

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FAULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PABLO GOMES NOLETO

**EFEITO DO METABOLISMO NA RESPOSTA IMUNE INATA NO
ENDOMÉTRIO BOVINO**

UBERLÂNDIA

2016

PABLO GOMES NOLETO

EFEITO DO METABOLISMO NA RESPOSTA IMUNE INATA DO
ENDOMÉTRIO BOVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. João Paulo E. Saut

Co-Orientador: Professor I. Martin Sheldon

UBER

Outubro - 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N791e
2016 Noleto, Pablo Gomes, 1985
 Efeito do metabolismo na resposta imune inata do endométrio
 bovino / Pablo Gomes Noleto. - 2016.
 91 f. : il.

Orientador: João Paulo E. Saut.

Coorientador: I. Martin Sheldon.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Doenças - Teses. 3. Endométrio -
Doenças - Teses. 4. Glicose - Teses. I. Saut, João Paulo Elsen. II.
Sheldon, I. Martin. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PABLO GOMES NOLETO – Nasceu em Barra do Garças, Mato Grosso, em 21 de outubro de 1985, filho de Américo Miranda Noleto e Cláudia Laiz Gomes de Melo Noleto. Médico Veterinário, graduado em 25 de julho de 2008 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, onde foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas do Ensino de Graduação na área de Anatomia Animal e desenvolveu Iniciação Científica na área de Imunoparasitologia. Em 2009 iniciou Residência em Patologia Clínica Veterinária no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Um ano após iniciou Mestrado em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de Saúde Animal, Patologia Clínica Veterinária, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Iniciou seu Doutorado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Uberlândia, área de Saúde Animal, Imunologia da Reprodução, em agosto de 2013. Realizou Doutorado Sanduíche em 2015 no Institute of Life Science, Swansea University, Swansea, Reino Unido, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Atualmente é Fiscal Estadual Agropecuário do Estado de Goiás, desenvolvendo atividades no Laboratório de Diagnóstico Animal – AGRODEFESA. Tem experiências nas áreas de patologia clínica veterinária, imunologia, microbiologia, doenças bacterianas.

Are the wonders of my world

Adele

Aos meus pais, Américo e Cláudia, e Sholeem Griffin

AGRADECIMENTOS

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela oportunidade do Doutorado Sanduíche.

A **Universidade Federal de Uberlândia e Faculdade de Medicina Veterinária**, por ser minha segunda casa, e em especial a **Célia Macedo**, sempre me auxiliando e me orientando.

Ao **Prof. Dr. Mundim**, por ter sempre acreditado em mim e me dado a oportunidade de ser seu orientado por tanto tempo, e me ensinado muito do que sei.

Ao **Prof. Dr. João Paulo**, meu orientador, que me concedeu essa grande oportunidade de ser seu orientado, me relocando na área que sempre me identifiquei, imunologia, e me indicando a Swansea University, onde tive os melhores momentos da minha vida tanto acadêmica quanto pessoal. Muito obrigado.

Diolch ao **Prof. I. Martin Sheldon**, que me recebeu de braços abertos, me dando oportunidades de crescer onde jamais achei que seria capaz. Sempre prestativo e solícito, agradeço essa imensa oportunidade de crescer ao lado do melhor.

A **Swansea University**, por me permitir trabalhar com toda a infraestrutura necessária e desejável que qualquer pesquisador sonharia.

Aos amigos do Institute of Life Science, **Matt, Sîan**, em especial **Dr. James Cronin** que sempre estiveram do meu lado esclarecendo todas minhas dúvidas. A **Sholeem Griffin**, grande parte de tudo nada seria possível sem sua assistência e disposição. Não há palavras o suficiente para agradecê-la nessa imensa caminhada que realizamos juntos.

Um obrigado especial a **Dra. Luísa Carneiro** que me introduziu à Swansea da

melhor maneira possível. E sempre estive presente até mesmo nos finais de semana de trabalho.

Aos grandes amigos de Swansea, **Ayyub, Angharad, Paul, Sean, Dan, Phill, Nikki, John**. Sem vocês não seria fácil suportar uma chuvosa Swansea. Aos meus *roomates* **Douglas, Kate, Jess, Aaron, Marc, Chloe, Jean**. Como era bom chegar em casa e ter vocês. Um especial obrigado a minha *landlady* **Yvone** que me permitiu sonhar dentro de sua casa, sempre dedicada a mim e ao meu melhor, vivenciando experiências que jamais imaginei passar.

Diolch yn fawr a **Jordan Rosser** por tornar minha vida em Swansea mais prazerosa e única, presente tanto nos momentos de dificuldade quanto nos de felicidade, me acompanhando integralmente nesse sonho que foi viver em Swansea. Não tenho palavras o suficiente para descrever o quão sou grato por tê-lo ao meu lado.

Ao **Laboratório de Saúde em Grandes Animais**, em especial a Paula e Amanda.

Aos meus queridos da **57º Turma de Veterinária UFU**, que estão sempre unidos, um muito obrigado para **Denise e Ana Maria**, e um obrigado especial aqueles que já são doutores e exemplos para mim, **Eliane, Marília, Líria, João, Carol Osava**.

Aos grandes amigos da **Agrodefesa Caiapó**, em especial **Carmelita, Nara e Valfrido**. Aos mais novos amigos da **Agrodefesa LABVET**, em especial **Rafael Vieira**, por batalhar e acreditar em mim desde o começo.

A minha família, **Américo, Cláudia**, sempre presente e apoiando toda minha caminhada até a realização desse sonho, tanto para mim quanto para eles, em especial a **Sanir**, que sempre foi e sempre será meu exemplo a ser seguido.

RESUMO

Contaminação bacteriana que normalmente infecta o endométrio bovino no pós-parto prejudica a defesa imunológica quando há estresse metabólico, levando a endometrite e infertilidade. A resposta do endométrio contra bactérias depende da imunidade inata, com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, estimulando a inflamação, caracterizadas por secreção de interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-8. Entretanto, animais frequentemente falham em eliminar a infecção microbiana quando apresentam reduzidas concentrações de glicose e glutamina, que são fontes de energia para o endométrio no conhecido balanço energético negativo. A contínua inflamação e resposta imune inata contra infecção bacteriana no útero após o parto compromete o bem-estar animal. Neste estudo testou-se a hipótese de que as vias homeostáticas conferidas pela glicose, glutamina e biotina integram o metabolismo energético e a imunidade inata no tecido endometrial bovino. A ausência de glicose reduziu a secreção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em culturas de órgãos endometriais desafiadas com a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS). Depleção de glutamina também reduziu a atividade inflamatória do endométrio contra LPS. Entretanto, as atividades de glicose e glutamina dependem da presença de glicólise. A vitamina biotina demonstrou ter caráter anti-inflamatório, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias no endométrio. Em conclusão, o estresse energético metabólico afetou as respostas inflamatórias à infecções bacterianas no endométrio. Providenciamos dados que demonstram como o balanço energético negativo pode estar ligado a doença uterina no pós-parto.

Palavras-chaves: balanço energético negativo, biotina, doença uterina, endométrio

bovino, glicose, glutamina, lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

Bacteria that usually infect the bovine endometrium at postpartum impairs immune defense when exist metabolic stress, leading to endometritis and infertility. The response of the endometrium to bacteria depends on innate immunity, with the recognition of pathogen-associated molecular patterns by stimulating inflammation, characterized by secretion of interleukins (IL) -1 β , IL-6 and IL-8. However, animals often fail to eliminate the microbial infection when they have reduced levels of glucose and glutamine, which are sources of energy to the endometrium in the negative energy balance. Continuous inflammation and innate immune response to bacterial infection in the uterus after calving compromise animal welfare. In this study we tested the hypothesis that homeostatic pathways conferred by glucose , glutamine and biotin, link the energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrial tissue. The deprivation of glucose reduced the secretion of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in cultures of endometrial organs challenged with the endotoxin lipopolysaccharide (LPS). Glutamine depletion also reduces the inflammatory activity of the endometrium to LPS. However, glucose and glutamine activities depend on the presence of glycolysis. The vitamin biotin demonstrates anti-inflammatory nature, reducing the production of pro-inflammatory cytokines in the endometrium. In conclusion, the energy metabolic stress disrupts inflammatory responses to bacterial infections in the endometrium. We provide data on how negative energy balance may be linked to postpartum uterine disease.

Keywords: glucose, glutamine, biotin, lipopolysaccharide, bovine endometrium, negative energy balance, uterine disease

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Disponibilidade reduzida de glicose limita a resposta inflamatória contra padrões moleculares associados a patógeno 58
- Figura 2.** Disponibilidade de glicose modula a inflamação no tecido endometrial 59
- Figura 3.** IGF-1 não modula a inflamação no tecido endometrial 60
- Figura 4.** LPS induz ao estresse metabólico no tecido e células endometriais 61
- Figura 5.** Expressão dos genes *IL-1 α* , *IL-6* e *CXCL8* no endométrio bovino em resposta a LPS em diferentes concentrações de glicose 62

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Glutamina modula resposta inflamatória contra LPS 77
- Figura 2.** Glicose modula as respostas inflamatórias a LPS, mesmo na ausência de glutamina 78
- Figura 3.** A glicólise é importante para as respostas inflamatórias a LPS 79

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Biotina na presença de glutamina reduz a produção de IL-6 e IL-8 em tecido endometrial desafiado com LPS 91
- Figura 2.** Biotina na presença de glicose reduz a produção de IL-6 e IL-8 em tecido endometrial desafiado com LPS 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DG	2-deoxi-glicose
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Trifosfato de adenosina
BBSRC	Biotechnology and Biological Science Research Council
BEN	Balanço energético negativo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico
DMEM	Meio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribunocleico
ECAR	Taxa de acidificação extracelular
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
EUA	Estados Unidos da América
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FSL	Proteína estimulante de fibroblasto
h	Horas
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mTOR	Proteína alvo de rapamicina em mamíferos
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-kB	Fator nuclear kB
ng	Nanograma
OXFOS	Fosforilação oxidativa
PAM	Pam(3)CSK(4)
pg	Picograma
PMAP	Padrões moleculares associados a patógenos
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
SFB	Soro fetal bovino
TLR	Receptores Toll-like
UI	Unidades internacionais

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	13
CAPÍTULO 2 - Efeito da glicose no metabolismo energético e imunidade inata no endométrio bovino	33
CAPÍTULO 3 - Glutamina modula resposta inflamatória contra lipopolissacarídeo no endométrio bovino	63
CAPÍTULO 4 - Endométrio bovino responde a biotina com redução de citocina e quimiocina pró-inflamatórias	80

Capítulo 1 – Considerações Gerais

Infecções bacterianas do útero causam doença e infertilidade no gado leiteiro, particularmente após o parto, quando levam a causa de metrite e endometrite em até 40% dos animais (SHELDON et al., 2006).

Já é bastante compreendido que *Escherichia coli*, isolada do lúmen uterino, está associado com contaminação fecal do útero durante o parto, embora o nível da contaminação fecal em fazendas não afeta o microbioma uterino ou agrava a severidade da endometrite (CARNEIRO; CRONIN; SHELDON, 2016).

E. coli é uma importante causa de patologia no endométrio (SHELDON et al., 2010), com infecções frequentemente em conjunto com *Trueperella pyogenes* e bactérias anaeróbicas (SHELDON et al., 2002). Além do mais, infecção com *E. coli* é associada a efeitos negativos no ovário, eixo hipotalâmico-pituitário, e bem-estar animal (WILLIAMS et al., 2007).

O útero é capaz de bloquear e eliminar patógenos invasores via próprio mecanismo de defesa por barreiras físicas e funções imunes, assim mantendo suas atividades fisiológicas normais. Porém, danos aos sistema imune é comumente resultado de inflamação uterina e levando a doença, infertilidade e até mesmo a morte (FU et al., 2013).

O sistema imune e a reprodução podem aparecer funcionalmente separados mas existe uma complexa ligação entre ambos os sistemas. Assim, o sistema reprodutivo encontra vários desafios incluindo doenças sexualmente transmitidas, infecções sistêmicas que afetam órgãos reprodutivos e condições para inflamação crônica, o que pode ser solucionado por intermeio do sistema imune (KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011)

O sistema imune é dividido em resposta inata e resposta adaptativa. Embora a resposta adaptativa é mais robusta e específica, a ativação efetiva de específicos

antígenos é realizada por meio da resposta imune inata (KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011)

Enquanto as vezes é considerado que a resposta imune inata é primitiva comparada a adaptativa, a inata vem sendo redefinida por um longo período, e é mais eficiente na maioria dos casos (BEUTLER, 2004).

Esses dois sistemas são sequencialmente ativados durante uma infecção e trabalham cooperativamente para erradicar o agente microbiano. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o agente invasor, por outro lado, a adaptativa é tardia, quase 4-7 dias após infecção, e inclui especificidade e longa duração baseada na expansão clonal de linfócitos (KAWAI; AKIRA, 2010).

O sistema imune confere proteção contra uma variedade de patógenos e é baseado em um limitado repertório de receptores chamados de Receptores de Reconhecimento Padrão (RRP). Dessa forma, os receptores têm a habilidade de reconhecer componentes bacterianos conservados evolutivamente, conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PMAP). O reconhecimento de agentes microbianos é um elemento essencial para o início da resposta imune inata e resposta inflamatória (KAWAI; AKIRA, 2010)

Diferentes RRP's podem reconhecer os mesmos PMAPs, assim, orquestram específicos patógenos e células específicas do hospedeiro para combater infecções (JANEWAY, 1989; KAWAI; AKIRA, 2011).

A resposta a infecção microbiana no endométrio depende do RRP's, como os receptores Toll-Like, que são expressos por células do endométrio. Em particular, células epiteliais e estromais respondem a *E. coli* por meio do Receptor Toll-Like – 4 (TLR-4), se ligando ao lipopolissacarídeo (LPS) (CRONIN et al., 2012).

Receptores Toll-like são RRP's definidos como proteínas ligadas a membrana

usualmente presentes na superfície das células, mas também podem estar ligadas internamente em endossomas (MEYLAN; TSCHOPP, 2006).

Evidência dos RRP's foi primeiramente descoberta usando *Drosophila melanogaster*, onde o "Toll" foi necessário para proteção contra infecção fúngica (LEMAITRE et al., 1996). O primeiro receptor Toll-like em mamíferos foi identificado em um camundongo mutante, onde TLR-4 protegeu contra a infecção bacteriana gram-negativa pelo reconhecimento do LPS. (POLTORAK, 1998).

Diferentes tipos celulares expressam diversos TLRs, algumas dessas células incluem monócitos e células dendríticas (MUZIO et al., 2000; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; KAWAI; AKIRA, 2006) São expressados em diferentes células e em específicos tecidos, embora, os mecanismos que regulam a expressão do gene para TLR na resposta de mediadores inflamatórios não está totalmente esclarecido (MOGENSEN, 2009). Receptores Toll-like são amplamente divididos em dois subgrupos dependendo de sua localização e respectivo PAMP ligante. Um grupo é composto por TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-11, que são expressados na superfície de células e reconhecem principalmente componentes da membrana bacteriana como lipídio, proteína e lipoproteína. Outro grupo é composto por TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9, que são expressados em vesículas intracelulares como retículo endoplasmático, endossoma, lisossoma, onde reconhecem ácidos nucleicos de bactérias. (KAWAI; AKIRA, 2010).

