógenos (Akira & Takeda, 2004). Antes da década de 80, a imunidade inata era vista pela comunidade científica como uma parte rudimentar do sistema imune, que tinha como objetivo ser o início da resposta imune adaptativa, mais sofisticada e a quem creditava-se a proteção do organismo infectado (O'Neill et al., 2013). Em 1989, a descoberta de receptores que reconheciam padrões moleculares associados a patógenos, os *toll like receptors* (TLRs), que desempenham um papel crucial no início da defesa do hospedeiro contra patógenos, sendo uma das vias de início da cascata inflamatória, possibilitou a compreensão de diversos mecanismos envolvidos com a imunidade inata e sua grande importância para o organismo (O'Neill, 2006; O'Neill et al., 2013).

Dentre as principais células efetoras da defesa imune inata estão os neutrófilos. Eles foram descobertos e caracterizados em meados do século XIX, juntamente com o despontar das ciências imunológicas, e, por este motivo, a elucidação total de seu papel na resposta imune tem sido um processo contínuo,

com novas descobertas em relação ao seu metabolismo e modo de ação (Amulic et al., 2012). Eles constituem a linha de frente do sistema imune inato, sendo as primeiras células a responderem frente a um processo infeccioso (Segal, 2005). A função destas células, que tem uma das mais curtas meia-vida celulares [entre seis e oito horas (Tak et al., 2013)] é fagocitar e destruir rapidamente patógenos invasores como fungos e bactérias (Ganeshan & Chawla, 2014). Na maioria dos mamíferos eles constituem cerca de 50 a 60% dos fagócitos circulantes, entretanto em roedores esta média cai para cerca de 20 a 30%, sendo os linfócitos os mais numerosos (Weiss & Wardrop, 2010).

Em suma, os processos envolvidos na liberação dos neutrófilos para os sítios de ação inicia com a maturação destas células, produzidas na medula óssea. Sob o comando de fatores de crescimento e citocinas, células pluripotentes hematopoiéticas se diferenciam em mieloblastos, um tipo celular predestinado a diferenciar-se em granulócito. Em indivíduos saudáveis, a liberação destas células polimorfonucleadas na circulação é finamente regulada, por meio de diversas moléculas, mantendo sempre um *pool* de células prontas para agir frente a uma injúria. Quando há uma infecção em curso, ocorre a ativação dos neutrófilos, que passa pelo processo de reconhecimento do local para migração através do tecido endotelial, a adesão a este, o atravessamento do endotélio e a chegada até o local da infecção, com a consequente fagocitose do patógeno, a degranulação e a liberação de armadilhas extracelulares [do inglês, NETs – *neutrophil extracellular traps* (Amulic et al., 2012; Seely et al., 2003)].

Para que toda a cascata acima descrita ocorra, diversas moléculas necessitam ser ativadas, sendo que um dos meios para que isto ocorra é a fosforilação mediada pelas quinases, enzimas que transferem grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia (como o ATP) para moléculas-alvo específicas. Por exemplo, o reconhecimento de sinais inflamatórios endoteliais, por proteínas de adesão expressas na superfície dos neutrófilos ativam diversas quinases, incluindo as da família Src, Syk, fosfoinositida 3-quinase (PI3k) e proteína quinase p38 ativada por mitógeno (Segal, 2005). A ativação destas moléculas culmina numa série de alterações na estrutura do neutrófilo, preparando-o para a adesão ao tecido endotelial. A NADPH oxidase (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), enzima que faz parte da ativação da via oxidativa de morte bacteriana mediada pelos neutrófilos possui seis subunidades, e a fosforilação de pelo menos

quatro delas é um passo essencial em sua ativação (Groemping et al., 2003). Somado a isso, a rota dos TLRs também depende fortemente da fosforilação de seus intermediários para sua ativação (Akira & Takeda, 2004), ou seja, há um elevado requerimento energético para a migração destas células imunes até os sítios de infecção, além do aumento da demanda de energia para a ativação da fagocitose e consequente morte celular (Kominsky et al., 2010).

Estudos que datam da década de 50 demonstram que os neutrófilos são altamente dependentes de glicose para a produção de ATP via glicólise aeróbia (Sbarra & Karnovsky, 1959; Valentine & Beck, 1951). Apesar de a fosforilação oxidativa resultar numa produção líquida de 38 moléculas de ATP e a glicólise apenas dois, os neutrófilos têm preferência pela utilização desta via para obter energia, o que, à primeira vista, pode parecer desvantajoso para a célula (Delmastro-Greenwood & Piganelli, 2013). Entretanto, o ambiente hipóxico a qual geralmente eles se deslocam, somado ao fato de possuírem poucas mitocôndrias (van Raam et al., 2006) resultam numa diminuição da dependência da fosforilação oxidativa. Aliado a isso, o fato dos neutrófilos responderem prontamente a uma invasão requer a utilização de uma via metabólica igualmente rápida, que é provida pela glicólise, 100 vezes mais rápida que a fosforilação oxidativa (Pfeiffer et al., 2001).

2.3 Modulação do sistema imune por meio da utilização de fósforo

O *status* imune pode ser modulado, tanto pela suplementação quanto pela deficiência de fósforo. Desde a década de 70, cientistas vêm estudando o papel do fósforo no sistema imune, e demonstraram inicialmente que em cães, a hipofosfatemia causa a diminuição dos níveis de ATP tanto em eritrócitos quanto em leucócitos, proporcionalmente à diminuição dos níveis de fosfato plasmático. Além disso, em animais com hipofosfatemia extrema, a quimiotaxia e a atividade fagocítica de leucócitos foram reduzidas drasticamente (Craddock et al., 1974). Em ratos submetidos à depleção de fosfato, a capacidade fagocítica de células polimorfonucleadas também foi prejudicada, demonstrando os roedores como um bom modelo para o estudo da interação entre fósforo e sistema imune (Kiersztejn et al., 1992). Em *witefish* Europeu, há evidências de que há uma redução da produção de anticorpos após imunização em animais que recebiam dietas com baixos níveis de fósforo (Jokinen et al., 2003). Já em vacas leiteiras, apesar de haver uma

diminuição do número e da sobrevivência de granulócitos, a capacidade fagocitária dos mesmos e a linfoproliferação não foi afetada frente à depleção do mineral (Eisenberg et al., 2014). Além disso, a suplementação de fósforo na dieta de vacas leiteiras em lactação não influenciou a linfoproliferação nem a atividade fagocítica de neutrófilos (Mullarky et al., 2009).

Tomados em conjunto, os estudos supracitados apontam para a existência de diferenças espécie-específicas na relação fósforo-sistema imune. Aparentemente, o efeito de dietas com baixos níveis de fósforo são mais evidentes em mamíferos não-ruminantes do que em ruminantes, onde o fósforo pode estar mais disponível devido à atividade da microbiota ruminal (Heyer et al., 2015). Além disso, por meio dos estudos envolvendo a atividade das células fagocitárias, pode-se supor que uma disponibilidade considerável de P é essencial para manter as funções das células imunes normais. Em contraste com o estudo de Mullarky e colaboradores (2009), o aumento da disponibilidade de fósforo em suínos aumentou linearmente a resposta blastogênica de linfócitos; entretanto, frente a um desafio bacteriano, não houve interação do fósforo com a resposta imune celular (Kegley et al., 2001).