O TLR-4 é o mais extensivamente estudado RRP e ele reconhece uma variedade de ligantes (proteínas do hospedeiro e de vírus, fibrinogênio, pneumolisina) mas é mais conhecido por reconhecer o LPS. O que foi evidenciado quando analisaram camundongos *knock-out* para TLR-4, demonstrando não serem respondentes ao LPS (HOSHINO et al., 1999).

A imunidade inata no trato genital é altamente dependente da expressão de TLRs que detectarão PMAPs. Os TLRs, são conservados filogeneticamente e são capazes de detectar uma quantidade diferente de PMAPs associados a fungos, vírus e bactérias (BEUTLER, 2004; AKIRA et al., 2006). O reconhecimento da imunidade inata de componentes microbianos é um papel crítico para defesa do hospedeiro contra infecção (KAWAI; AKIRA, 2010). Embora esse reconhecimento participa de um papel maior nos mecanismos de defesa uterina, como isso se procede ainda não é totalmente elucidado (ESPOSITO et al., 2014).

Os PMAPs são evolutivamente conservados em patógenos e geralmente críticos para a infecção e patogênese. TLRs reconhecem PMAPs tais como peptídeoglicano, lipopolissacarídeo (LPS), ácidos nucleicos, permitindo a iniciação de um complexo sinal em cascata que termina na ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, e produção de citocinas, quimiocinas e até prostaglandinas (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; LI; VERMA, 2002; AKIRA; TAKEDA, 2004; KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011).

A defesa do endométrio contra infecções parece estar ligada a imunidade inata, que quando ativada leva a uma resposta inflamatória produzindo citocinas (WIRA et al., 2005; MOR; CARDENAS, 2010).

Durante o período pós-parto, há um aumento na expressão de genes referentes a codificação de TLRs, mediadores inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1A, IL-6, IL-8 e IL-1B, além de moléculas efetoras como as proteínas de fase aguda, são características da resposta imune local do endométrio (CHAPWANYA et al., 2009).

O processo da ligação ao TLR induz vias de sinalização terminando na produção de citocinas pró-inflamatórias. Quimiocinas, como a IL-8, atrai neutrófilos e

macrófagos para o sítio de infecção e dano tecidual, onde essas células hematopoiéticas são reguladas por citocinas como a IL-6. No útero pós-parto, o epitélio é frequentemente lesionado, com migração de neutrófilos e macrófagos por meio do estroma (HURST et al., 2001; KAWAI; AKIRA, 2006; CARNEIRO; CRONIN; SHELDON, 2016).

O estresse metabólico compromete a resposta inflamatória contra infecções bacterianas no útero bovino após o parto (WATHES et al., 2009).

Atualmente, o gado de leite foi geneticamente selecionado para uma maior produção de leite, em até três vezes mais em comparação ao gado não selecionado. Durante o início da lactação, estas vacas são fisicamente incapazes de alimentar o suficiente para atender a demanda de nutrientes (especialmente a glicose) necessária para suportar os níveis extremamente elevados da produção de leite. Consequentemente, o gado entra em um estado de balanço energético negativo crônico (BEN), levando a mobilização do tecido adiposo para fornecer glicose para a produção de leite. BEN é um fator de risco para disfunção ovariana (LEROY et al., 2008) aparentemente por causa das adaptações hormonais e metabólicas que ocorrem em resposta a BEN. Consequentemente, estas vacas têm muito baixa fertilidade (WATHES et al., 2007) caracterizada, entre outras coisas, pela prolongado anestro pós-parto, anovulação e do desenvolvimento de folículos ovarianos císticos. Existe evidência considerável de estudos em diversas espécies que mostram que a hipoglicemia e BEN inibem o sistema reprodutivo a nível hipotalâmico (FURMAN; WADE, 2007).

Sugeriu-se que o BEN impede a resposta inflamatória e a eliminação da bactéria no endométrio, levando a endometrite crônica (WATHES et al., 2009; ESPOSITO et al., 2014), isso é controverso porque a indução de BEN não impediu a resposta imune inata contra bactérias na glândula mamária bovina (MOYES et al., 2009).

O gado de leite tem baixas concentrações de glicose no sangue periférico, porque a glicose é rapidamente sequestrada pela glândula mamária para produção de energia e lactose (LUCY, 2006)

A homeostase da energia celular depende de múltiplos sistemas, incluindo *uptake* de glicose via transportadores de glicose na membrana plasmática, produção de ATP via glicólise, ciclo de Krebs e glutaminólise (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011; HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012).

A glicose é um substrato de energia importante para a geração de ATP para as funções metabólicas e fisiológicas do endométrio (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016). A glicose pode ser metabolizada ao longo de diferentes vias, incluindo a glicólise, a via de síntese de glicogênio, a via de hexosamina e a via da pentose fosfato. Independentemente da via, o primeiro passo é o metabolismo da glicose em piruvato. Os resultados desses caminhos são ATP e NADPH (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016).

A glicose é a principal fonte de energia nas células vivas. Assim, o seu desequilíbrio pode prejudicar a função celular normal e a imunidade de organismos (CHEN et al., 2016) Sua participação no metabolismo está envolvida na glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (OXFOS) (DIMELOE et al., 2016).

Em piruvato, a glicose é convertida por meio de reações enzimáticas sequenciais que ocorrem no citosol. Os intermediários do processo podem ser posteriormente metabolizados para produzir precursores para a síntese de ácidos nucleicos, lipídeos e aminoácidos. O piruvato pode ser oxidado nas mitocôndrias completando o ciclo de Krebs ou reduzido a lactato e excretado (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011; DIMELOE et al., 2016).

O piruvato, uma vez convertido na mitocôndria a acetil-CoA pela piruvato

desidrogenase, entra no ciclo de Krebs para se obter intermediários biosintéticos (citrato, α -cetogluturato e oxaloacetato) e reduz a carregadores de elétrons (NADH e FADH₂) que conduz a OXPHOS pela cadeia de transporte de elétrons. (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011; DIMELOE et al., 2016).

O metabolismo da glicose vem sendo demonstrado como vital para células do sistema imune, como no caso de linfócitos (DIMELOE et al., 2016) e macrófagos (TANNAHILL et al., 2013), porém, nesses casos, a excreção de lactato é aumentada, indicando um aumento da redução de piruvato em lactato, em vez da oxidação do piruvato através do ciclo de Krebs e consequente produção de ATP. Este 'Warburg Effect' (glicólise aeróbica) foi descrito pela primeira vez em células tumorais (WARBURG, 1956), onde as células rapidamente geram ATP e substratos de carbono a partir do fluxo de glicose através da glicólise, em vez do ciclo de Krebs (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; LEVINE; PUZIO-KUTER, 2010). Curiosamente, as respostas imunes inatas contra bactérias também induzem o efeito Warburg em macrófagos (TANNAHILL et al., 2013).

Aminoácidos não essenciais também tem importante papel na função do sistema imune. Entre eles, glutamina é um dos mais versáteis aminoácidos em termos de uso metabólico aplicada a ciência animal (LOBLEY; HOSKIN; MCNEIL, 2001).

As células utilizam a glutamina para variadas funções. É amplamente reconhecida como um nutriente primário para manutenção da homeostase corporal em mamíferos sendo o mais abundante aminoácido no plasma (aproximadamente 20%) (SCALISE et al., 2015). Glutamina é classificada entre os aminoácidos não essenciais uma vez que pode ser sintetizada a partir de α -cetogluturato. Entretanto, se torna essencial condicionalmente durante proliferação celular e sob condições de doenças específicas (CAREY et al., 2015). De fato, em caso de alta demanda de energia,

glutamina endógena não é o suficiente e é necessário adquirir glutamina pela dieta (SCALISE et al., 2015). Glutamina entra no ciclo de Krebs como α -cetoglutarato e em teoria é capaz de produzir 8 NADH, 3 FADH₂ e 3 ATP, após completa oxidação. Mais ATPs serão produzidos após a completa fosforilação oxidativa (Moreno-Sanchez et al., 2014; Wu, 2009).

Pode ainda representar energia para células por: fornece átomos de carbono para o ciclo de Krebs desencadeando produção de ATP sob condições metabólicas normais. Pode ser ainda usada para formação de glicose por meio da gliconeogênese.

Mitocondrial glutaminase é a enzima chave para catalisar a conversão de glutamina em glutamato que pode produzir α -cetoglutarato. Então, glutamina entra no ciclo de Krebs como α -cetoglutarato e produz ATP por meio da via succinil-CoA sintetase. (SCALISE et al., 2015).

A glutamina é capaz de regular a expressão de vários genes envolvidos na sinalização celular, metabolismo, proliferação celular, defesa celular (CURI et al., 2005; BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2009).

Vacas com infusão intravenosa com glutamina demonstraram modulação de proteínas de fase aguda, sugestionando um possível papel desta na produção de citocinas por células do sistema imune (JAFARI et al., 2006). Estudos em animais informam que a administração de glutamina pode aumentar a produção de IL-1 β e IL-6 por macrófagos (WELLS et al., 1999). Em outro estudo em vacas demonstrou-se que suplementação com glutamina tem altas produções de IL-6 (CAROPRESE et al., 2012), mostrando uma dose dependência de suplementação dela na função imune de vacas e modulação da produção de citocinas.

Vitaminas como a Biotina, também são importantes para o sistema imune funcionar efetivamente (MAGGINI et al., 2007). Ainda há outros importantes papéis

para biotina como na regulação do estresse celular oxidativo, expressão de genes e na função efetiva de células do sistema imune (RODRIGUEZ-MELENDÉZ; ZEMPLÉNI, 2003; KUROISHI et al., 2008; SAID, 2012; KUROISHI, 2015; AGRAWAL; AGRAWAL; SAID, 2016).

Estudos anteriores demonstraram que a deficiência de biotina tem um impacto na resposta imune (KUROISHI et al., 2008; KUROISHI, 2015) e em células dendríticas (AGRAWAL; AGRAWAL; SAID, 2016).

Ruminantes produzem biotina como resultado da fermentação bacteriana no rúmen, e é um nutriente essencial tanto para o crescimento bacteriano quanto para gado de leite. Recentes estudos demonstram que a suplementação com biotina é importante para aumentar a lactação no gado leiteiro (CHEN et al., 2011; LEAN; RABIEE, 2011), mas ainda como a biotina interage com a resposta imune no endométrio, ainda não é esclarecida.

A biotina pode ainda afetar o crescimento, proliferação e diferenciação celular (DAKSHINAMURTI; CHALIFOUR; BHULLAR, 1985). Potencialmente, o crescimento celular anormal e diferenciação pode levar a função imune diminuída (BÁEZ-SALDAÑA et al., 1998). Estudos prévios têm fornecido evidência de que células mononucleares humanas respondem a proliferação celular com maior absorção de biotina (ZEMPLÉNI; MOCK, 1999), mediada pelo aumento da expressão de transportadores de biotina (ZEMPLÉNI; STEVEN STANLEY; MOCK, 2001). As células em proliferação utilizam esta vitamina para aumentar a biotilação de carboxilases (ZEMPLÉNI; MOCK, 2000) e histonas (STANLEY; GRIFFIN; ZEMPLÉNI, 2001) em comparação com células quiescentes. A ingestão de doses farmacológicas de biotina por seres humanos pode reduzir as taxas de proliferação de células mononucleares e secreção de algumas interleucinas por estas células

(ZEMPLINI; HELM; MOCK, 2001).

Entender como vias de inflamação em nível molecular que participa num importante papel na função imune, metabolismo e reprodução, pode melhorar a habilidade de prevenir desordens no gado (ESPOSITO et al., 2014).

Em geral, o objetivo desse estudo foi determinar a interação entre metabolismo e imunidade inata no endométrio bovino. Para tanto, foi avaliado o efeito da disponibilidade de glicose, glutamina e biotina nas células e tecidos endometriais quando desafiados com lipopolissacarídeo.

Referências

- AGRAWAL, S.; AGRAWAL, A.; SAID, H. M. Biotin Deficiency Enhances the Inflammatory Response of Human Dendritic Cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, p. ajpcell 00141 2016, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27413170>>.
- AKIRA, S.; AKIRA, S.; UEMATSU, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588>>.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004.
- BÁEZ-SALDAÑA, A.; DÍAZ, G.; ESPINOZA, B.; ORTEGA, E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 431–437, 1998.
- BEUTLER, B. **Innate immunity: An overview** **Molecular Immunology**, 2004. .
- BRASSE-LAGNEL, C.; LAVOINNE, A.; HUSSON, A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. **The FEBS journal**, v. 276, n. 7, p. 1826–44, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19250320>>.
- CAREY, B. W.; FINLEY, L. W.; CROSS, J. R.; ALLIS, C. D.; THOMPSON, C. B. Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 413–416, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25487152>>.
- CARNEIRO, L. C.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.
- CAROPRESE, M.; ALBENZIO, M.; MARINO, R.; SANTILLO, A.; SEVI, A. Immune response and milk production of dairy cows fed graded levels of rumen-protected glutamine. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 202–209, 2012.

CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; DOHERTY, M. L.; CALLANAN, J. J.; MEE, J. F.; O'FARRELLY, C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1396–1407, 2009.

CHEN, B.; WANG, C.; WANG, Y. M.; LIU, J. X. Effect of biotin on milk performance of dairy cattle: a meta-analysis. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 7, p. 3537–3546, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700041>>.

CHEN, X.; ESLAMFAM, S.; FANG, L.; QIAO, S.; MA, X. Maintenance of Gastrointestinal Glucose Homeostasis by the Gut-Brain Axis. **Current Protein & Peptide Science**, v. 17, 2016.

CRONIN, J. G.; TURNER, M. L.; GOETZE, L.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 2, p. 51, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4396703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. **Molecular mechanisms of glutamine action** *Journal of Cellular Physiology*, 2005. .

DAKSHINAMURTI, K.; CHALIFOUR, L.; BHULLAR, R. P. Requirement for biotin and the function of biotin in cells in culture. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 447, p. 38–55, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3860178>>.

DIMELOE, S.; BURGNER, A.-V.; GRAEHLERT, J.; HESS, C. T cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. **Immunology**, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12655>>.

DUPONT, J.; SCARAMUZZI, R. J. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 11, p. 1483–1501, 2016. Disponível em: <<http://biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BCJ20160124>>.

ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. **Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows***Animal Reproduction Science*, 2014. .

FU, Y.; LIU, B.; FENG, X.; LIU, Z.; LIANG, D.; LI, F.; LI, D.; CAO, Y.; FENG, S.; ZHANG, X.; ZHANG, N.; YANG, Z. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 151, n. 1–2, p. 20–27, 2013.