Todos os trabalhos citados até o momento resultam de estudos realizados com fósforo dietético, ou seja, fósforo inorgânico, e os mecanismos pelo qual o fósforo orgânico influencia o *status* imune ainda não são completamente compreendidos. Sabe-se da existência de apenas um trabalho utilizando como fonte orgânica de fósforo o butafosfan, para melhorar a atividade do sistema imune. Nele, Ha e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos tratados com butafosfan injetável tiveram a resposta imune potencializada, com o aumento do índice de fagocitose de macrófagos e estímulo da resposta imune humoral e celular; entretanto, ainda não se sabe de que forma o butafosfan atua como um potencializador.

2.4 Respostas do sistema imune inato frente a uma infecção

O sistema imune inato é composto de um grande número de receptores celulares e citosólicos de reconhecimento de padrões (PRRs, *pattern-recognition receptors*) (como os TLRs, por exemplo), que são utilizados para a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), regiões conservadas de bactérias (lipopolissacarídeo - LPS, por

exemplo), fungos e vírus. Uma resposta humoral efetiva depende do reconhecimento destes padrões e da sinalização por meio de moléculas adaptadoras e efetoras (Yin et al., 2015). Neste sentido, a ativação dessa resposta ocorre inicialmente por meio da ação dos indutores, dentre os quais os mais comuns são os PAMPs, citocinas e antígenos processados, que sinalizarão para as células imunes o início da resposta efetora. Estes sinais serão detectados por PRRs, receptores de citocinas e de antígenos, resultando na ativação de vias de sinalização distintas e que tem como objetivo comum a eliminação do patógeno (Ganeshan & Chawla, 2014).

As citocinas são um grupo de pequenas proteínas que atuam como reguladores-chave da resposta imune (Dinarello, 2000). Após o reconhecimento de PAMPs por PRRs de células imunes, a produção de mediadores químicos na forma de citocinas é aumentada e, dependendo do estímulo que desencadeou a resposta, diferentes reações serão produzidas. A resposta produzida pelo reconhecimento do LPS, por exemplo, causa a ativação de uma cascata inflamatória mediada por diversos fatores de transcrição, dentre eles o NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*), que leva ao aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) (Fan & Cook, 2004; Greenhill et al., 2011; Palsson-McDermott & O'Neill, 2004).

A IL-1 β pertence à família de mediadores IL-1, associada tanto à inflamação aguda quanto crônica. É produzida principalmente por macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos, e em menores quantidades por linfócitos B e células *natural killer* (Basran et al., 2013; Netea et al., 2015). Dentre as principais funções da IL-1 β pode-se citar a indução da expressão de moléculas de adesão, que promovem a infiltração de células inflamatórias da circulação para o espaço extravascular, rumo ao tecido lesado; induz o aumento da expressão gênica e a síntese de cicloxigenase tipo 2, fosfolipase A, e prostaglandina 2E, que resultam em febre, vasodilatação e hipotensão; estimula a síntese de proteínas de fase aguda e o aumento do número de neutrófilos na corrente sanguínea (Dinarello, 2009).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica pertencente à família IL-6, e desempenha funções paradoxais anti e pro-inflamatórias (Scheller et al., 2011). No entanto, esta molécula é tradicionalmente conhecida por suas propriedades pro-inflamatórias, como regulador da resposta de fase aguda, indução da produção de proteínas de fase aguda no fígado, e diferenciação de macrófagos (Hirano et al., 1990), além de

controlar a hematopoiese (Jones et al., 2005). Além disso, sabe-se que a IL-6 é uma molécula chave para transição da resposta imune inata para a adaptativa, através da indução da apoptose de neutrófilos, contribuindo para a resolução da infiltração aguda destas células no tecido lesado, permitindo o início da resposta adaptativa e prevenindo o dano tecidual (Kaplanski et al., 2003). A IL-6 é produzida por praticamente todas as células do sistema imune, sendo que seus maiores ativadores são as interleucinas 1β e $TNF-\alpha$; entretanto, ela é também ativada por TLRs, prostaglandinas e adipocinas (Hunter & Jones, 2015). Concentrações elevadas desta molécula são associadas a perturbações da homeostase, principalmente causadas por endotoxemia e infecções agudas (Kishimoto et al., 1992).

Além de mediadores inflamatórios, o sistema imune também utiliza proteínas produzidas pelos neutrófilos para o controle efetivo da infecção. A mieloperoxidase (MPO) constitui cerca de 5% do total de proteínas do neutrófilo, sendo um dos principais constituintes dos grânulos azurofílicos (Klebanoff et al., 2013). Quando ativa, esta enzima tem a capacidade única de oxidar o íon clorido, além de utilizar o peróxido de hidrogênio formado no *burst* oxidativo para gerar ácido hipocloroso e outras espécies reativas de oxigênio, que contribuem na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas (Kothari et al., 2011). Além disso, a MPO está envolvida na formação de *neutrophil extracellular traps*, as NETs, que fazem parte da resposta extracelular dos neutrófilos à infecções (Parker et al., 2012). Este mecanismo foi caracterizado pela primeira vez em 2004, e consiste em um emaranhado de cromatina e proteínas nucleares associadas a proteínas provenientes de grânulos dos neutrófilos, incluindo a mieloperoxidase, que tem por objetivo neutralizar e eliminar bactérias extracelularmente (Brinkmann et al., 2004). Após a ativação por LPS, por exemplo, os neutrófilos iniciam uma programação que culmina com sua morte e a formação de NETs (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Os mecanismos moleculares que envolvem a formação de NETs e da morte bacteriana causada por eles ainda não foram completamente elucidados; entretanto, um estudo recente demonstrou que na ausência total de MPO, a formação das NETs é totalmente bloqueada, ou prejudicada quando os níveis da enzima são baixos (Metzler et al., 2011). Desta forma, percebe-se que a MPO é uma peça chave na resposta inata efetiva contra patógenos.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

O butafosfan potencializa a resposta imune inata, pela melhora da atividade de neutrófilos e produção de mediadores inflamatórios, fortalecendo a morte bacteriana frente a um desafio com LPS em camundongas.

3.2 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração subcutânea de butafosfan sobre marcadores pró-inflamatórios e de atividade de neutrófilos em camundongas desafiadas com LPS bacteriano.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do butafosfan sobre parâmetros hematológicos de animais desafiados ou não com LPS;
- Avaliar o efeito do butafosfan sobre concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias em animais desafiados ou não com LPS;
- Avaliar o efeito do butafosfan sobre a atividade de mieloperoxidase em animais desafiados ou não com LPS.

4 CAPÍTULO 1

4.1 Artigo 1 – Pro-inflammatory response markers and neutrophil activity index of mice treated with butaphosphan and challenged with bacterial endotoxin

*O artigo será submetido à revista *Nutrients**

Patrícia Mattei^{1*}, Carolina Bessalho Jacometo², Rubens Alves Pereira¹, Paula Montagner¹, Maria Amélia Agnes Weiller¹ and Marcio Nunes Corrêa¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; patymattei@gmail.com, rubens_ap@yahoo.com.br, marcio.nunescorreia@gmail.com.

²Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Zootecnia, Bogotá DC, Colombia, cbespalhok@unisalle.edu.co

* Correspondence: patymattei@gmail.com; Tel.: +55-053 -9 9973-7733

Abstract: Butaphosphan, an organic source of phosphorus, potentiates humoral and cellular immune responses; however, it is still not clear how this occurs. This study aimed to evaluate the effect of subcutaneous administration of injectable butaphosphan on pro-inflammatory markers and neutrophil activity index in mice challenged with bacterial lipopolysaccharide. Forty-two mice were randomly divided into three groups: Butaphosphan 50 (BUT50, n=14), that received injections of 50 mg/kg of butaphosphan; Butaphosphan 200 (BUT200, n=14), that received injections of 200 mg/kg of butaphosphan and Control (CTL, n=15), that received placebo. Subcutaneous injections were performed for eight consecutive days, twice a day. In day 8, half of animals per group were randomly selected to be challenged with bacterial lipopolysaccharide. Two hours after the challenge animals were euthanized, blood and spleen collected to analyze hematological parameters, circulating levels of interleukin 6 (IL-6), 1 β (IL-1 β) and myeloperoxidase (MPO) tissue activity. Mice treated with butaphosphan had a lower body weight compared to control mice. Red blood cell count was higher in butaphosphan treated groups. White blood cell count was lower in BUT200/LPS, as result of the decreased on neutrophil count in 50%. Defense cells, IL-6 and temperature were elevated in BUT200 group. The use of butaphosphan modulates positively the immune response, both in challenged and not challenged animals.

Keywords: organic phosphorus; cellular immunity; lipopolysaccharide

1. Introduction

Phosphorus (P) is a macromineral involved in several essential functions in all living organisms. A major part (80%) of P is stored in bones and teeth [1], and the other 20% play different roles, such as component of nucleic acids, phospholipids of biological membranes and buffers systems [2,3]. However, the most important function of P is implicated on its tight relationship with energy metabolism. It is a constituent of an energy storage molecule, the adenosine triphosphate (ATP), the main cellular fuel [4,5]. Furthermore, several metabolic pathways are modulated by phosphorylation and depend on P availability.

As the other cells of the organism, immune cells have high dependence of P to entirely fulfill their functions. Since the 70's decade, scientists have been studied the relationships between P and immune response, initially demonstrated in dogs, where phosphate depletion led to a decrease in ATP levels of leukocytes, impairing the phagocytic capacity of these cells [6]. As P is required for DNA and

protein synthesis, it is first sequestered by dividing cells, causing a competitive disadvantage in non-dividing cells, as the leukocytes, which can be a plausible mechanism. This speculation finds substantiation in a study when dysfunctions in red cells, platelets, brain cells and leukocytes, all non-dividing cells, have been described in hypophosphatemic subjects [7]. Also a similar effect was observed in rats, specifically in polymorphonuclear cells (PMNLs) [8], where the impairment of phagocytosis was associated to lower phosphorus levels. Previously, it was postulated that hypophosphatemia would induce to a chronic increase of intracellular calcium (Ca) that would cause impairment of mitochondrial oxidation, production of ATP and cellular toxicity in pancreatic islets [9] and brain synaptosomes [10]. However, when a Ca channels blocker was used, the levels of ATP were not normalized, indicating that the low content of ATP in PMNLs is not a total consequence of Ca increase, but also due to P deficiency [8]. Taken together, these studies point out to the importance of P availability to maintain the normal function of immune cells.

In weaning piglets, the increased dietary availability of phosphorus increased linearly the blastogenic response of lymphocyte face to stimulation with mitogen; however, when challenged with lipopolysaccharide, there was not interaction between P and cellular immune response, and there was a decrease on antibody response [11]. Mullarky and colleagues (2009) demonstrated that different levels of dietary phosphorus (low, medium and high) in the diet of lactating dairy cows did not affect both lymphocytes proliferation and phagocytic activity of neutrophil. Apparently, changes on P availability are most evident in non-ruminant rather than ruminant animals, when P could be more available due the ruminal microbiota activity [13]. However, in our knowledge, most of published results use dietary phosphorus/phosphates. Therefore, the mechanisms by which organic sources of phosphorus in an injectable via influence the immune status are still not clear.

Butaphosphan is a molecule derived of phosphonic acid (1-butylamine-1-methyl phosphonic acid) and constitutes an organic source of phosphorus, which can be used to improve the production of cellular energy [4,15]. In our knowledge, there is only one study linking butaphosphan and immune system, in which it was demonstrated that mice treated with intravenous injections of butaphosphan had increased macrophages phagocytosis index and humoral and cellular responses ameliorate face to immunization, with the increased CD4 and CD8 lymphocytes populations [16]. However, it is still not clear how the butaphosphan acts as an immune stimulator at cellular levels in the innate immunity response. In this sense, our hypothesis was that immune cells could have their functions enhanced by an extra supply of organic source of phosphorus. Thus, we aimed to investigate if butaphosphan potentiates neutrophil activity, through the evaluation of pro-inflammatory cytokines and a marker of neutrophil activity in mice challenged with bacterial lipopolysaccharide (LPS).

2. Materials and Methods

2.1 Animals and experimental procedures

The experimental protocol was approved by the Animal Welfare Commission of Federal University of Pelotas (Rio Grande do Sul State, Brazil), under the number 6936, and all procedures were conducted according to the guidelines of laboratory animal use in research.

Female C57BL/6 mice, 28 weeks old, were obtained from Central Vivarium/UFPel. Mice were housed in groups of 7 animals and disposed in air circulating shelves, with controlled temperature and humidity (22-25°C and 60-70%, respectively), with 12:12h light-dark cycling (lights from 7 a.m. to 7 p.m.) The animals had free access to water and pelleted diet, and were weighed daily, with a digital electronic balance.

Mice were randomly divided into three groups: Butaphosphan 50 (BUT50, n=14), that received subcutaneous injections of 50 mg/kg of butaphosphan, Butaphosphan 200 (BUT200, n=14), that received subcutaneous injections of 200 mg/kg of butaphosphan and Control (CTL, n=15), that received water for injection subcutaneous. Injections were performed for eight consecutive days, with an interval of application of 12 hours (adapted from Ha et al., 2005). Butaphosphan was dissolved in water for injection.

2.2 Endotoxin challenge

On the last experimental day (Day 8), 30 minutes after the last application of the treatments, half of the animals of each group were randomly selected to be challenged with LPS. Mice were injected intraperitoneally with 500 ng/kg of endotoxin derived from *Escherichia coli* (0111:B4, Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA). Therefore, the final groups were: Control (CTL, n=8), Control + LPS (CTL/LPS, n=7), Butaphosphan 50 (BUT50, n=7), Butaphosphan 50 + LPS (BUT50/LPS, n=7), Butaphosphan 200 (BUT200, n=7) and Butaphosphan 200 + LPS (BUT200/LPS). Animals were monitored on rectal temperature at time 0 (immediately before the challenge), 60 and 120 minutes after the challenge.

2.3 Tissue and blood harvesting

Two hours after the challenge with LPS, the animals were anaesthetized via inhalation with Halotane (Crisália, Brasil), and then euthanized by decapitation. Blood was collected directly of cervical region in EDTA-KF tubes. An aliquot of whole blood was used to perform hemogram. The remaining blood was centrifuged at 3000xg for 15 minutes at 4°C, plasma was isolated and stored at -80°C for further analysis. In addition, spleens were harvested, snap-frozen on liquid nitrogen and stored in cryogenic tubes at -80°C until further analysis.

2.4 Hematological Analysis

Whole blood was used to perform red blood cell count (RBC) and white blood cell count (WBC), by impedance reaction, using a semi-automatic cell counter (Celm CC-530 - Celm, São Caetano do Sul, SP, Brasil). An aliquot was used to perform the differential count of leukocyte, through blood smears, using glass slides (Glass Slides to Microscopy ExaCta - Perfecta, São Paulo-SP) and stained with Panoptic Dye (Laborclin, Paraná, Brazil).

2.5 Blood cytokines

Plasma samples were appropriately diluted and evaluated using a mouse IL6 and IL1 β ELISA kits (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO). Briefly, 100 μ L of sample and standards were added to each well, allowed to incubate for 2.5 hours, and then washed. A detection antibody specific to each cytokine was then added and allowed to incubate for 1 hour before washing. HRP-Streptavidin was used to detect the presence of bound antibodies, incubated for 45 minutes, and then washed. Colorimetric TMB Reagent was added to each well, incubate for 30 minutes and washed. At last, Stop Solution as added to each well and the plate was read at 450nm immediately, in a plate reader (Thermo Plate Reader, Brazil). The absorbance readings were then used to calculate the total concentration of cytokine based on the standard curve generated.

2.6 Myeloperoxidase assay

The analyze of myeloperoxidase activity was performed following the protocol of Pulli et al. (2013), with modifications. In brief, half of spleens were washed three times with PBS and incubated for 2 hours in an extraction buffer (0,32M sucrose [Synth, São Paulo], 1mM CaCl₂ [Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil], 10U/mL Heparin [Blau Farmacêutica, São Paulo, Brazil] in Hanks Balanced Salt Solution (Life Technologies, São Paulo, Brazil). After incubation, samples were centrifuged at 1000xg for 10 minutes, and the supernatant underwent protein precipitation by slowly mixing with 4 parts ice-cold acetone (Synth, São Paulo, Brazil). The acetone-protein mixture was then incubated for 1 hour at -20°C, and proteins were precipitated by centrifugation at 3500xg for 15 minutes at 4°C. The supernatant was discarded and the protein pellet was air-dried and resuspended in PBS. Then, 10 μ L of prepared sample were combined with 80 μ L 0,75mM H₂O₂ (Synth, São Paulo) and 110 μ L TMB

solution (2,9mM TMB [Sigma Aldrich, St Louis, MO] in 14,5% DMSO [Synth, São Paulo, Brazil] and 150mM sodium phosphate buffer at 5,4pH), placed in a reaction plate (96-well) and incubated at 37°C for 5 minutes. The reaction was stopped by adding 50µL 2M H₂SO₄ (Synth, São Paulo, Brazil), and absorption was measured at 450 nm to obtain MPO activity.

2.7 Statistical Analysis

The results are presented as mean ± standard error of mean (SEM). Data were analyzed with PROC MIXED procedure of SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Fixed effects in the model were butaphosphan treatment, the challenge with endotoxin and their interaction. Random effect was animal within the treatment. Hematological analyzes, cytokines and myeloperoxidase concentrations were log₂-scale transformed if needed to comply with normal distribution of residuals and back-transformed. Least squares means separation was performed using the PDIFF statement. Statistical significance was declared at $P \leq 0.05$ and tendencies at $P \leq 0.10$.

3. Results

3.1 Weight

Initially animals had similar body weight ($P > 0.05$), however after eight days of treatment with butaphosphan, animals from BUT200 group had a lower body weight compared to BUT50 (22.08g x 22.54g; $P = 0.025$) and CTL (22.08g x 23.10g; $P < 0.001$). BUT50 animals also presented a lower body weight related to CTL (22,54g x 23,10g; $P = 0.003$; Figure 1). Mice from group BUT200 demonstrated reduction of body weight during the experiment ($P = 0.024$).

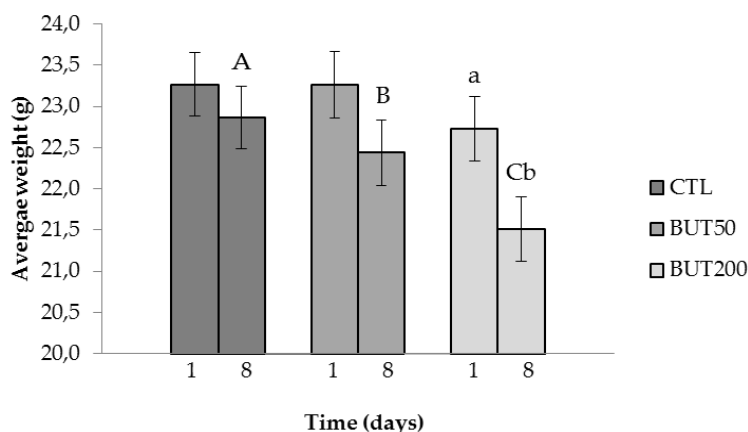


Figure 1 – Average body weight of mice treated with different doses of butaphosphan throughout the experiment. Uppercase letter indicates differences between treatments at the end of the study. Lowercase letter indicates differences between the first and the last day of the study within the treatments.

3.2 Hematological analysis

All the results regarding hematological counts are presented on Table 1. There was a treatment effect on RBC, with increased erythrocytes on groups BUT200 and BUT50 compared to CTL ($P < 0.001$ and $P = 0.015$, respectively). There was no effect of challenge or treatment and challenge interaction on RBC count.

There was a treatment by LPS interaction effect on WBC and a trend was observed for higher WBC on challenged animals (LPS) compared with the ones that were not challenged (No LPS) ($P = 0.094$). When challenged, the higher dose of butaphosphan reduced the leukocytes count (BUT200/LPS vs. CTL/LPS; $P = 0.007$ and BUT200/LPS vs. BUT50/LPS; $P = 0.005$), however there was no difference between CTL/LPS and BUT50/LPS groups. When comparing the treatments without the LPS challenge, the treatment with butaphosphan, independently from the dose, increased the WBC ($P <$

0.05). Interestingly, when animals were challenged, CTL group increased WBC (CTL vs. CTL/LPS; $P < 0.001$), BUT50 response were similar when challenged or not (BUT50 vs. BUT50/LPS; $P > 0.05$) and BUT200 group reduced the WBC when challenged with LPS (BUT200 vs. BUT200/LPS; $P = 0.035$).

Table 1 – Hematological parameters of mice treated with different doses of butaphosphan and challenged with LPS.

Hematological count (cell/mm ³)	Treatment	LPS	No LPS	SEM	TREAT	LPS	TREAT*LPS
RBC	CTL	8665000	8655000 ^B	301483			
	BUT50	9703333	9631429 ^A	301483	<0.001	0.657	0.689
	BUT200	9808333	10210000 ^A	301483			
WBC	CTL	2128.57 ^{ab*}	1087.50 ^B	184.39			
	BUT50	1866.67 ^b	1557.14 ^A	199.16	0.776	0.094	<0.001
	BUT200	1300.00 ^{c*}	1871.42 ^A	184.39			
Neutrophil	CTL	1267,14 ^{b*}	225.62 ^B	119.15			
	BUT50	1230,00 ^{b*}	324.00 ^B	128.70	0.758	<0.001	<0.001
	BUT200	633,86 ^a	742.57 ^A	119.15			
Lymphocyte	CTL	776.57 ^b	808.75 ^B	102.49			
	BUT50	555.43 ^{ab*}	1098.43 ^A	102.49	0.914	<0.001	0.021
	BUT200	519.86 ^{a*}	1053.86 ^A	102.49			

Cell/mm³ - cell per cubical millimeters. RBC: red blood cell count. WBC: white blood cell count. SEM: standard error mean, represents the highest value. Capital letters indicate differences between treatments without LPS challenge. Lowercase letters indicate differences between treatments with LPS challenge. Asterisk indicates differences between challenged and unchallenged animals inside treatments.