FURMAN, M.; WADE, G. N. Animal models in the study of nutritional infertility. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 14, n. 6, p. 475–481, 2007.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 225–60, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597130>>.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. a.; HAWLEY, S. a. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 251–262, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3311>>.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 7, p. 3749–52, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201887>>.

HURST, S. M.; WILKINSON, T. S.; MCLOUGHLIN, R. M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G. M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705–714, 2001.

JAFARI, A.; EMMANUEL, D. G. V; CHRISTOPHERSON, R. J.; THOMPSON, J. R.; MURDOCH, G. K.; WOODWARD, J.; FIELD, C. J.; AMETAJ, B. N. Parenteral administration of glutamine modulates acute phase response in postparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4660–4668, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72516-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72516-4)>.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1, **Anais...** 1989.

JANEWAY, C. a; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 2, p. 197–216, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602>>.

KANNAKI, T. R.; SHANMUGAM, M.; VERMA, P. C. **Toll-like receptors and their role in animal reproduction****Animal Reproduction Science**, 2011. .

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 816–825, 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–84, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404851>>.

KAWAI, T.; AKIRA, S. **Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity****Immunity**, 2011. .

KUROISHI, T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 93, n. 12, p. 1091–1096, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168302>>.

KUROISHI, T.; ENDO, Y.; MURAMOTO, K.; SUGAWARA, S. Biotin deficiency up-regulates TNF-alpha production in murine macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 912–920, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174365>>.

LEAN, I. J.; RABIEE, A. R. Effect of feeding biotin on milk production and hoof health in lactating dairy cows: a quantitative assessment. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 3, p. 1465–1476, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21338811>>.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973–983, 1996.

LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623–632, 2008.

LEVINE, A. J.; PUZIO-KUTER, A. M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6009, p. 1340–1344, 2010.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF- κ B regulation in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 10, p. 725–34, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360211>>.

LOBLEY, G. E.; HOSKIN, S. O.; MCNEIL, C. J. Glutamine in Animal Science and Production. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2525S–2531S, 2001. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/131/9/2525S.abstract>>.

LUCY, M. Mechanisms linking growth hormone, insulin and reproduction: Lessons from the postpartum dairy cow. In: Cattle Practice, 1, **Anais...**2006.

LUNT, S. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 441–464, 2011. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=cellbio>.

MAGGINI, S.; WINTERGERST, E. S.; BEVERIDGE, S.; HORNIG, D. H. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **The British journal of nutrition**, v. 98, n. 1, p. S29–S35, 2007.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. **Toll-Like Receptors and RNA Helicases: Two Parallel Ways to Trigger Antiviral Responses** *Molecular Cell*, 2006. .

MOGENSEN, T. H. **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses** *Clinical Microbiology Reviews*, 2009. .

MOR, G.; CARDENAS, I. **The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity** *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010. .

MORENO-SANCHEZ, R.; MARTIN-HERNANDEZ, A.; SAAVEDRA, E.; PARDO, J. P.; RALPH, S. J.; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S. Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 50, n. 1, p. 10–23, 2014.

MOYES, K. M.; DRACKLEY, J. K.; SALAK-JOHNSON, J. L.; MORIN, D. E.; HOPE, J. C.; LOOR, J. J. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. **J. Dairy Sci.**, v. 92, n. 9, p. 4301–4316, 2009. Disponível em: <<http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/92/9/4301>>.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, a; MANCINELLI, R.; VAN'T VEER, C.; PENTON-ROL, G.; RUCO, L. P.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, a. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 11, p. 5998–6004, 2000.

POLTORAK, A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5396.2085>>.

- RODRIGUEZ-MELENDEZ, R.; ZEMPLINI, J. **Regulation of gene expression by biotin (review)** *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003. .
- SAID, H. M. Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. In: **Water Soluble Vitamins**. [s.l: s.n.]56p. 1–19.
- SCALISE, M.; POCHINI, L.; GALLUCCIO, M.; INDIVERI, C. Glutamine transport. From energy supply to sensing and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2015.
- SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, 2006.
- SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; PFEIFFER, D. U.; DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 837–845, 2002.
- SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; DOGAN, B.; CRAVEN, M.; BROMFIELD, J. J.; CHANDLER, A.; ROBERTS, M. H.; PRICE, S. B.; GILBERT, R. O.; SIMPSON, K. W. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, 2010.
- STANLEY, J. S.; GRIFFIN, J. B.; ZEMPLINI, J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 20, p. 5424–5429, 2001.
- TANNAHILL, G. M.; CURTIS, A. M.; ADAMIK, J.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; MCGETTRICK, A. F.; GOEL, G.; FREZZA, C.; BERNARD, N. J.; KELLY, B.; FOLEY, N. H.; ZHENG, L.; GARDET, A.; TONG, Z.; JANY, S. S.; CORR, S. C.; HANEKLAUS, M.; CAFFREY, B. E.; PIERCE, K.; WALMSLEY, S.; BEASLEY, F. C.; CUMMINS, E.; NIZET, V.; WHYTE, M.; TAYLOR, C. T.; LIN, H.; MASTERS, S. L.; GOTTLIEB, E.; KELLY, V. P.; CLISH, C.; AURON, P. E.; XAVIER, R. J.; O'NEILL, L. A. J. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–42, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4031686&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5930, p. 1029–33, 2009. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WARBURG, O. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–14, 1956. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>>.

WATHES, D. C.; CHENG, Z.; CHOWDHURY, W.; FENWICK, M. a; FITZPATRICK, R.; MORRIS, D. G.; PATTON, J.; MURPHY, J. J. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows.

Physiological genomics, v. 39, n. June 2009, p. 1–13, 2009.

WATHES, D. C.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; BOURNE, N.; LLEWELLYN, S.; MORRIS, D. G.; KENNY, D.; MURPHY, J.; FITZPATRICK, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow.

Theriogenology, v. 68, n. SUPPL. 1, 2007.

WELLS, S. M.; KEW, S.; YAQOOB, P.; WALLACE, F. A.; CALDER, P. C. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. **Nutrition**, v. 15, n. 11–12, p. 881–884, 1999.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C. W.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow.

Theriogenology, v. 68, n. 4, p. 549–559, 2007.

WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; SENTMAN, C. L.; PIOLI, P. A.; SHEN, L. **Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions** **Immunological Reviews**, 2005. .

WU, G. **Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition** **Amino Acids**, 2009. .

ZEMPLINI, J.; HELM, R. M.; MOCK, D. M. In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. February, p. 1479–1484, 2001.

ZEMPLINI, J.; MOCK, D. M. Mitogen-induced proliferation increases biotin uptake into human peripheral blood mononuclear cells. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. C1079-84, 1999. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/276/5/C1079.short>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329955>>.

ZEMPLINI, J.; MOCK, D. M. Utilization of biotin in proliferating human lymphocytes. **J Nutr**, v. 130, p. 335S–337S, 2000.

ZEMPLINI, J.; STEVEN STANLEY, J.; MOCK, D. M. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells causes increased expression of the sodium-dependent multivitamin transporter gene and increased uptake of pantothenic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 8, p. 465–473, 2001.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3025>>.

Capítulo 2 – Efeito da glicose no metabolismo energético e imunidade inata do endométrio bovino

Artigo publicado no periódico **PLoS ONE**

Resumo

Defesas contra as bactérias que normalmente infectam o endométrio bovino no pós-parto são prejudicadas quando há estresse metabólico, levando a endometrite e infertilidade. A resposta do endométrio contra bactérias depende da imunidade inata, com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos estimulando a inflamação, caracterizadas por secreção de interleucinas (IL) -1 β , IL-6 e IL-8. Como o estresse metabólico afeta as respostas teciduais contra patógenos não é clara, mas a conexão entre metabolismo energético e imunidade inata demonstra que quando um é afetado o outro também pode ser afetado. Nesse estudo testou-se a hipótese de que as vias homeostáticas integram metabolismo energético e imunidade inata no tecido endometrial bovino. A ausência de glicose reduziu a secreção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 a partir de culturas de órgãos endometriais bovinos *ex vivo* desafiados com os padrões moleculares associados a patógenos lipopolissacarídeo e lipopeptídeo bacteriana. As respostas inflamatórias do endométrio para lipopolissacarídeo não foram afetadas pelo fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1, que é um regulador do metabolismo endócrino. As respostas inflamatórias ao lipopolissacarídeo aumentam o consumo de glicose pelo endométrio induzindo o efeito Warburg, que pode exacerbar os défices na disponibilidade da glicose no tecido. Em conclusão, o estresse energético metabólico afetou as respostas inflamatórias a padrões moleculares associados a patógenos em tecido endometrial bovino.

Introdução

O estresse metabólico compromete as respostas inflamatórias de defesa contra infecções bacterianas do útero em bovinos após o parto, mas não está claro como o metabolismo e a imunidade estão integrados no endométrio. Porém, há evidências emergentes que o metabolismo energético e a imunidade inata estão interagidos nos tecidos [1,2].

A compreensão de como o metabolismo e imunidade estão integrados no endométrio é importante porque a falta de um eficiente combate às infecções bacterianas no pós-parto leva à doença uterina em até 40 % do gado leiteiro, e, o custo do tratamento, a redução da produção de leite e a substituição de animais inférteis gera um custo aproximado de € 1,4 bilhões ao ano na União Europeia [3].

A demanda energética da lactação é três vezes a taxa metabólica de repouso diário, para o gado de leite de alto rendimento. Correr 100 km todos os dias é uma demanda energética equivalente para seres humanos. A vaca leiteira não consegue consumir alimentos suficientes para satisfazer a demanda metabólica da lactação, levando ao balanço energético negativo. Por conseguinte, há uma redução na disponibilidade de glicose e do fator de crescimento semelhante à insulina – 1 (IGF - 1) no plasma periférico [4,5]. Além disso, todo o gado leiteiro tem uma invasão de numerosas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas no útero após o parto [6,7].

O balanço energético negativo está associado com a persistência destas infecções, causando doença uterina [5,8,9]. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que conectam o estresse energético e a imunidade no endométrio.

A homeostase energética celular depende de múltiplos sistemas, incluindo a captação de glicose por meio de transportadores de glicose na membrana plasmática, a produção de ATP a partir da glicose via glicólise e do ciclo de Krebs, e no controle do metabolismo celular pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e proteína alvo da

rapamicina em mamíferos (mTOR) [10,11]. Transportadores de glicose estão amplamente distribuídos no útero da maioria das espécies animais, e alguns são regulados pelos esteróides ovarianos e insulina [12], também são expressos no endométrio bovino, e particularmente nas células epiteliais, mas não são regulados por esteróides ovarianos [13]. Estresse metabólico também pode induzir a glicólise aeróbica, conhecido como o efeito Warburg, onde as células rapidamente geram ATP e substratos de carbono a partir do fluxo de glicose através da glicólise em vez de o ciclo de Krebs [14,15]. Interessantemente, as respostas da imunidade inata contra bactérias induzem o efeito Warburg em macrófagos murinos [16].

A imunidade inata é baseada em receptores de reconhecimento de padrões celulares, tais como receptores Toll-like (TLRs), e na sua ligação a padrões moleculares associados a patógenos [17,18]. Por exemplo, o TLR-4 se liga ao componente lipopolissacárideo (LPS) de bactérias Gram-negativas, enquanto o TLR-2 se liga a lipopeptídeos bacterianos. A ligação de padrões moleculares associados a patógenos aos TLRs gera a liberação de citocinas e quimiocinas, tais como a interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8, que atraem e regulam células imunitárias hematopoiéticas, para eliminar os microrganismos invasores [17–19]. No entanto, esta resposta imune inata precisa ser rápida e vigorosa o suficiente para eliminar eficientemente os microrganismos dos tecidos, ou inflamação crônica pode desenvolver-se [19]. As respostas inflamatórias do endométrio bovino contra infecções bacterianas no pós-parto são tipicamente da imunidade inata, com o aumento de IL-1 β , IL-6 e IL-8 [20–22]. Além disso, o tecido e células endometriais expressam TLR-2 e TLR-4, e conferem respostas inflamatórias ao LPS e lipopeptídeos in vitro [23–26].

Vem sendo sugerido que o equilíbrio energético negativo diminui a resposta inflamatória e a eliminação de bactérias do endométrio, levando a endometrite crônica

[5,9]. Esta visão é controversa porque balanço energético negativo induzido não prejudica as respostas imune inata contra bactérias na glândula mamária de bovinos [27]. Para explorar este enigma sobre as interações entre o metabolismo energético e imunidade inata, foi utilizada uma abordagem em culturas de endométrio bovino *ex-vivo*, que secretam citocinas e quimiocinas em resposta a padrões moleculares associados a patógenos, semelhante aos tecidos *in vivo* [25,26].

Como nosso objetivo foi estudar a resposta do tecido, culturas do tecido endometrial têm vantagens sobre células isoladas porque as culturas de órgãos mantêm a arquitetura do tecido. O presente estudo testou a hipótese de que as vias homeostáticas integram o metabolismo energético e imunidade inata no endométrio bovino.

Resultados

Resposta inflamatória é atenuada em ausência de glicose

Para examinar o impacto da ausência de glicose sobre a resposta imune inata, 8mm de diâmetro do endométrio bovino para cultura foram colocadas em placas de 12 poços, durante 24 h em meio contendo uma gama de quantidades de glicose (0 a 1,8 mg/órgão), desafiados com controle (veículo, próprio meio) ou LPS de *E. coli* (100 ng/ml, ligante de TLR-4), Pam3CysSerLys4 (PAM, 100 ng/ml, lipopeptídeo ligante de TLR-2 / TLR-1), ou ligante estimulador de fibroblasto – 1 (FSL-1, 100 ng/ml, lipopeptídeo ligante de TLR-2 / TLR-6). O máximo 1,8 mg/órgão de glicose foi gerada através do fornecimento para cada poço da cultura com 2 ml de meio contendo 5 mM de glicose . Embora a disponibilidade precisa de glicose no endométrio pós-parto é desconhecido, e provavelmente menor do que no plasma periférico, a maior quantidade de glicose fornecida foi selecionado porque a concentração de glicose no plasma periférico é aproximadamente 4 mM em animais saudáveis [5]. As quantidades de glicose

foram expressas em mg/órgão para focar na disponibilidade de glicose em vez de concentrações de glicose, que são mais relevantes para os estudos de células na corrente sanguínea do que para os tecidos. Nós previamente validamos que as culturas de órgãos endometriais secretam IL-1 β , IL-6 e IL-8 após 24 h de desafio com LPS [25,26]. No entanto, limitar a disponibilidade de glicose reduziu a acumulação de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS em pelo menos 50% (Fig. 1A – 1C, n = 4 animais). Comparado com a máxima disponibilidade de glicose, o efeito de limitar a glicose na resposta de IL-1 β , IL-6 e IL-8 contra LPS foi primeiro evidente a 0,72, 0,36 e 0,72 mg/órgão de glicose, respectivamente ($P < 0,05$; ANOVA com comparação múltipla de Dunnett). Limitando a disponibilidade de glicose também tende a reduzir a IL- β , I -6 e IL-8 em respostas a PAM e FSL-1 (Fig. 1A – 1C).

Uma preocupação era que a ausência de glicose e/ou padrões moleculares associados a patógenos poderia indiretamente limitar a acumulação de mediadores inflamatórios, reduzindo a viabilidade celular. Assim a viabilidade celular foi avaliada por mensuração da concentração de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura pelo fato de que o vazamento de LDH é associado a células em apoptose [25,26]. No entanto, a concentração de LDH em sobrenadantes não diferiram significativamente entre os desafios (Fig. 1D) e também no controle.

Nos experimentos subsequentes foram utilizados o LPS devido as respostas inflamatórias contra LPS serem mais evidente entre os padrões moleculares associados a patógenos.

A seguir, considerou-se o efeito da disponibilidade de glicose no modelo de inflamação era dependente da quantidade total de glicose disponível para os tecidos ou a concentração de glicose no meio de cultura. Tecido endometrial foi cultivado em placas de 24 poços, durante 24 h, nas mesmas quantidades de glicose tais como utilizadas na

Fig. 1A-1D (0 a 1,8 mg de glicose por órgão) mas usando metade do volume do meio por órgão (1 ml / poço). Esta abordagem duplicou as concentrações de modo a que a concentração máxima de glicose foi de 10 mM (Fig. 2A-2C), em comparação com 5 mM nas Fig. 1A-1D. Limitando a disponibilidade de glicose reduziu a acumulação de IL-6 e IL-8 em resposta a LPS, pelo menos em 45% (Fig 2A e 2B, n = 7 animais), mas não afetou significativamente a viabilidade das células, conforme determinada pelas concentrações de HDL (Fig. 2C).

A concentração de IL-1 β não foi mensurada, porque não houve suficiente meio para realizar um quarto ensaio. O efeito de limitação de glicose na produção de IL-6 e IL-8 contra LPS foi evidente no primeiro 0,72 mg/órgão de glicose, em comparação com a disponibilidade de glicose máxima ($P < 0,05$; ANOVA com teste de comparação múltipla aos pares de Dunnett). Estes dados fornecem evidência de que a disponibilidade de glicose, em vez da concentração de glicose, influenciou as respostas inflamatórias do tecido endometrial.

Em seguida, foi avaliado se a reduzida resposta inflamatória contra LPS associada com reduzida disponibilidade de glicose poderia ser resgatado pela adição de glicose as células endometriais. Assim, o tecido endometrial foi cultivado placas de 12 poços, utilizando 2 ml de meio contendo 1,8 mg/órgão de glicose ou meio isento de glicose, por 24 h; posteriormente, os meios foram repostos com 2 ml de meio contendo 1,8 mg/órgão de glicose ou meios isentos de glicose, desafiado com veículo ou LPS (100 ng/ml) durante 24 h. Déficits de glicose no primeiro ou no segundo período de 24 h reduziu a acumulação de IL-6 e IL-8 em pelo menos 50 % (Fig. 2D e 2E) em comparação com células mantidas durante todo o experimento em 1,8 mg de glicose , embora, a re-alimentação de glicose após um período de esgotamento parcialmente resgatou a resposta de IL-8 (Figura 2E) .

Também foi analisado o impacto da glicose na expressão de genes para IL-1 α , IL-6 e IL-8 (Fig. 5). PCR quantitativo para esses genes foram realizados no tecido endometrial com variada concentração de glicose, desafiados com 1 ng/mL de LPS ou veículo controle. Observamos que aquele tecido endometrial com maior quantidade de glicose obteve maior expressão de genes para as citocinas quando desafiado com LPS. IL-1 α é conhecida como uma molécula associada a danos, liberada apenas quando a célula sofre algum tipo de injúria, e como é praticamente internalizada, a sua presença em sobrenadante não seria mensurável por ELISA, sendo a avaliação por qPCR mais aconselhada [21,23].

Tomados em conjunto, os dados das Figuras 1, 2 e 5 suportam o conceito que a redução da disponibilidade de glicose no tecido endometrial limita as respostas inflamatórias aos padrões moleculares associados a patógenos.

IGF-1 e a inflamação

O fator de crescimento semelhante a insulina – 1 (IGF-1) regula o crescimento celular e o metabolismo [28,29]. Em comparação a animais saudáveis, animais no pós-parto sob estresse metabólico têm níveis plasmáticos mais baixos de IGF-1, aproximadamente <50 ng/ml [30]. Dessa forma, examinamos se a adição de IGF-1 pode aumentar as respostas inflamatórias contra padrões moleculares associados a patógenos. Tecido endometrial foi cultivado em meio contendo 1,8 mg de glicose por órgão com veículo ou uma gama de concentrações de IGF-1 (25, 50 ou 100 ng/ml) durante 24 h. O meio foi então aspirado e os explantes foram desafiados durante 24 h com meio contendo veículo ou LPS a 100ng/ml, com a correspondente concentração de IGF-1. A acumulação de IL-1 β , IL-6 e IL-8 nos sobrenadantes desafiados com LPS não foi significativamente modulada por IGF-1 (Fig. 3 a-c, $P > 0,41$, ANOVA, $n = 4$ animais).

Ainda, IGF-1 não afeta significativamente a viabilidade das células, conforme determinado pela medição das concentrações de LDH nos sobrenadantes (todos os valores dentro de $\pm 10\%$ do controle, $P = 0,56$, ANOVA). Um tratamento mais curto de 6 h com IGF-1, anteriormente ao desafio de 24 hs com LPS, produziram resultados semelhantes, com nenhum efeito significativo na produção de IL-1 β , IL-6 ou IL-8 no sobrenadante (Fig. 3 d-f). Estes dados fornecem evidência de que o IGF-1 não foi um regulador importante das respostas inflamatórias endometriais ao LPS.

Resposta contra LPS é energeticamente dispendiosa

Tendo estabelecido que a ausência de glicose (Fig. 1) teve maior impacto sobre a inflamação, a etapa final foi examinar se as respostas do endométrio contra LPS foram energeticamente dispendiosas, o que pode agravar o impacto do estresse metabólico na imunidade inata nos tecidos. Explantes do endométrio foram colocadas em 12 poços com 2 ml de meio controle ou meio contendo 100 ng/ml de LPS, e as concentrações de glicose mensuradas ao longo de 24 h. Além disso, porque o tecido contém muito mais células do que uma monocamada de cultura, os experimentos também foram repetidos usando célula endometrial do estroma e do epitélio, usando 1 ml/poço em placas de 24 poços, e as concentrações de glicose mensuradas ao longo de 48 hs. Os dados foram expressos referente a glicose total em cada poço e, como esperado, a glicose foi esgotada em culturas de explantes (0 vs 24 h, $1,77 \pm 0,02$ vs. $0,95 \pm 0,06$ mg/poço, $P < 0,001$, t- teste, $n = 4$ animais). De modo semelhante, a glicose foi esgotada do meio por culturas de células epiteliais (0 vs 48 h, $1,93 \pm 0,01$ vs. $1,57 \pm 0,07$ mg/poço, teste t $P < 0,001$, $n = 4$) e por culturas de células do estroma (0 vs 48 h, $1,84 \pm 0,03$ vs. $1,52 \pm 0,11$ mg/poço, $P < 0,001$, teste t, $n = 4$). No entanto, quando explantes ou células foram

desafiados com LPS, houve um aumento da taxa de depleção de glicose do meio de cultura, em comparação ao controle (Fig 4A-4C, $P < 0,05$, ANOVA, $n = 4$).

Como LPS estimulou o consumo de glicose, foi utilizado Analisador de Fluxo Extracelular (Seahorse Bioscience) para examinar se LPS induziu o efeito Warburg. A taxa de acidificação extracelular (ECAR) foi medida a cada 10-12 min ao longo de um período de 4 h, como um indicador da produção de lactato, quando explantes foram desafiados com veículo controle ou LPS em meio contendo 1,19 mg/órgão de glicose. Como não há dados relacionados a ECAR, células estromais endometriais e monócitos do sangue periférico foram empregados como comparadores [31]. Antes do desafio com LPS, a ECAR foi de $15,3 \pm 7,3$, $20,3 \pm 2,3$ e $13,7 \pm 1,6$ mph/min (média \pm SEM) para endométrio, células estromais e monócitos, respectivamente. No entanto, a ECAR foi aumentada em resposta a LPS em culturas de órgãos endometriais (Fig. 4D, $P < 0,05$, ANOVA, $n = 3$ animais), células do estroma (Fig. 4E, $P < 0,001$, ANOVA, $n = 3$) e monócitos (Fig. 4F, $P < 0,001$, ANOVA, $n = 3$). Em conjunto, estes dados suportam o conceito de que o endométrio utiliza a glicose como fonte de carbono, e que o LPS estimula ainda mais o consumo de glicose.

Discussão

A justificativa para o presente estudo foi que déficits de energia metabólica estão associadas com respostas imunológicas inadequadas e doença uterina [5,8,9]. Foi discutido que a regulação da energia metabólica e as respostas inflamatórias a infecções tanto visam atingir a homeostase do tecido, e estão comumente integrados [1,10,19]. Nesse estudo, evidências de que interações entre o metabolismo e imunidade inata dependem da disponibilidade de glicose foi observada, o que é fundamental para a manutenção da homeostase energética nos tecidos. A ausência de glicose reduziu

respostas inflamatórias em tecido endometrial cultivado com padrões moleculares associados a patógenos, e ainda reduz secreção de IL-6 e IL-8 em resposta a LPS. A resposta inflamatória contra LPS foi energeticamente dispendiosa e induziu o efeito Warburg. Estes dados fornecem evidências de que disponibilidade de glicose impacta a imunidade inata no endométrio bovino.

A fonte mais fundamental de energia celular é o ATP, derivado principalmente do metabolismo da glicose através da glicólise e fosforilação oxidativa no ciclo de Krebs [10,14]. Para examinar a resposta imune inata para padrões moleculares associados a patógenos, culturas do tecido endometrial bovino *ex vivo* foram exploradas, porque mimetizam respostas inflamatórias *in vivo* a bactérias [25,26]. No presente estudo, limitada disponibilidade de glicose reduziu as concentrações de IL-1 β , IL-6 e IL-8 no tecido endometrial em resposta ao LPS, embora houvesse mais efeitos modestos sobre as respostas inflamatórias aos lipopeptídeos. Notavelmente, os efeitos da glicose sobre a inflamação foram determinados pela disponibilidade de glicose, ao invés da concentração de glicose no meio.

A taxa de consumo de glicose pelos explantes do endométrio no presente estudo foi de cerca de 25 ng/mg/min, semelhante às observações anteriores [40]. No entanto, os déficits na disponibilidade de glicose em tecidos, como durante o período pós-parto, são agravados pelo aumento do consumo de glicose. No presente estudo, houve aumento do consumo de glicose quando o tecido endometrial ou células foram desafiadas com LPS. Além disso, o LPS induziu o efeito Warburg no tecido endometrial, tal como determinado pelo aumento da ECAR. Estas observações são semelhantes ao trabalho anterior com células dendríticas e macrófagos de murídeo e humanos, em que o LPS também induziu o efeito Warburg [16,31,32]. Tais adaptações metabólicas ao LPS são prováveis partes da resposta imune inata integrada durante infecções bacterianas [2,19].

Entretanto, além da adaptação, estresse metabólico claramente afetou a inflamação no presente estudo, e limitou a imunidade *in vivo* [5]. Esta perturbação da resposta inflamatória é importante porque respostas inflamatórias insuficientemente rápidas ou robustas levam a infecção persistente e inflamação crônica [19], que é um sinal cardinal de endometrite em bovinos [33]. Estresse metabólico comprometendo a defesa contra agentes patogênicos também é evidente em outras espécies. Até Mesmo abelhas são mais propensas a morrer quando desafiados com LPS, se estiverem sedentas por açúcar [34].

Considerou-se que reguladores mais generalizadas do metabolismo no tecido, IGF-1, poderiam modular as respostas inflamatórias contra LPS no endométrio. Como concentrações de IGF-1 estão reduzidas no plasma periférico após o parto, acreditava-se que IGF-1 pode ser diretamente responsável por mediar os efeitos do balanço energético negativo sobre a saúde uterina [4,5,35]. No entanto, no presente estudo, IGF-1 exógena não modulou as respostas inflamatórias ao LPS no endométrio. O endométrio pós-parto é provável de enfrentar o conflito da imunidade inata prejudicada por causa da redução da disponibilidade de glicose e aumento do metabolismo celular durante a resposta inflamatória a bactérias. De fato, o endométrio é provavelmente ainda mais metabolicamente comprometido *in vivo* por exigências de glicose para a energia e como um substrato de carbono para satisfazer as necessidades de uma vasta quantidade de reparação e regeneração do endométrio que ocorre no pós-parto [41]. Estas tensões metabólicas adicionais podem explicar o porquê de a defesa endometrial ser comprometida durante o balanço energético negativo após o parto, enquanto que a imunidade inata na glândula mamária não é comprometida durante o BEN induzido [5,27].

O metabolismo energético celular depende do transporte e da utilização de uma multiplicidade de substratos de carbono [1,10,11]. Transportadores de glicose regulam o movimento de glicose nas células, e alguns são regulados por esteroides ovarianos e insulina no endométrio murino e humano [12]. No entanto, a fase do ciclo estral não afeta a expressão do transportador de glicose no endométrio bovino [13] e, esteroides ovarianos não afetam respostas inflamatórias endometriais ao LPS [26]. Da mesma forma, insulina e IGF-1 não são necessários para o tecido endometrial *ex vivo* para sua função fisiológica, tal como determinado pela secreção de prostaglandinas em resposta à oxitocina, ou respostas inflamatórias aos padrões moleculares associados a patógenos [25,36]. Esteroides do ovário e IGF-1 podem ter um papel em outros processos que promovem a saúde uterina. Os sistemas de IGF-1 e de insulina são importantes para a reparação do endométrio no pós-parto, provavelmente através do controle de metaloproteinases de matriz e proliferação de células [30].

Quando o suprimento de glicose é limitante, os requisitos de energia podem muitas vezes ser alcançados por meio do metabolismo de aminoácidos, lipídios e ácidos graxos de cadeia longa. Glutaminólise gera substratos de succinato, para o ciclo de Krebs. Os ácidos graxos produzem acetil-CoA para o ciclo de Krebs, e pela via do mevalonato, que converte acetil-CoA em esqualeno e para colesterol e síntese de esteróides. Estas vias metabólicas estão sujeitas a vários sistemas de controle, incluindo AMPK e mTOR, e suas interações com a imunidade inata estão apenas emergindo [2,11]. Por exemplo, recentemente descobriu-se que as respostas inflamatórias de células do endométrio bovino contra LPS são reduzidas pela inibição da via do mevalonato ou adição de isoprenóides [37].