Neutrophil count also presented a treatment by LPS interaction and LPS effect. The treatment with the higher dose of butaphosphan, when challenged with LPS (BUT200/LPS), reduced almost 50% the neutrophil count when compared with BUT50/LPS and CTL/LPS ($P < 0.001$). However, an opposite response was observed when animals were not challenged with LPS, where the BUT200 groups had higher neutrophil count than BUT50 and CTL groups ($P < 0.01$). The challenged with LPS increased the neutrophil count in the CTL and BUT50 groups ($P < 0.001$ for both), however, when animals were treated with the higher dose of butaphosphan, there was no effect of LPS challenge for neutrophil count.

For lymphocyte count it was also observed a treatment by LPS interaction and LPS effect. When animals were not challenged with LPS, lymphocyte count increased when treated with butaphosphan, independently from the dose, when compared to control ($P < 0.05$). However, when challenged with LPS, BUT200/LPS tended to reduce the lymphocyte count compared to CTL ($P = 0.081$). The challenge with LPS reduced the lymphocyte count on the groups treated with butaphosphan (BUT200 and BUT50; $P < 0.001$ for both), while CTL were not affected by the challenge.

3.3 Temperature profile post-LPS challenge

There was a difference between body temperatures of the animals before the LPS challenge. The BUT200/LPS group demonstrated higher body temperature related to CTL/LPS group ($P = 0.019$). After the challenge, this pattern was sustained, and at 120 minutes was observed a higher temperature also in BUT50/LPS group, related to the CTL/LPS ($P = 0.028$). No significant differences were observed between the initial and the final temperature in any treatment ($P > 0.05$).

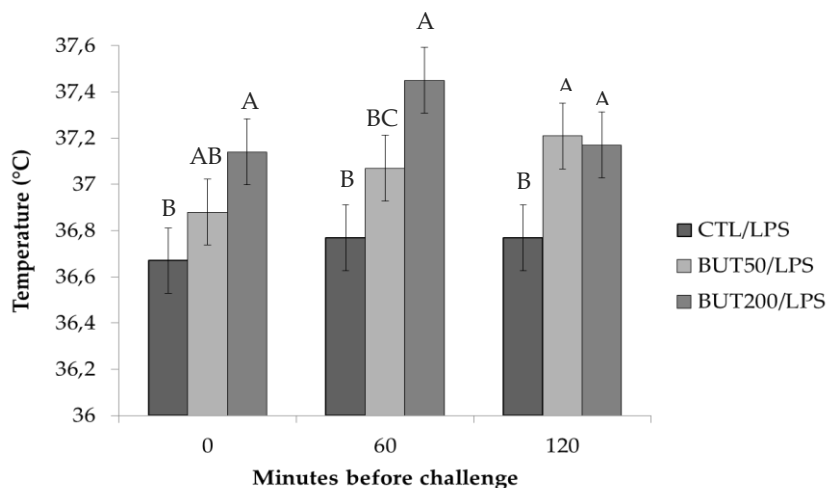


Figure 2 – Body temperature after challenge with bacterial endotoxin in mice treated with different doses of butaphosphan. Time 0 indicates the basal temperature and capital letters indicate differences between treatments at the same time.

3.4 Cytokine's concentration

IL-6 concentration was affected by treatment, LPS challenge and their interaction, while IL-1 β concentration remained unchanged (Table 2). The higher dose of butaphosphan (BUT200) increased circulating IL-6 compared to BUT50 and CTL ($P < 0.001$ for both) when animals were not challenged with LPS. However, when challenged with LPS, the treatment with butaphosphan did not affect IL-6 concentrations ($P > 0.05$). However, the challenge with LPS increased the IL-6 concentrations in all groups ($P < 0.001$).

Table 2 – Serum concentrations of pro-inflammatory cytokines of mice treated with different doses of butaphosphan and challenged with LPS.

Pro-inflammatory cytokines (pg/mL)	Pro-inflammatory cytokines (pg/mL)			SEM	TREAT	LPS	TREAT*LPS
	Treatment	LPS	No LPS				
IL-6	CTL	3349,47*	248,88 ^B	48,46	0.001	<0.001	<0.001
	BUT50	3399,24*	315,35 ^B	64,11			
	BUT200	3338,36*	725,91 ^A	74,03			
IL-1 β	CTL	67,7436	73,2846	18,41	0.767	0.456	0.942
	BUT50	74,6667	84,4062	18,41			
	BUT200	74,3077	92,1538	18,41			

Pg/mL: pictograms by milliliters. IL-6: interleukin 6. IL-1 β : interleukin 1 beta. SEM: standard error mean, represents the highest value. Capital letters indicate differences between treatments without LPS challenge. Asterisk indicates differences between challenged and unchallenged animals inside treatments.

3.5 Myeloperoxidase Activity

Overall, effects of treatment, LPS challenge and their interaction were not observed for myeloperoxidase activity ($P > 0.05$; Table 3). However, there was a trend of increased myeloperoxidase activity in BUT200/LPS group compared to BUT200 ($P = 0.069$).

Table 3 – Tissue activity of myeloperoxidase of mice treated with different doses of butaphosphan and challenged with LPS.

Absorbance relative to 450 nm	Treatment	LPS	No LPS	SEM	TREAT	LPS	TREAT*LPS
	MPO activity	CTL	0.9945	1.0000	0.3216		
BUT50		0.8357	1.1065	0.3216	0.9037	0.5087	0.2346
BUT200		1.5087	0.7066	0.3216			

MPO: Myeloperoxidase. SEM: standard error mean, represents the highest value. Control group without challenge is consider as 1, and the other values are confronted with it.

4. Discussion

Studies carried out by our research group have demonstrated the benefits of butaphosphan, on modulation of energy and lipid status, mainly in livestock animals (ewes and cows). Individuals treated with butaphosphan during periods of great immunological challenge, as the days around the parturition, demonstrated improvement of lipid and energy metabolism, resulting in a lower predisposition to metabolic disorders and ameliorating productive and reproductive indices, reflecting an enhanced of general health status [27,28,29,30]. However, in this studies, as in others [5,15,31], the butaphosphan was used in association with cyanocobalamin. The cyanocobalamin (or vitamin B12) is an enzymatic co-factor of metylmalonyl – CoA mutase, that convert propionate to succinil CoA, an essential step for its entrance to acid citric cycle, to be used on gluconeogenesis [32]. As far as we know, our study is the first that aims to clarify how butaphosphan acts as an immune stimulator and the relations of organic injectable phosphorus with the immune function.

Mice treated with butaphosphan had a lower body weight compared to control mice, with greater weight loss in the group with the higher dose of butaphosphan. Similar results were observed by other authors with inorganic phosphorus, with a lower body weight gain and lower food intake in diets with higher amounts of dietetic phosphorus [33, 34, 35]. In contrast, when the inorganic phosphorus was provided after a deprivation of phosphorus in rats, the body weight was increased immediately, with an equal effect on food intake [36]. Thus, both deprivation and supplementation of dietetic phosphorus exert an effect on body weight and on appetite [37]. However, the exact mechanism by which organic phosphorus exerts effect on body weight is not clear. Another hypothesis for the decrease of body weight could be found in the closely relation of phosphorus and calcium metabolism. The increase of dietetic phosphorus without an adequate calcium balance induces to hormonal changes, which is equivalent to a mild hyperparathyroidism, with decrease of 1,25-dihydroxyvitamin D3 [38] and consequent increase of bone reabsorption and reducing bone mass [1, 39].

The increase of red blood cell count in the groups treated with butaphosphan observed in our study was previously reported by others that utilized the association of butaphosphan and cyanocobalamin in dogs [49] and horses [50]. However, this effect was strongly associated with the cyanocobalamin, essential to the normal maturation and development of red globes [51]. Our study is the first that demonstrates that organic phosphorus can enhance the production of red cells alone, and is possible that this increase reflect in the 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) intracellular concentrations. 2,3-DPG is known to be a major determinant of the avidity of binding of oxygen to hemoglobin; thus, the higher erythrocyte content of 2, 3-DPG, the more easily hemoglobin deliver its oxygen to tissues [52, 53], improving tissue oxygenation.

An interesting pattern was observed in the not challenged groups treated with butaphosphan, with a more pronounced increase on neutrophil and lymphocyte count and higher IL-6 serum concentrations on BUT200 group. This, in addition to the higher body temperature observed on the same group even before the challenge and during the experiment indicates an immune modulation mediated by phosphorus. The higher levels of IL-6 in this group cause the increase on neutrophils on

circulation, because this cytokine stimulate the release of these cells from bone marrow [61]. Also, IL-6 is known to be able to induce a febrile response [60], as confirmed by the higher rectal temperature of mice of BUT200, compared to BUT50 and CTL groups during the experiment. With an extra supply of phosphorus, the non-dividing cells (neutrophil and lymphocyte) could have been benefited, using this surplus to the cellular division and DNA production, increasing its *pool* in blood circulation and being ready to act in response to an injury. In contrast, during the hypophosphatemia, diverse authors have demonstrated that non-dividing cells are affected by the depletion of phosphorus, not only on number, but also in their activity [6, 7, 8].

Isolated, the highest dose of butaphosphan was able to increase the number of circulating neutrophil and lymphocyte; in parallel, when there was the challenge with LPS, the animals treated with the same dose demonstrated a decrease on WBC, reflex of the decrease on lymphocyte count. However, the number of neutrophil did not was increased, as seen in the other two challenged group, regarding its controls (BUT50 x BUT50/LPS and CTL x CTL/LPS). Actually, the number of neutrophil on BUT200/LPS group, that was increased with the butaphosphan treatment alone, sustained the same levels on circulation when was challenged. In addition, young forms of neutrophil was not seen in the circulation (data not shown), which leads us to believe that the immune system was successful in fighting against the infectious process.

The systemic administration of LPS in laboratory mice triggers to an acute phase response, that can include fever [40] or an hypothermic response, as some studies have demonstrated [45,46]. This variation could be explained by the differences in the dose of LPS utilized in each study. Intermediary doses of LPS generally cause fever [42, 43, 44]; in other hand, highest doses of LPS can cause an hypothermic effect [45, 46]. In our study we do not observed any increase on body temperature during the experiment, inside the treatments, that could be explained by the lower dose utilized in the endotoxin challenge, as seen by Copeland et al. (2005). In parallel, the greater concentration of IL-6 in all challenged groups confirm that that the endotoxin challenge was effective, since IL-6 is a classical pro-inflammatory cytokine and its concentration is increased during acute-phase immune response [20]; then, the dose was sufficient to initiate an acute response, but not to increase the body temperature.

In our study, we observed that a high dose of injectable butaphosphan is responsible to cause an inflammatory response, increasing inflammatory markers (defense cells, IL-6 and body temperature), and faced to a challenge, the number of neutrophil do not change, sustained the same circulating levels. In addition, there was an effect of butafosfan on increase of hematopoiesis, independent of the dose utilized. This modulatory effect could be consider positive, in the prevention or as a coadjuvant in the treatment of disease where there are a great immunological challenge, as the cancer in humans and in periods as the peripartum in livestock animals. In both situation, an increase on these markers are important, to prevent greater damage and even other disorders resulting from the metabolic stress suffered. However, studies with intermediary doses of butaphosphan and endotoxin may be performed, beyond phagocytic capacity tests, to complement the evidences found in this study.

Acknowledgments: Patrícia Mattei was supported by a fellowship from National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) from the Brazilian Ministry of Science, Technology, Innovation and Communications.

Author Contributions: Patrícia Mattei, Carolina Bessalho Jacometo, Rubens Alves Pereira and Marcio Nunes Corrêa: conceived and designed the experiments; Patrícia Mattei and Maria Amélia Agnes Weiller: performed the experiment; Patrícia Mattei, Maria Amélia Agnes Weiller and Paula Montagner: performed the laboratory analyzes; Patrícia Mattei and Carolina Bessalho Jacometo: analyzed the data; Patrícia Mattei: wrote the paper; Patrícia Mattei, Carolina Bessalho Jacometo, Rubens Alves Pereira and Marcio Nunes Corrêa: revision and approval of manuscript; CNPq give the financial support.

5 CONCLUSÃO GERAL

A utilização de uma dose alta de butafosfan injetável em animais não desafiados ocasionou levou a uma resposta inflamatória, aumentando o número e os níveis de marcadores inflamatórios (neutrófilos e linfócitos, IL-6 e temperatura), e frente a um desafio com LPS, o número de neutrófilos não mudou, sustentando os mesmos níveis circulantes anteriores ao desafio. Em adição, houve efeito do butafosfan no aumento da hematopoiese, com um aumento do número de eritrócitos, independente da dose utilizada. Tomados em conjunto, esses resultados apontam para um efeito modulatório que pode ser considerado positivo, principalmente na prevenção e também como coadjuvante no tratamento de doenças onde há um grande desafio imunológico, como o câncer em humanos e o período de transição em animais de produção, por exemplo. Em ambas as situações, um aumento dos marcadores inflamatórios é importante, para prevenir danos maiores causados pela própria doença e até mesmo outras desordens secundárias, decorrentes do estresse metabólico causado pela enfermidade principal.

As evidências encontradas neste estudo apontam para os efeitos benéficos do butafosfan na defesa imune inata; no entanto, é primordial que os estudos sejam aprofundados, utilizando doses intermediárias de fósforo orgânico, diferentes doses da endotoxina e até mesmo diferentes situações de desafio bacteriano. Além disso, testes de capacidade fagocitária de neutrófilos e de outras células imunes associados a outras ferramentas da biologia molecular podem auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta imune mediada por estas células. Isto irá permitir que o fósforo, uma molécula tão simples e presente em praticamente todas as reações energéticas possa ser redirecionado para a prevenção de desordens metabólicas, melhorando o *status* imune e conseqüentemente de saúde geral, tanto em animais quanto em humanos.