Em conclusão, evidências foram fornecidas que o estresse metabólico energético no endométrio bovino afetou a resposta inflamatória contra padrões moleculares associados a patógenos.

Materiais e métodos

Cultura do tecido endometrial e células

Úteros com nenhuma evidência de infecções ou doenças microbianas genitais foram recolhidas de vacas (n = 68 animais) após serem abatidas e processadas como parte do trabalho normal de um matadouro, como descrito anteriormente [23–26]. Culturas do tecido endometrial bovino *ex vivo* (explantes) foram confeccionados utilizando *punchs* de biópsia de 8mm de diâmetro, como descrito anteriormente [25,26]. Anteriormente, foi demonstrado que não houve qualquer efeito da raça dos animais sobre as respostas inflamatórias a LPS nos explantes, e que não houve diferença significativa na viabilidade celular entre o controle e o desafio com LPS das culturas de órgãos endometriais [25,26]. Explantes foram colocadas em placas de 12 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) com 2 ml/poço de meio de cultura (RPMI-1640; R8758, 50 IU/mL de penicilina, 50 ug/ml de estreptomicina e 2,5 ug/ml de anfotericina B, Sigma, Gillingham, Dorset, Reino Unido), salvo indicação em resultados quando 1 ml/poço foi utilizado em placas de 24 poços (TPP). Células endometriais do estroma e epitélio foram isoladas, e a ausência de contaminação de células do sistema imune confirmada como descrito anteriormente [23,24]. As células epiteliais e de estroma foram plaqueadas a $1,5 \times 10^5$ células/ml, em placas de 24 cavidades com 1 ml/poço de meio de cultura (RPMI-1640 R8758, 50 IU/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomicina e 2,5 ug/ml de anfotericina B, Sigma; com soro fetal bovino a 10%, Biosera, Uckfield, East Sussex, Reino Unido). Os monócitos do sangue periférico foram isolados como descrito

previamente [38]. Os monócitos foram plaqueadas a 6×10^4 células/ml em meio de cultura (RPMI-1640 R8758, 50 IU/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomicina e 2,5 ug/ml de anfotericina B, Sigma; com 10% de fetal de soro de bovino, Biosera) em placas de 24 poços. Os explantes e células endometriais foram incubados a 37°C numa atmosfera de ar umidificado com 5% de CO₂.

Impacto do metabolismo na inflamação

Culturas de órgãos endometriais foram tratados com meio RPMI contendo uma gama de quantidades de glicose, gerados pela utilização de combinações de meio RPMI isento de glicose (RPMI 1640 sem glicose; 11879, Thermo Scientific, Cramlington, Reino Unido) e meio RPMI contendo glicose a 11 mM (RPMI-1640; R8758, Sigma). Os valores finais de glicose nos meios foram confirmados usando ensaio de glicose (ver abaixo). Culturas de órgãos foram desafiadas com veículo ou LPS de *E. coli* O111: B4 ultrapuro (100 ng/ml, Invivogen, Toulouse, França), PAM3CSK4 (PAM, 100 ng/mL; Invivogen) ou de lipopeptídeos estimulante de fibrinogênio - 1 (FSL- 1 (também conhecido como Pam2CGDPKHPKSF), 100 ng/ml; Invivogen). Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para a mensuração subsequente de IL-1 β , IL-6, IL-8 e LDH, e o peso dos órgãos (explants) foram registados. Cada experimento foi realizado usando culturas de órgãos de pelo menos quatro animais independentes, e cada tratamento foi repetido duas vezes.

ELISA

As concentrações de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em sobrenadantes de cultura foram mensurados por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (IL-1 β bovina ESS0027, IL-6 bovina ESS0029, Thermo Scientific; CXCL8 humano/IL-8 DuoSet

DY208, R&D Systems Europe, Abingdon, UK), como descrito anteriormente [23–25]. O ensaio de IL-8 tem sido demonstrado previamente por reagir de forma cruzada com a IL-8 de bovino [39]. Os coeficientes de variação inter-ensaio e intra-ensaio foram todos <10%; os limites de detecção foram de 12,5 pg/ml para IL-1 β , 75,0 pg/ml para IL-6, e 5,7 pg/ml para IL-8.

PCR Quantitativo (qPCR)

A extração de RNA celular, síntese de cDNA, primers e PCR quantitativo foi realizado de acordo com procedimentos utilizados anteriormente [21,23,42]. Sumariamente, após o tratamento com determinadas quantidades de glicose e desafiados com LPS, o RNA foi extraído do tecido endometrial utilizando o Kit RNAeasy por meio do sistema automatizado Qiacube (Qiagen, Crawley, Reino Unido). O RNA extraído foi quantificado utilizando um espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Labtech, Ringmer, Reino Unido). Para a síntese de cDNA, 1 ng de RNA total foi adicionada a uma reação de eliminação do DNA genômico, seguido por conversão para o cDNA (Quantitect Transcrição Reversa Kit, Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, qPCR foi realizado para analisar a expressão do gene utilizando primers específicos. A quantidade de RNA mensageiro das amostras experimentais foi determinada utilizando curvas padrão geradas a partir do RNA de referência com Quantifast SYBR Green (Qiagen). Os níveis de expressão de mRNA foram então normalizados para ACTB. As análises de PCR foram realizadas em triplicado.

Ensaio para Lactato Desidrogenase

Danos celulares provocam o vazamento de lactato desidrogenase (LDH) para o meio circundante, o qual é utilizado para avaliar a viabilidade das células e dos tecidos

[25]. Atividade de lactato desidrogenase foi medida utilizando um Kit para Ensaio da Atividade da Lactato Desidrogenase (Cambridge Bioscience Ltd, Cambridge, UK), de acordo com as instruções do fabricante.

Consumo de glicose em resposta a LPS

Para examinar o consumo de glicose, culturas de órgãos endometriais ou células endometriais foram tratados em meio RPMI-1640 (R8758, Sigma) com veículo controle ou LPS (100 ng/ml), e os sobrenadantes recolhidos periodicamente para mensurar a concentração de glicose. A concentração de glicose foi mensurada utilizando um analisador de química clínica (Analox GM7; Analox Instruments, Londres, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante.

Taxa de acidificação extracelular (ECAR)

A ECAR foi mensurada, como um indicador da glicólise, em tempo real, usando Analisador de Fluxo Extracelular XF-24 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, EUA). Culturas de órgãos do endométrio bovino *ex-vivo* foram produzidos como descrito acima, mas utilizando *punches* de biópsia de 3mm diâmetro (Stiefel Laboratories Ltd, High Wycombe, Buckinghamshire, Reino Unido). As culturas foram estabilizadas em placas de 24 poços contendo 1,8 mg de glicose (Sigma) em 2 ml de Meio de Ensaio XF (pH 7,4; marinho Bioscience, North Billerica, Massachusetts, EUA) em uma incubadora a 37°C sem dióxido de carbono. As culturas de órgãos foram então colocadas em microplacas de captura Islet XF24 (Seahorse Bioscience), coberto com uma tela de captura de Islets, que permite a perfusão livre de gases, enquanto minimiza o movimento do tecido, e lavou-se duas vezes com meio de ensaio XF. As culturas de órgãos foram colocadas no analisador e equilibrada durante cerca de 60 minutos em 525

pL/poço Meio de Ensaio XF com glicose (1,19 mg/órgão final disponível de glicose), antes da injeção de 75 ul de Meio de Ensaio XF ou 75 ul de Meio Ensaio XF com LPS (1 ug/ml). Três animais foram analisados por placa com 3 repetições por tratamento e a ECAR foi medida aproximadamente a cada 10-12 min.

O mesmo ocorreu com células do estroma ($3,5 \times 10^4$ células/poço) ou células mononucleares do sangue periférico (6×10^4 /poço) cultivadas em meio RPMI-1640 (R8758, 50 IU/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomicina e 2,5 ug/ml de anfotericina B, Sigma; com soro fetal bovino a 10%, Biosera) e em meio XF24 em microplacas. Após 24 h, as células foram lavadas duas vezes com meio XF, colocadas no analisador e equilibradas durante cerca de 60 minutos em 525 pL/poço de meio XF com glicose (1,19 mg/órgão), antes da injeção de 75 ul Meio de Ensaio de XF ou 75 ul de Meio de Ensaio XF com LPS (1 ug/ml).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), com o animal como a unidade estatística designado, e $P < 0,05$ considerado significativo. Foram feitas comparações entre tratamentos, como indicado nos resultados, utilizando o teste t de Student, ou ANOVA com Bonferroni, Sidak, ou testes de comparações múltiplas de Dunnett para dados distribuídos normalmente e Mann-Whitney U para dados não-normais.

Referências

1. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8: 923–934. doi:10.1038/nri2449
2. O'Neill L a J, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*. 2013;493: 346–55. doi:10.1038/nature11862
3. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*. 2009;81: 1025–1032. doi:10.1095/biolreprod.109.077370
4. Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, et al. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2007;90: 4022–32. doi:10.3168/jds.2006-852
5. Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick M a, Fitzpatrick R, Morris DG, et al. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol Genomics*. 2009;39: 1–13. doi:10.1152/physiolgenomics.00064.2009
6. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*. 2002;123: 837–845. doi:10.1530/reprod/123.6.837
7. Machado VS, Oikonomou G, Bicalho MLS, Knauer WA, Gilbert R, Bicalho RC.

- Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol.* 2012;159: 460–469. doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.033
8. Giuliadori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco C a, de la Sota RL. Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance. *J Dairy Sci.* 2013;96: 3621–31. doi:10.3168/jds.2012-5922
 9. Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 2014. p. 60–97. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.11.007
 10. Hardie DG, Ross F a., Hawley S a. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13: 251–262. doi:10.1038/nrm3311
 11. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12: 21–35. doi:10.1038/nrm3025
 12. Frolova AI, Moley KH. Glucose transporters in the uterus: An analysis of tissue distribution and proposed physiological roles. *Reproduction.* 2011. p. 211–220. doi:10.1530/REP-11-0114
 13. Fran??a MR, Mesquita FS, Lopes E, Pugliesi G, Van Hoeck V, Chiaratti MR, et al. Modulation of periovulatory endocrine profiles in beef cows: Consequences

- for endometrial glucose transporters and uterine fluid glucose levels. *Domest Anim Endocrinol*. 2015;50: 83–90. doi:10.1016/j.domaniend.2014.09.005
14. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324: 1029–33. doi:10.1126/science.1160809
 15. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*. 2010;330: 1340–1344. doi:10.1126/science.1193494
 16. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496: 238–42. doi:10.1038/nature11986
 17. Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol*. 2011;21. doi:10.1016/j.cub.2011.05.039
 18. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010. p. 805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
 19. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454: 428–435. doi:10.1038/nature07201
 20. Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R, Heuwieser W. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8: 152. doi:10.1186/1477-7827-8-152
 21. Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, et al.

- Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7: 55. doi:10.1186/1477-7827-7-55
22. Sheldon IM, Roberts MH. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLoS One*. 2010;5: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0012906
 23. Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE, Sheldon IM. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod*. 2012;86: 51. doi:10.1095/biolreprod.111.092718
 24. Turner ML, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology*. 2014;155: 1453–1465. doi:10.1210/en.2013-1822
 25. Borges ÁM, Healey GD, Sheldon IM. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67: 526–539. doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x
 26. Saut JPE, Healey GD, Borges AM, Sheldon IM. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reproduction*. 2014;148: 593–606. doi:10.1530/REP-14-0230
 27. Moyes KM, Drackley JK, Salak-Johnson JL, Morin DE, Hope JC, Loor JJ. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity

- during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. *J Dairy Sci.* 2009;92: 4301–4316. doi:10.3168/jds.2009-2170
28. Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 1997;56: 608–616. doi:10.1095/biolreprod56.3.608
 29. Badinga L, Guzeloglu A, Thatcher WW. Bovine somatotropin attenuates phorbol ester-induced prostaglandin F2alpha production in bovine endometrial cells. *J Dairy Sci.* 2002;85: 537–43. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74106-4
 30. Wathes DC, Cheng Z, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Patton J. Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the endometrium of the postpartum dairy cow. *Reproduction.* 2011;141: 269–281. doi:10.1530/REP-10-0177
 31. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 2012;15: 813–826. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.023
 32. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010;115: 4742–4749. doi:10.1182/blood-2009-10-249540
 33. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HH-J, Veterinaria M.

- Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biol Reprod.* 2009;1032: 1025–1032. doi:10.1095/biolreprod.109.077370
34. Moret Y. Survival for Immunity: The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers. *Science* (80-). 2000;290: 1166–1168. doi:10.1126/science.290.5494.1166
35. Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Patton J, Wathes DC. Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34: 391–402. doi:10.1016/j.domaniend.2007.11.003
36. Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, et al. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology.* 2006;147: 562–570. doi:10.1210/en.2005-1113
37. Healey GD., Collier C., Griffin S., Schuberth H-J., Sandra O., Smith DG. e, et al. Mevalonate biosynthesis intermediates are key regulators of innate immunity in bovine endometritis. *J Immunol.* 2016;196: 823–831. doi:10.4049/jimmunol.1501080
38. Amos MR, Healey GD, Goldstone RJ, Mahan SM, Düvel A, Schuberth H-J, et al. Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol Reprod.* 2014;90: 54. doi:10.1095/biolreprod.113.115972
39. Rinaldi M, Ceciliani F, Lecchi C, Moroni P, Bannerman DD. Differential effects of alpha-1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and

- IL-8 production. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;126: 199–210.
doi:10.1016/j.vetimm.2008.07.001
40. Chase CC Jr., Del Vecchio RP, Smith SB, Randel, RD. In vitro metabolism of glucose by bovine reproductive tissues obtained during the estrous cycle and after calving. *J Anim Sci.* 1992; 70(5): 1496-508.
41. Archbald LF, Schultz RH, Fahning ML, Kurtz HJ, Zemjanis R. A sequential histological study of the post-partum bovine uterus. *J Reprod Fertil.* 1972; 29:133-6