6 REFERÊNCIAS

- AAFCO, A. O. A. F. C. O. (1997). "Official Publication." Atlanta.
- AKIRA, S., and TAKEDA, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4(7), 499-511.
- AKSU, D. S., AKSU, T., OZSOY, B., and BAYTOK, E. (2010). The effects of replacing inorganic with a lower level of organically complexed minerals (Cu, Zn and Mn) in broiler diets on lipid peroxidation and antioxidant defense systems. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 23(8), 7.
- ALEXANDER, L. S., MAHAJAN, A., ODLE, J., FLANN, K. L., RHOADS, R. P., and STAHL, C. H. (2010). Dietary phosphate restriction decreases stem cell proliferation and subsequent growth potential in neonatal pigs. *J Nutr.* 140(3), 477-82.
- AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D., and ZYCHLINSKY, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 30, 459-89.
- AO, T., PIERCE, J. L., POWER, R., PESCATORE, A. J., CANTOR, A. H., DAWSON, K. A., and FORD, M. J. (2009). Effects of feeding different forms of zinc and copper on the performance and tissue mineral content of chicks. *Poult Sci.* 88(10), 2171-5.
- BAO, Y. M., and CHOCT, M. (2009). Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review. *Animal Production Science.* 49, 14.
- BASRAN, A., JABEEN, M., BINGLE, L., STOKES, C. A., DOCKRELL, D. H., WHYTE, M. K., WALMSLEY, S. R., HIGGINS, K. R., VOGEL, S. N., WILSON, H. L., PRINCE, L. R., PRESTWICH, E. C., SABROE, R. A., PARKER, L. C., and SABROE, I. (2013). Roles of neutrophils in the regulation of the extent of human inflammation through delivery of IL-1 and clearance of chemokines. *J Leukoc Biol.* 93(1), 7-19.
- BATISTEL, F., OSORIO, J. S., FERRARI, A., TREVISI, E., SOCHA, M. T., and LOOR, J. J. (2016). Immunometabolic Status during the Peripartum Period Is Enhanced with Supplemental Zn, Mn, and Cu from Amino Acid Complexes and Co from Co Glucoheptonate. *PLoS One.* 11(5), e0155804.
- BEARD, D. A. (2006). Modeling of oxygen transport and cellular energetics explains observations on in vivo cardiac energy metabolism. *PLoS Comput Biol.* 2(9), e107.
- BERG, J.M., and STRYER, L. (2006). Glycolysis and gluconeogenesis. In "Biochemistry" (J. M. Berg, T. J.L., and L. Stryer, Eds.), pp. 433-474. Freeman and Company, New York.
- BIONAZ, M., THERING, B. J., and LOOR, J. J. (2012). Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha activation. *Br J Nutr.* 107(2), 179-91.
- BORS, S. I., CREANGA, S., DASCALU, D. L., ARITON, A. M., and BORS, A. (2016). The effect of intravenous butaphosphan, B12 and c vitamins on metritis, mastitis prevalence and reproductive performance of dairy cattle. *Cercetari Agronomice in Moldova.* 49 (1) 165-8.

- BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y., and ZYCHLINSKY, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303(5663), 1532-5.
- BRINKMANN, V., and ZYCHLINSKY, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 5(8), 577-82.
- BUN, S. D., GUO, Y. M., GUO, F. C., JI, F. J., and CAO, H. (2011). Influence of organic zinc supplementation on the antioxidant status and immune responses of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poult Sci*. 90(6), 1220-6.
- CRADDOCK, P. R., YAWATA, Y., VANSANTEN, L., GILBERSTADT, S., SILVIS, S., and JACOB, H. S. (1974). Acquired phagocyte dysfunction. A complication of the hypophosphatemia of parenteral hyperalimentation. *N Engl J Med*. 290(25), 1403-7.
- CUNNINGHAM, J. G. (2002). "Textbook of Veterinary Physiology." 3rd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- DELMASTRO-GREENWOOD, M. M., and PIGANELLI, J. D. (2013). Changing the energy of an immune response. *Am J Clin Exp Immunol*. 2(1), 30-54.
- DINARELLO, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118(2), 503-8.
- DINARELLO, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 27, 519-50.
- ECHEVERRY, H., YITBAREK, A., MUNYAKA, P., ALIZADEH, M., CLEAVER, A., CAMELO-JAIMES, G., WANG, P., O, K., and RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. (2016). Organic trace mineral supplementation enhances local and systemic innate immune responses and modulates oxidative stress in broiler chickens. *Poult Sci*. 95(3), 518-27.
- EISENBERG, S. W., RAVESLOOT, L., KOETS, A. P., and GRUNBERG, W. (2014). Influence of feeding a low-phosphorus diet on leucocyte function in dairy cows. *J Dairy Sci*. 97(8), 5176-84.
- FAN, H., and COOK, J. A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res*. 10(2), 71-84.
- FURLL, M., DENIZ, A., WESTPHAL, B., ILLING, C., and CONSTABLE, P. D. (2010). Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 93(9), 4155-64.
- GANESHAN, K., and CHAWLA, A. (2014). Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 32, 609-34.
- GREENHILL, C. J., ROSE-JOHN, S., LISSILAA, R., FERLIN, W., ERNST, M., HERTZOG, P. J., MANSELL, A., and JENKINS, B. J. (2011). IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *J Immunol*. 186(2), 1199-208.
- GROEMPING, Y., LAPOUGE, K., SMERDON, S. J., and RITTINGER, K. (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. 113(3), 343-55.
- GRUNBERG, W. (2014). Treatment of phosphorus balance disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 30(2), 383-408, vi.

- HEYER, C. M., WEISS, E., SCHMUCKER, S., RODEHUTSCORD, M., HOELZLE, L. E., MOSENTHIN, R., and STEFANSKI, V. (2015). The impact of phosphorus on the immune system and the intestinal microbiota with special focus on the pig. *Nutr Res Ver.* 28(1), 67-82.
- HIRANO, T., AKIRA, S., TAGA, T., and KISHIMOTO, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 11(12), 443-9.
- HUNTER, C. A., and JONES, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 16(5), 448-57.
- INAL, F., COSKUN, B., GULSEN, N., and KURTOGLU, V. (2001). The effects of withdrawal of vitamin and trace mineral supplements from layer diets on egg yield and trace mineral composition. *Br Poult Sci.* 42(1), 77-80.
- JACOMETO, C. B., OSORIO, J. S., SOCHA, M., CORREA, M. N., PICCIOLI-CAPPELLI, F., TREVISI, E., and LOOR, J. J. (2015). Maternal consumption of organic trace minerals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress. *J Dairy Sci.* 98(11), 7717-29.
- JOKINEN, E. I., VIELMA, J., AALTONEN, T. M., and KOSKELA, J. (2003). The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responses of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 15(2), 159-68.
- JONES, S. A., RICHARDS, P. J., SCHELLER, J., and ROSE-JOHN, S. (2005). IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res.* 25(5), 241-53.
- KAPLANSKI, G., MARIN, V., MONTERO-JULIAN, F., MANTOVANI, A., and FARNARIER, C. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 24(1), 25-9.
- KEGLEY, E. B., SPEARS, J. W., and AUMAN, S. K. (2001). Dietary phosphorus and an inflammatory challenge affect performance and immune function of weanling pigs. *J Anim Sci.* 79(2), 413-9.
- KIERSZTEJN, M., CHERVU, I., SMOGORZEWSKI, M., FADDA, G. Z., ALEXIEWICZ, J. M., and MASSRY, S. G. (1992). On the mechanisms of impaired phagocytosis in phosphate depletion. *J Am Soc Nephrol.* 2(10), 1484-9.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., and TAGA, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science.* 258(5082), 593-7.
- KLEBANOFF, S. J., KETTLE, A. J., ROSEN, H., WINTERBOURN, C. C., and NAUSEEF, W. M. (2013). Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol.* 93(2), 185-98.
- KOMINSKY, D. J., CAMPBELL, E. L., and COLGAN, S. P. (2010). Metabolic shifts in immunity and inflammation. *J Immunol.* 184(8), 4062-8.
- KOTHARI, N., KESHARI, R. S., BOGRA, J., KOHLI, M., ABBAS, H., MALIK, A., DIKSHIT, M., and BARTHWAL, M. K. (2011). Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. *J Crit Care.* 26(4), 435 e1-7.
- LEESON, S. (2003). A new look at trace mineral nutrition of poultry: Can we reduce the environmental burden of poultry manure? In "Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries" (T. P. J. Lyson, K. A., Ed.), pp. 125-129. Nottingham University Press, Nottingham.