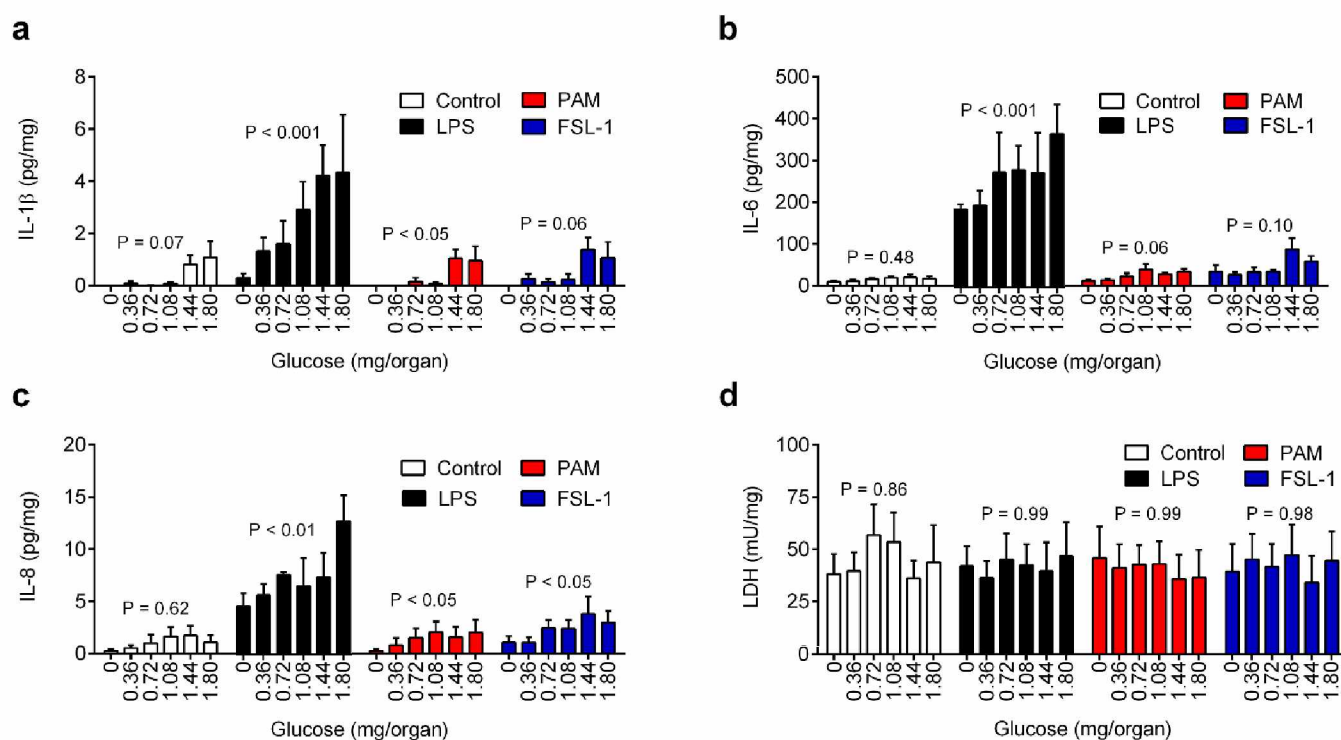


Fig. 1 Disponibilidade reduzida de glicose limita a resposta inflamatória contra padrões moleculares associados a patógeno. (a-d) Órgãos de cultura do endométrio *ex vivo* foram cultivados por 24 hs em meio contendo 0-1.8 mg/órgão de glicose, com veículo ou desafiado com LPS, PAM ou FSL-1. Ao final do experimento os órgãos foram pesados e a acumulação de IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-8 (c) e LDH (d) mensurado no sobrenadante. Dados estão apresentados como média + SEM de quatro experimentos independentes, e analisados por ANOVA, com os valores de P demonstrados acima de cada tratamento

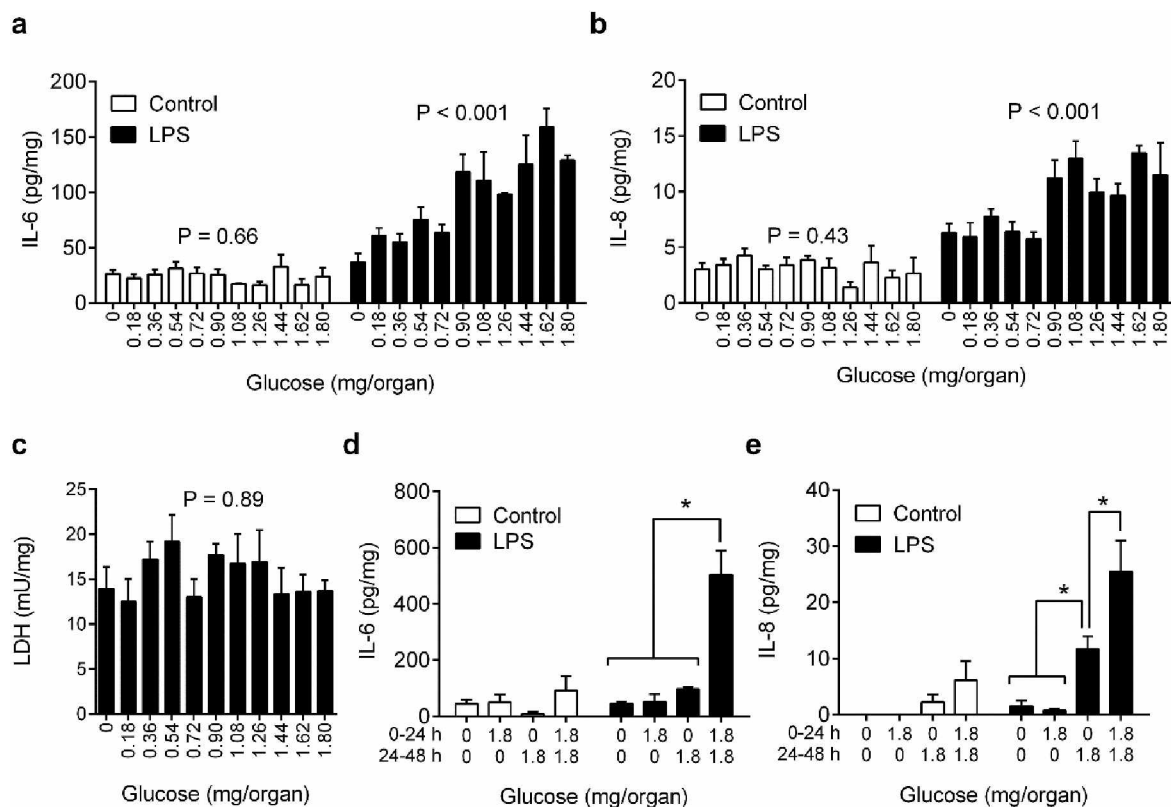


Fig. 2 Disponibilidade de glicose modula a inflamação no tecido endometrial. (a-c) Órgãos de cultura do endométrio *ex vivo* foram cultivados por 24 hs em meio contendo 0-1.8 mg/órgão de glicose, no dobro de concentração da Fig. 1 (máximo 10mM vs 5mM da Fig. 1), com veículo ou desafiado com LPS. Ao final do experimento os órgãos foram pesados e a acumulação de IL-6 (a), IL-8 (b) e LDH (c) mensurado no sobrenadante. Dados estão apresentados como média + SEM de sete experimentos independentes, e analisados por ANOVA, com os valores de P demonstrados acima de cada tratamento. (d-e) Endométrio foi cultivado em meio contendo 0-1.8 mg/órgão de glicose por 24 hs, e então recultivados em meio contendo de 0-1.8 mg/órgão de glicose com veículo ou LPS por mais 24 hs. Dados estão apresentados como média + SEM de quatro experimentos independentes, e analisados por ANOVA; *P<0.05.

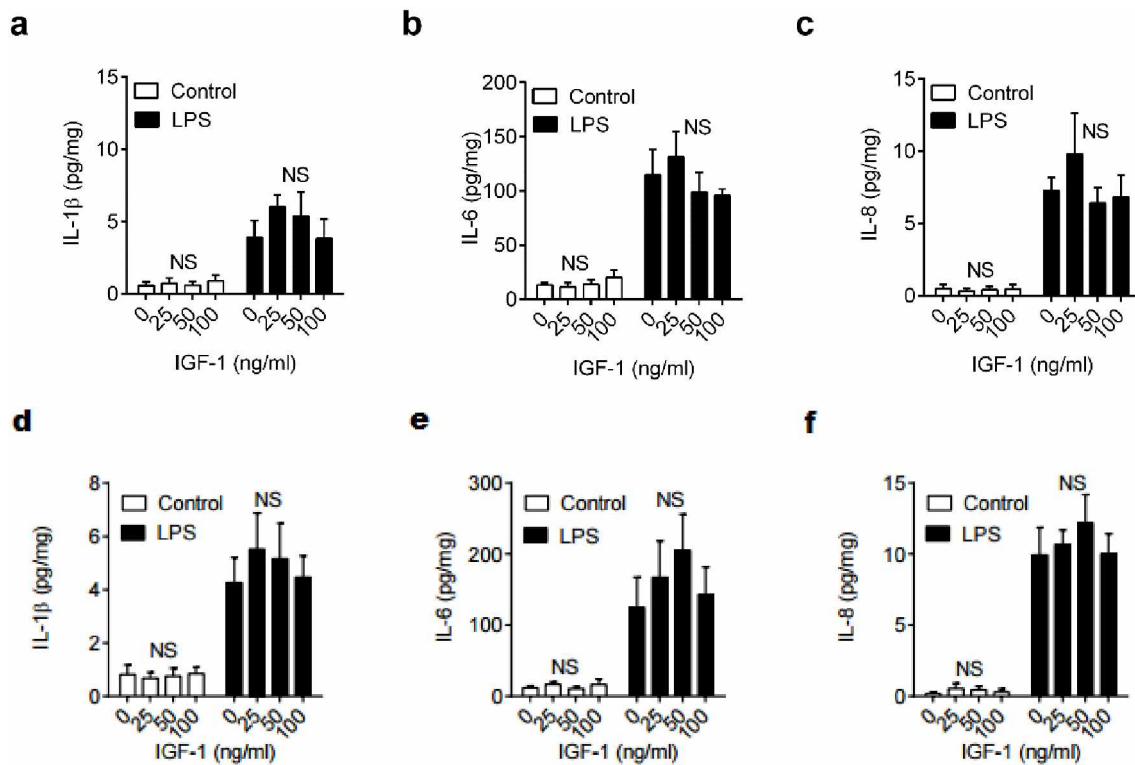


Fig. 3. IGF-1 não modula a inflamação no tecido endometrial. (a-c) Órgãos de cultura do endométrio *ex vivo* foram cultivados por 24 hs em meio contendo 1.8 mg/órgão de glicose, contendo veículo controle (0) ou IGF-1 (25, 50, 100 ng/mL). Meio foi então aspirado e reabastecido com meio novo contendo os correspondentes valores de glicose e IGF-1, e desafiados com veículo ou LPS por mais 24 hs. Ao final do experimento os órgãos foram pesados e a acumulação de IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-8 (c) mensurado no sobrenadante. Dados estão apresentados como média + SEM de quatro experimentos independentes, e analisados por ANOVA; NS = não significativo. (d-f) Órgãos de cultura do endométrio *ex vivo* foram cultivados por 24 hs em meio contendo 1.8 mg/órgão de glicose, contendo veículo controle (0) ou IGF-1 (25, 50, 100 ng/mL) durante 6 horas, seguido por desafio com meio contendo veículo controle ou LPS durante 24 h. Ao final do experimento os órgãos foram pesados e a acumulação de IL-1 β (d), IL-6 (e), IL-8 (f) mensurado no sobrenadante. Dados estão apresentados como média + SEM de quatro experimentos independentes, e analisados por ANOVA; NS = não significativo.

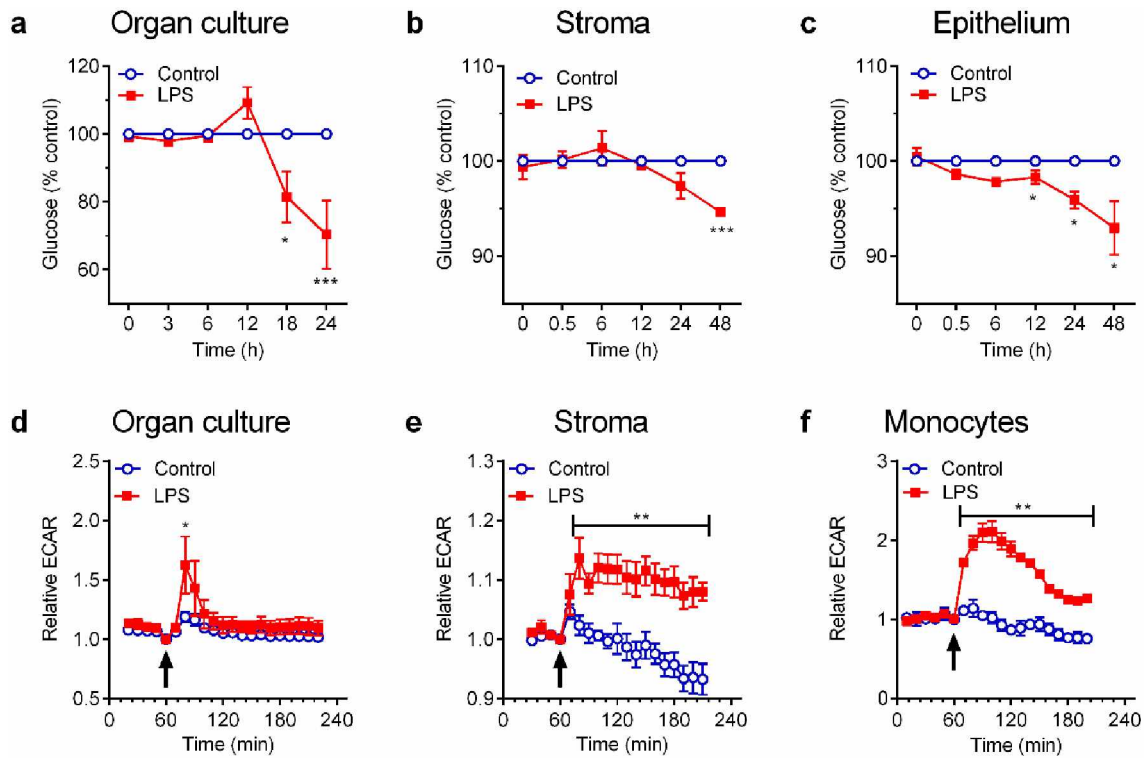


Fig. 4. LPS induz ao estresse metabólico no tecido e células endometriais. (a-c) Culturas endometriais (a), as células do estroma (b) ou células epiteliais (c) foram cultivadas em meio de cultura contendo glicose com veículo controle (○) ou 100 ng de LPS / ml (■), e as quantidades de glicose nos sobrenadantes foi mensurada nos tempos indicados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM porcentagem do controle, de quatro experimentos independentes, e analisados por ANOVA utilizando o teste de comparações múltiplas de Sidak; valores diferem do controle, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. (d-f) Culturas endometriais (d), as células do estroma (E) ou monócitos (f) foram cultivadas durante 60 min e, em seguida, manteve-se como controles não estimulados ou foram estimulados (seta) com 1 μ g/ml de LPS. A taxa de acidificação extracelular (ECAR) foi medida a cada 10-12 min usando Analisador de Fluxo Extracelular. Os dados são expressos em relação ao ECAR no momento do desafio, apresentados como média \pm SEM de 4 experimentos independentes, e analisados por ANOVA utilizando o teste de comparações múltiplas de Sidak; valores diferem do controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

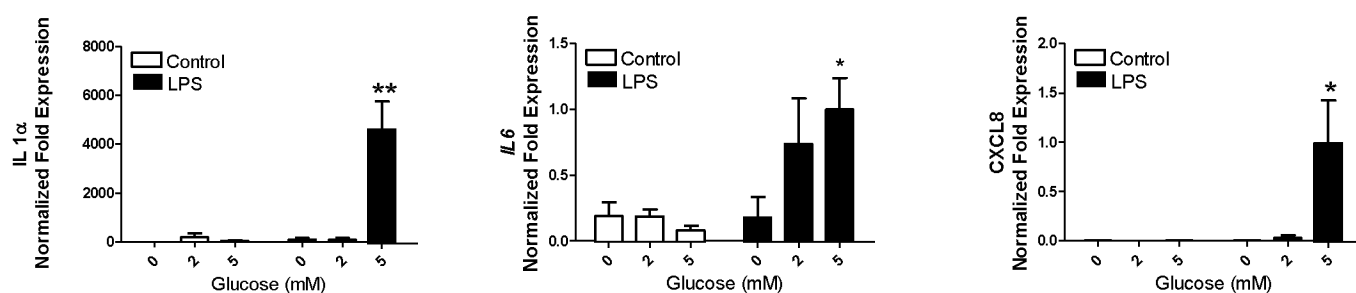


Fig. 5. Expressão dos genes *IL-1α*, *IL-6* e *CXCL8* no endométrio bovino em resposta a LPS em diferentes concentrações de glicose. Tecido endometrial foi cultivado em meio com presença de 0mM, 2mM ou 5mM de glicose, desafiado com 100 ng/mL de LPS ou veículo controle. A presença de glicose aumentou a expressão gênica para as citocinas. Valores apresentados em média + SEM de três experimentos independentes. Análise por ANOVA usando teste de múltipla comparação de Dunett, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Capítulo 3 – Glutamina modula resposta inflamatória contra lipopolissacarídeo no endométrio bovino

Artigo aceito para publicação no periódico **Journal of Dairy Science**

RESUMO

Bactérias contaminam o endométrio de vacas após o parto, e a eliminação destes microrganismos depende de uma resposta imune inata robusta contra moléculas bacterianas tais como a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS). A inflamação no endométrio é caracterizada pela secreção das citocinas IL-1 e IL-6, e a quimiocina IL-8. No entanto, os animais muitas vezes não conseguem eliminar as bactérias e desenvolvem doenças uterina se estão em balanço energético negativo, com reduzida quantidade de glicose e glutamina, que são substratos para a energia nos tecidos. A depleção de glicose inibe respostas inflamatórias no endométrio, mas o papel da glutamina ainda não é claro. O presente estudo testou a hipótese se a depleção de glutamina comprometeria respostas inflamatórias ao LPS no tecido endometrial. Culturas do endométrio *ex vivo* foram desafiadas com LPS, e os sobrenadantes de cultura acumularam IL-1 β , IL-6 e IL-8, conforme o esperado. No entanto, a depleção de glutamina em meios de cultura contendo glicose reduziu a acumulação de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Surpreendentemente, o fornecimento de glutamina não foi suficiente para gerar respostas inflamatórias na ausência de glicose. Enquanto que, o fornecimento de glicose aumentou a resposta inflamatória, mesmo na ausência de glutamina. Além disso, a inibição da glicólise reduziu a acumulação de IL-1 β , IL-6 e IL-8, mesmo quando glutamina e glicose foram abundantes. Em conclusão, a depleção de glutamina reduziu as respostas inflamatórias contra LPS no endométrio, e a atividade de glutamina dependeu da glicólise. Estes dados fornecem uma visão intrínseca de como balanço energético negativo pode estar ligado a doença uterina pós-parto.

Palavras-chaves: gado leiteiro, útero, imunidade inata, metabolismo, inflamação

Short communication:

O estresse metabólico compromete a resposta inflamatória do útero pós-parto contra infecção bacteriana. Entendendo como o metabolismo e a imunidade estão integrados é importante pelo fato de falha de um eficiente combate a infecção levar a doença uterina em até 40% do gado leiteiro . Redução de glicose diminui a resposta inflamatória contra a endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS) em tecido endometrial bovino . Entretanto, pouco se é conhecido sobre como outra grande fonte de energia, a glutamina, impacta a imunidade inata no endométrio.

O útero de vacas leiteiras é sempre passível de contaminação bacteriana após o parto . A eliminação dessas bactérias do endométrio depende de uma rápida e robusta resposta inflamatória, incluindo a secreção de citocinas, tais como IL-1 β e IL-6, e quimiocinas como a IL-8, a qual atrai neutrófilos para o sítio de infecção . Porém, balanço energético negativo, com reduzida disponibilidade de glicose e glutamina, é associado com perturbação da reposta imune no gado ; e a persistência da infecção bacteriana no endométrio, levando a doença uterina . O custo do tratamento, a redução de produção de leite e a substituição de animais inférteis gira em torno de 600 milhões de dólares por ano nos EUA . Contudo, os mecanismos que ligam a imunidade e metabolismo ainda não são claramente elucidados.

Respostas à infecção microbiana depende da ligação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) aos receptores de reconhecimento padrão (PRR) levando assim a liberação de citocinas e quimiocinas que orquestram o recrutamento e ativação de células do sistema imune que combatem patógenos invasores . Estresse metabólico e o parto perturbam a função dos neutrófilos . Entretanto, células e tecido endometriais são também importantes para a resposta imune inata contra as bactérias, principalmente via resposta frente a PAMPs, como o LPS de *E. coli* .

A resposta imune inata é expansivamente energética para células do sistema imune e o tecido endometrial . As duas principais fontes de energia celular são a glutamina e glicose . Glicose gera ATP por meio da glicólise e do ciclo de Krebs, e glutamina reabastece os intermediários do ciclo de Krebs (anaplerose), seguindo a conversão de glutamina em glutamato pela glutaminase mitocondrial, e a formação de α -cetoglutarato . Até mesmo a suplementação com glutamina pode modular a resposta imune . No entanto, vacas geralmente possuem redução de glicose e glutamina na circulação periférica após o parto. .

Previamente, foi estabelecido que na presença de glutamina, a redução de glicose diminui no tecido endometrial a secreção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 . Porém, o impacto de glutamina na inflamação endometrial não é conhecido. O presente estudo testou a hipótese que a redução de glutamina compromete a resposta inflamatória contra LPS no tecido endometrial.

Para explorar o papel da glutamina na imunidade inata, foi preparado cultura de tecido endometrial bovino *ex vivo* (explantes), como descrito anteriormente . Brevemente, úteros bovinos sem nenhuma evidência de doença uterina ou infecção microbiana foram coletados de um abatedouro, como parte da rotina normal. Tecido para cultura foi coletado do endométrio usando *punches* de biópsia estéreis de 8-mm de diâmetro (Stiefel Laboratories Ltd, High Wycombe, UK); imediatamente condicionados em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) contendo 1 ml de meio de cultura por poço; e assim incubados à 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂. Para determinar se a glutamina foi necessária para a resposta inflamatória contra LPS, o endométrio foi cultivado por 24 horas em meio de cultura livre de soro contendo quantidades de glicose (0 a 0.9 mg/órgão), e / ou glutamina (0 a 0.584 mg/órgão), e desafiados com veículo ou 100ng/ml de LPS ultrapuro de *E. coli* O111:B4 (Invivogen,

Toulouse, France). O meio foi produzido a partir da adição de glicose (Sigma, Gillingham, Dorset, UK; G8644) e/ou glutamina (Sigma; G7513) em meio DMEM sem glicose e sem glutamina (Thermo Fisher Scientific, Paisely, UK; A1443001). O papel da glicólise foi investigado adicionando 50 mM de 2-deoxi-D-glicose (Sigma; D8375) ao meio.

No final de cada experimento, sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C para análises subsequentes, e o peso dos explantes foram anotados. Concentrações de IL-1 β e IL-6 no sobrenadante foram mensurados por ELISA em duplicata de acordo com o fabricante (Bovine IL-1 β Screening Set ESS0027; Bovine IL-6 DuoSet DY8190, R&D), e IL-8 bovina foi mensurado por ELISA como descrito anteriormente. A atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada para quantificar a viabilidade do tecido endometrial como já descrito; usando Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Cambridge Bioscience Ltd, Cambridge, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram normalizados pelo peso de cada explante e apresentados em média (SEM). Análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, USA), com o animal sendo a unidade experimental. Comparações entre os tratamentos foram avaliadas usando ANOVA com múltipla comparação Sidak. Significância foi estabelecida quando $P < 0.05$.

Para determinar se glutamina influenciaria na resposta inflamatória tecidual, explantes foram colocados em cultura em determinadas quantidades de glutamina, na presença de 0.35 mg/órgão de glicose, e desafiado com veículo ou LPS por 24 h.

Como esperado, os sobrenadantes de cultura acumularam mais IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS do que ao veículo (ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 1A-C). Entretanto, limitada disponibilidade de glutamina reduziu a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS por $> 50\%$ (ANOVA, $P < 0.01$; Fig. 1A-C).

Para explorar se a presença de glicose foi requerida ao impacto de glutamina na resposta inflamatória contra LPS, endométrio foi cultivado em meio contendo variadas quantidades de glutamina, em ausência de glicose, e desafiado com veículo ou LPS. Os sobrenadantes de cultura acumularam mais IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta a LPS do que veículo (ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 1D-F), mas as máximas concentrações foram baixas do que quando glicose esteve presente (Fig. 1A-C). Surpreendentemente, o fornecimento de glutamina não aumentou significativamente o aumento das citocinas IL-1 β (ANOVA, $P = 0.93$), IL-6 ($P = 0.73$) ou IL-8 ($P = 0.94$) em resposta ao LPS, comparado com o tecido sem glutamina (Fig. 1D-F).

Uma preocupação era que *déficits* na disponibilidade de nutrientes possa influenciar a viabilidade do tecido, portanto, avaliou-se a produção de LDH no sobrenadante como marcador de viabilidade tecidual. Mesmo na ausência de glicose e glutamina por 24 h não afetou significativamente a produção de LDH (12.5 ± 2.7 vs. 19.0 ± 1.3 mU LDH/mg tecidos em zero glutamina vs 0.584 mg glutamina, $n = 3$). Juntos, esses dados providenciaram evidências que a disponibilidade de glutamina influenciou a resposta inflamatória no endométrio bovino, mas que glicose pode ser necessária pela glutamina para modular a resposta inflamatória contra LPS.

Foi previamente demonstrado que a limitada disponibilidade de glicose reduz a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS por $> 45\%$, quando explantes do endométrio bovino foram colocados em cultura com 0.584 mg glutamina/órgão. Assim, para melhor compreender o papel da glutamina, endométrio foi cultivado em meio contendo diferentes quantidades de glicose, em ausência de glutamina, e desafiado com veículo ou LPS por 24 h. Os sobrenadantes da cultura tiveram maior concentração de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS do que ao veículo (ANOVA, $P < 0.001$; Fig. 2). No entanto, a ausência de glutamina não afetou o esperado

aumento da produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS quando glicose foi adicionada ao meio (ANOVA, $P < 0.05$; Fig. 2). Assim, esses dados demonstraram que a disponibilidade de glicose influenciou a resposta inflamatória do endométrio bovino, e evidenciou que esse efeito não requer necessariamente a presença de glutamina.

Para entender como a glutamina depende de glicose para a resposta inflamatória contra LPS, foi considerado o papel da glicose na glicólise. Para explorar o papel da glicólise, endométrio bovino foi tratado com glutamina, com ou sem glicose, e 2-deoxiglicose foi utilizado para inibir a glicólise. Como esperado, sobrenadantes de cultura com glicose ou glicose e glutamina acumularam mais IL-1 β , IL-6 e IL-8 contra LPS do que contra veículo (ANOVA, $P < 0.01$; Fig. 3). Resposta inflamatória contra LPS foi reduzida em pelo menos 50% quando glicólise foi inibida no endométrio cultivado com glicose (ANOVA, $P < 0.01$; Fig. 3). Entretanto, a inibição da inflamação por 2-deoxiglicose não foi recuperada pela adição de glutamina, assim como de glicose. Assim, foi demonstrado que o impacto da glutamina na inflamação é dependente de glicólise.

Déficits em glicose e glutamina são comuns no pós-parto bovino com balanço energético negativo, e esse estresse metabólico é associado com doenças uterinas. Déficits em glicose perturba a imunidade inata no endométrio. No presente estudo, foi demonstrado que a disponibilidade limitada de glutamina também perturbou a resposta inflamatória contra LPS no tecido endometrial bovino. Contudo, a presença de glicose foi necessária para glutamina aumentar a inflamação endometrial. Além disso, inibição da glicólise reduziu a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8, mesmo quando glicose e glutamina estavam em abundância.

Disponibilidade limitada de glutamina afetou a resposta imune inata contra LPS no tecido endometrial, no presente estudo. Inadequada resposta inflamatória e imune contra infecções aumentam os riscos de desenvolvimento de inflamação crônica.

Glicose e glutamina são os principais substratos que células e tecidos utilizam para gerar energia via glicólise, ciclo de Krebs e anaplerose .

Respostas inflamatórias demandam muita energia, presumivelmente porque tecidos precisam gerar mediadores inflamatórios e repararem células injuriadas. Assim, limitada glutamina é provável de diminuir fontes de carbono e nitrogênio para a síntese de mediadores inflamatórios, assim como limitando intermediadores para a produção de ATP no ciclo de Krebs. Glutamina, via glutamato, geralmente torna-se α -cetoglutarato na mitocôndria, mas em algumas células o *shunt* GABA também produz succinato para o ciclo de Krebs . Porém, a presença de glicose e glicólise foram necessárias para a glutamina aumentar a inflamação endometrial. Sugerimos, portanto, que os metabólitos da glicose são necessários para explorar plenamente a anaplerose derivada de glutamina no endométrio. De fato, glicólise tem importância adicional durante infecções bacterianas pelo fato de respostas celulares contra LPS induzir ao efeito Warburg, onde o metabolismo é direcionado a glicólise e não ao ciclo de Krebs . O acompanhamento e rastreamento desses metabólitos são necessários para determinar precisamente as vias nas quais as células conectam glutamina à inflamação.

O presente estudo demonstrou como glutamina tem efeito na imunidade inata de tecidos. Porém, foi notado que, embora muito reduzido, depleção de glicose e glutamina não anulou a resposta inflamatória contra LPS. Geralmente o tecido cataboliza outros nutrientes como energia, fontes de carbono e nitrogênio para sintetizar citocinas e quimiocinas. Tradução das observações do presente trabalho necessitam de mais estudos de como a glutamina impacta a biologia e imunidade do endométrio. Como o endométrio possui múltiplos tipos celulares, seria interessante primeiro determinar se o efeito da glutamina é um mecanismo generalizado ou associado a tipos específicos de células.