- MANANGI, M. K., VAZQUES-ANON, M., RICHARDS, J. D., and KNIGHT, C. D. (2015). The impact of feeding supplemental chelated trace minerals on shell quality, tibia breaking strength, and immune response in laying hens. *The Journal of Applied Poultry Research*. 24(3), 11.
- METZLER, K. D., FUCHS, T. A., NAUSEEF, W. M., REUMAUX, D., ROESLER, J., SCHULZE, I., WAHN, V., PAPAYANNOPOULOS, V., and ZYCHLINSKY, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 117(3), 953-9.
- MISHRA, S. K., SWAIN, R. K., SAHOO, G., BEHURA, N. C., SETHI, K., CHICHILICHI, B., MISHRA, S. R., BEHERA, T., DHAMA, K., and SWAIN, P. (2014). Effects of organic mineral supplementation on growth, bioavailability and immunity of Layer Chicks. *International Journal of Farmacology*. 10(5), 12.
- MOHANTA, R. K., and GARG, A. K. (2014). Organic Trace Minerals : Immunity, Health, Production and Reproduction in Farm Animals. *Indian Journal of Animal Nutrition* 31(3), 11.
- MULLARKY, I. K., WARK, W. A., DICKENSON, M., MARTIN, S., PETERSSON-WOLFE, C. S., and KNOWLTON, K. F. (2009). Short communication: analysis of immune function in lactating dairy cows fed diets varying in phosphorus content. *J Dairy Sci*. 92(1), 365-8.
- MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., and RODWELL, V. W. (2000). "Harper's Biochemistry." 25th ed. McGraw-Hill Companies.
- NETEA, M. G., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W., DINARELLO, C. A., and JOOSTEN, L. A. (2015). Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol*. 33, 49-77.
- O'NEILL, L. A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology*. 18, 7.
- O'NEILL, L. A., GOLENBOCK, D., and BOWIE, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 13(6), 453-60.
- PALSSON-MCDERMOTT, E. M., and O'NEILL, L. A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 113(2), 153-62.
- PARKER, H., ALBRETT, A. M., KETTLE, A. J., and WINTERBOURN, C. C. (2012). Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J Leukoc Biol*. 91(3), 369-76.
- PEREIRA, R. A., SILVEIRA, P. A., MONTAGNER, P., SCHNEIDER, A., SCHMITT, E., RABASSA, V. R., PFEIFER, L. F., DEL PINO, F. A., PULGA, M. E., and CORREA, M. N. (2013). Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal*. 7(7), 1143-7.
- PFEIFFER, T., SCHUSTER, S., and BONHOEFFER, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*. 292(5516), 504-7.
- POWER, R., and HORGAN, K. (2000). Biological chemistry and absorption of inorganic and organic trace metals. 1st ed. In "Biotechnology in the feed industry." (T. P. Lyons, and K. A. Jacques, Eds.), pp. 277-291. Nottingham University Press., Nottingham.

- Pulli, B., Ali, M., FORGHANI, R., SCHOB, S., HSIEH, K. L., WOJTKIEWICZ, G., LINNOILA, J. J., and CHEN, J. W. (2013). Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One*. 8(7), e67976.
- RICHARDS, J. D., ZHAO, J., HARRELL, R. J., ATWELL, C. A., and DIBNER, J. J. (2010). Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23(11), 8.
- ROLLIN, E., BERGHAUS, R. D., RAPNICKI, P., GODDEN, S. M., and OVERTON, M. W. (2010). The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 93(3), 978-87.
- SBARRA, A. J., and KARNOVSKY, M. L. (1959). The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. 234(6), 1355-62.
- SHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D., and ROSE-JOHN, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 1813(5), 878-88.
- SEELY, A. J., PASCUAL, J. L., and CHRISTOU, N. V. (2003). Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care*. 7(4), 291-307.
- SEGAL, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*. 23, 30.
- SOETAN, K. O., OLAYA, C. O., and OYEWOLE, O. E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*. 4(5), 22.
- SWECKER, W. S. (2014). Trace mineral feeding and assessment. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 30(3), 671-88.
- SWIATKIEWICZ, S., ARCZEWSKA-WLOSEK, A., and JOZEFIAK, D. (2014). The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. *World's Poultry Science Journal*. 70(3), 12.
- TAK, T., TESSELAAR, K., PILLAY, J., BORGHANS, J. A., and KOENDERMAN, L. (2013). What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*. 94(4), 595-601.
- TAKEDA, E., YAMAMOTO, H., YAMANAKA-OKUMURA, H., and TAKETANI, Y. (2012). Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutr Rev*. 70(6), 311-21.
- TANAKA, A., CHANCE, B., and QUISTORFFS, B. (1989). A Possible Role of Inorganic Phosphate as a Regulator of Oxidative Phosphorylation in Combined Urea Synthesis and Gluconeogenesis in Perfused Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 264(17), 7.
- TANAKA, S., YAMAMOTO, H., NAKAHASHI, O., KAGAWA, T., ISHIGURO, M., MASUDA, M., KOZAI, M., IKEDA, S., TAKETANI, Y., and TAKEDA, E. (2013). Dietary phosphate restriction induces hepatic lipid accumulation through dysregulation of cholesterol metabolism in mice. *Nutr Res*. 33(7), 586-93.

- TREVISI, E., AMADORI, M., COGROSSI, S., RAZZUOLI, E., and BERTONI, G. (2012). Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Res Vet Sci.* 93(2), 695-704.
- UNDERWOOD, E. J., and SUTTLE, N. F. (1999). "The Mineral Nutrition of Livestock." 3th ed. CABI Publishing, Wallingford.
- VALENTINE, W. N., and BECK, W. S. (1951). Biochemical studies on leucocytes. I. Phosphatase activity in health, leucocytosis, and myelocytic leucemia. *J Lab Clin Med.* 38(1), 39-55.
- VAN RAAM, B. J., VERHOEVEN, A. J., and KUIJPERSA, T. W. (2006). Mitochondria in Neutrophil Apoptosis. *International Journal of Hematology.* 84.
- WEISS, E., and WARDROP, K. J. (2010). "Veterinary Hematology." Wiley-Blackwell, Iowa.
- XIE, W., LI, Y., MECHIN, M. C., and VAN DE WERVE, G. (1999). Up-regulation of liver glucose-6-phosphatase in rats fed with a P(i)-deficient diet. *Biochem J.* 343 Pt 2, 393-6.
- XIE, W., TRAN, T. L., FINEGOOD, D. T., and VAN DE WERVE, G. (2000). Dietary P(i) deprivation in rats affects liver cAMP, glycogen, key steps of gluconeogenesis and glucose production. *Biochem J.* 352 Pt 1, 227-32.
- YIN, Q., FU, T. M., LI, J., and WU, H. (2015). Structural biology of innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 33, 393-416.