Em conclusão, depleção de glutamina reduziu a resposta inflamatória contra LPS no endométrio bovino. Entretanto, suporte metabólico para a inflamação provida da adição de glutamina dependeu da presença de glicose e glicólise. Este estudo fornece informação de como o balanço energético negativo pode estar ligado a doenças uterinas no pós-parto.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (99999.010219/2014-05) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (486143/2013-9). Esse trabalho foi financiado pelo Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BB/I017240/1). Nós agradecemos Dr. James Cronin, Dr. Matthew Turner e Dra. Luisa Carneiro pelos conselhos e treinamento.

REFERÊNCIAS

- Borges, A. M., G. D. Healey, and I. M. Sheldon. 2012. Explantes of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *American Journal of Reproductive Immunology* 67(6):526-539.
- Caroprese, M., M. Albenzio, R. Marino, A. Santillo, and A. Sevi. 2012. Immune response and milk production of dairy cows fed graded levels of rumen-protected glutamina. *Res Vet Sci* 93(1):202-209.
- Cronin, J. G., R. Hodges, S. Pedersen, and I. M. Sheldon. 2014. Enzyme linked immunosorbent assay for quantification of bovine interleukin-8 to study infection and immunity in the female genital tract. *American Journal of Reproductive Immunology* 73:372-382.

Cronin, J. G., M. L. Turner, L. Goetze, C. E. Bryant, and I. M. Sheldon. 2012. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod* 86(2):51, 51-59.

DeBerardinis, R. J. and T. Cheng. 2010. Q's next: the diverse functions of glutamina in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29(3):313-324.

Doepel, L., M. Lessard, N. Gagnon, G. E. Lobley, J. F. Bernier, P. Dubreuil, and H. Lapierre. 2006. Effect of postruminal glutamina supplementation on immune response and milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 89(8):3107-3121.

Esposito, G., P. C. Irons, E. C. Webb, and A. Chapwanya. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci* 144(3-4):60-71.

Giuliodori, M. J., R. P. Magnasco, D. Becu-Villalobos, I. M. Lacau-Mengido, C. A. Risco, and R. L. de la Sota. 2013. Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 96(6):3621-3631.

Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, J. P. Goff, and J. L. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113(1-2):21-29.

Ingvarsen, K. L. and K. Moyes. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal* 7 Suppl 1:112-122.

Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.

- Moresco, E. M., D. LaVine, and B. Beutler. 2011. Toll-like receptors. *Curr Biol* 21(13):R488-493.
- Newsholme, P. 2001. Why is L-glutamina metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *The Journal of nutrition* 131(9 Suppl):2515S-2522S.
- Santos, T. M., R. O. Gilbert, and R. C. Bicalho. 2011. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94(1):291-302.
- Saut, J. P., G. D. Healey, A. M. Borges, and I. M. Sheldon. 2014. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reproduction* 148(6):593-606.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio, and H. J. Schuberth. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 81(6):1025-1032.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, D. U. Pfeiffer, and H. Dobson. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 123:837-845.
- Takeuchi, O. and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.
- Tannahill, G. M., A. M. Curtis, J. Adamik, E. M. Palsson-McDermott, A. F. McGettrick, G. Goel, C. Frezza, N. J. Bernard, B. Kelly, N. H. Foley, L. Zheng, A. Gardet, Z. Tong,

S. S. Jany, S. C. Corr, M. Haneklaus, B. E. Caffrey, K. Pierce, S. Walmsley, F. C. Beasley, E. Cummins, V. Nizet, M. Whyte, C. T. Taylor, H. Lin, S. L. Masters, E. Gottlieb, V. P. Kelly, C. Clish, P. E. Auron, R. J. Xavier, and L. A. O'Neill. 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496(7444):238-242.

Turner, M. L., J. C. Cronin, G. D. Healey, and I. M. Sheldon. 2014. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1 and TLR6. *Endocrinology* 155:1453-1465.

Turner, M. L., J. G. Cronin, P. G. Noleto, and I. M. Sheldon. 2016. Glucose Availability and AMP-Activated Protein Kinase Link Energy Metabolism and Innate Immunity in the Bovine Endometrium. *PLOS ONE* 11(3):e0151416.

Vander Heiden, M. G., S. Y. Lunt, T. L. Dayton, B. P. Fiske, W. J. Israelsen, K. R. Mattaini, N. I. Vokes, G. Stephanopoulos, L. C. Cantley, C. M. Metallo, and J. W. Locasale. 2011. Metabolic Pathway Alterations that Support Cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76:325-334.

Wathes, D. C., Z. Cheng, W. Chowdhury, M. A. Fenwick, R. Fitzpatrick, D. G. Morris, J. Patton, and J. J. Murphy. 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics* 39(1):1-13.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Glutamina modula resposta inflamatória contra LPS. Tecido endometrial foi cultivado durante 24 h em meio contendo as quantidades indicadas de Glutamina, com 0,36 mg de glicose (A-C) ou sem glicose (D-F), e desafiados com veículo controle (□) ou 100 ng de LPS / ml (■). No final do experimento, os órgãos endometriais foram pesados e registrados e a acumulação de IL-1 β (A, D), IL-6 (B, E), e IL-8 (C, F), mensuradas nos sobrenadantes. Os dados são apresentados como média + SEM de 4 experimentos independentes, e analisados por ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Sidak; valores diferem do controle, *** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,05

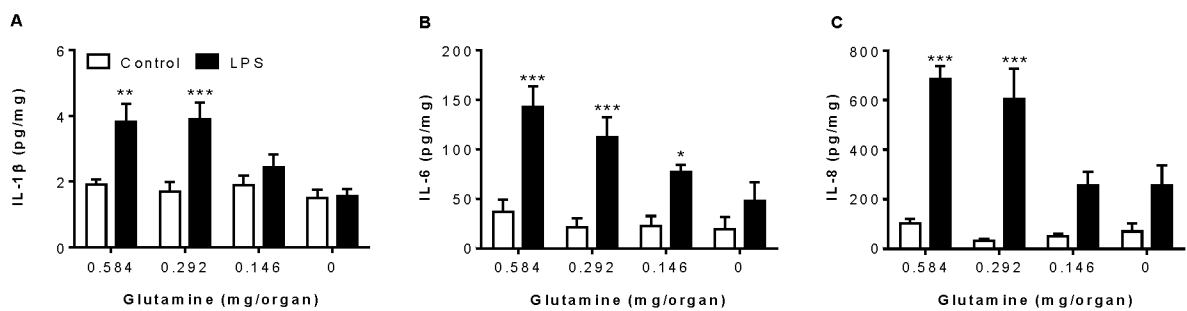
Figura 2. Glicose modula as respostas inflamatórias a LPS, mesmo na ausência de glutamina. Tecido endometrial foi cultivado durante 24 h em meio contendo 0,9, 0,36 e 0 mg de glicose, sem glutamina, e desafiados com veículo controle (□) ou LPS 100 ng / ml (■). No final do experimento, os órgãos endometriais foram pesados e registrados e a acumulação de IL-1 β (A), IL-6 (B), e IL-8 (C), mensurada nos sobrenadantes. Os dados são apresentados como média + SEM de 7 experimentos independentes, e analisados por ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Sidak; valores diferem de controle, *** P <0,001, * P <0,05

Figura 3. A glicólise é importante para as respostas inflamatórias a LPS. Tecido endometrial foi cultivado durante 24 h em meio contendo 0,584 mg de glicose com ou

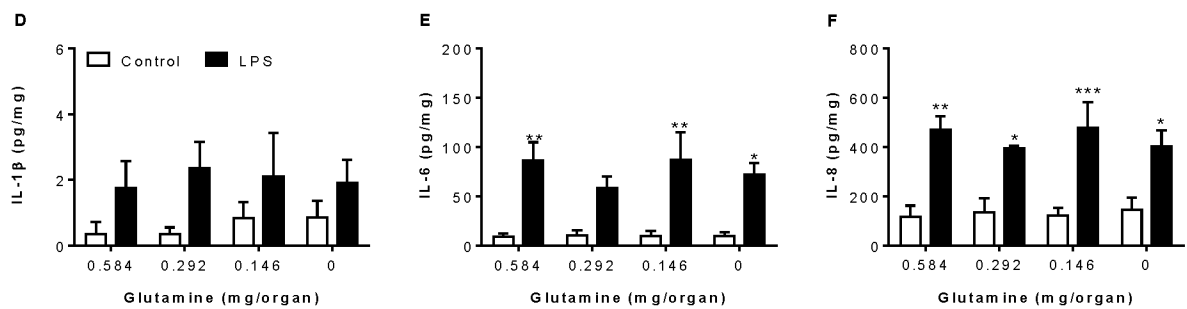
sem 50 mM de 2-deoxi-glicose (2DG) para inibir a glicólise, 0,36 mg de glicose e 0,584 mg de glutamina com ou sem 50 mM de 2-deoxi-glicose (2DG), e desafiados com veículo controle (□) ou 100 ng / ml de LPS (■). No final do experimento, os órgãos endometriais foram pesados e registrados e a acumulação de IL-1 β (A), IL-6 (B) e IL-8 (C), mensurada nos sobrenadantes. Os dados são apresentados como média + SEM de 3 experimentos independentes, e analisados por ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Sidak; valores diferem do controle, *** P <0,001, ** P <0,01, ou onde indicado.

Noieto Figure 1

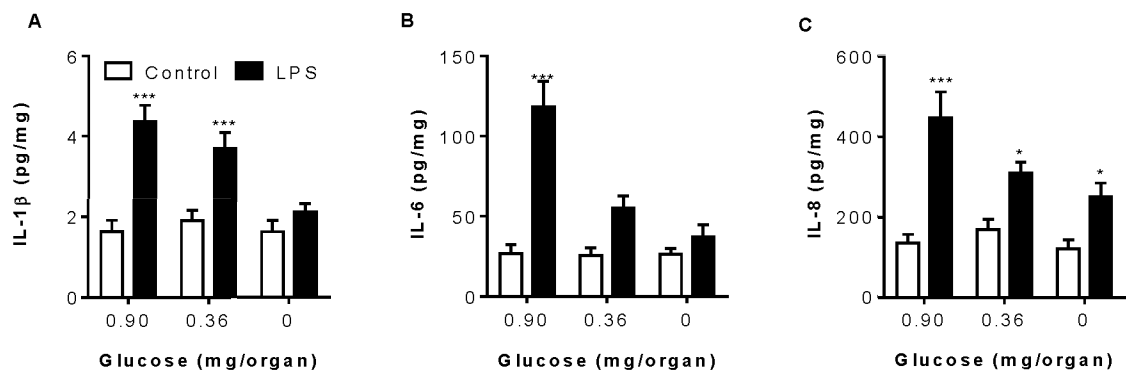
0.36 mg/organ Glucose



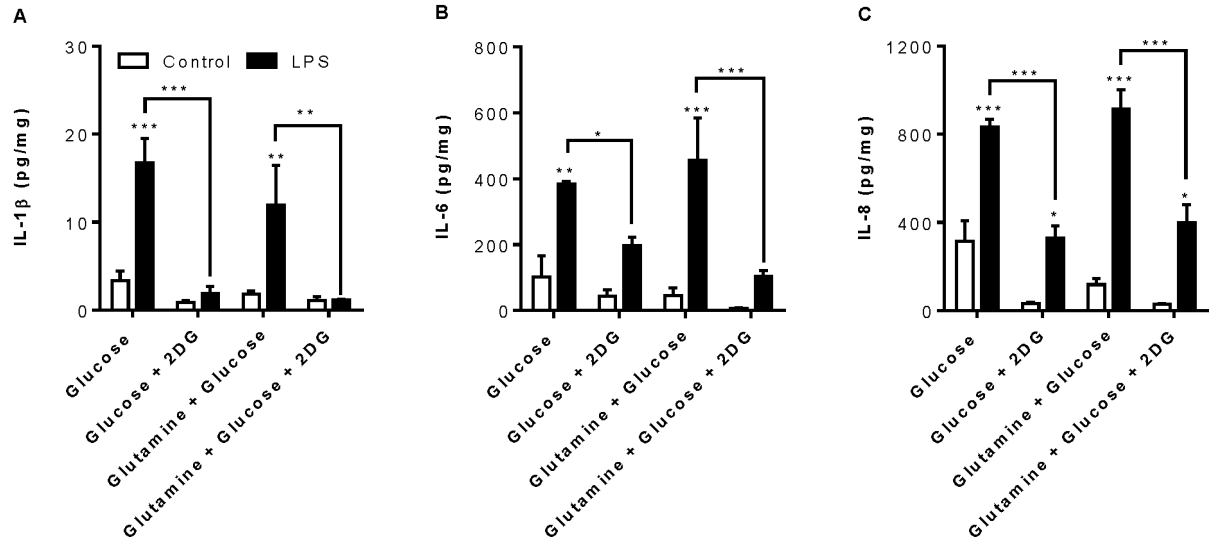
No Glucose



Noieto Figure 2



Noieto Figure 3



Capítulo 4 – Endométrio bovino responde a biotina com redução de citocina e quimiocina pró-inflamatórias

Artigo submetido ao periódico **Research in Veterinary Science**

RESUMO

Biotina é uma vitamina hidrossolúvel importante a todos organismos envolvida em várias vias metabólicas celulares dentre eles a regulação do estresse celular oxidativo, expressão de genes e na função de células do sistema imune. A contínua inflamação e resposta imune inata contra infecção bacteriana no útero após o parto compromete o bem-estar animal. Durante a infecção, células do sistema imune reconhecem os patógenos invasores e reagem com inflamação sistêmica e local com a produção de citocinas. Aumento das citocinas pró-inflamatórias vem sendo reportada quando ocorre deficiência em biotina. Neste trabalho, portanto, foi testada a hipótese se a suplementação de biotina em tecido endometrial bovino desafiado com LPS direciona efeitos anti-inflamatórios. Para explorar se biotina depende de glicose ou glutamina na resposta inflamatória, tecido endometrial foi cultivado em meio contendo glicose 5mM ou glutamina 2mM com a suplementação ou não de 8mM de biotina. Observamos que a presença de glicose ou glutamina não foi um fator limitante para resposta da biotina na resposta inflamatória. Para determinar os efeitos da biotina, investigamos a produção de citocinas no sobrenadante de tecido endometrial desafiado com LPS, na presença de glutamina ou glicose. Após a estimulação de 24 hs, sobrenadantes foram coletados para análise de ELISA para IL-6 e IL-8. Ao adicionarmos biotina, houve redução da produção de citocinas. O nível de citocinas foi substancialmente diferente entre controle e LPS quando se compara sem biotina e com biotina. Demonstrou-se, portanto, que a suplementação de biotina tem carácter anti-inflamatório pela redução de citocinas no endométrio bovino.

Palavras-chave: gado de leite, glicose, glutamina, IL-6, IL-8

Biotina é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B e é importante a todos organismos devido ao seu papel clássico e essencial associado à indispensáveis carboxilases: piruvato carboxilase, duas isoformas de acetil-CoA carboxilase, propionil-CoA carboxilase e metilcrotonil-CoA carboxilase. Essas carboxilases dependente de biotina estão envolvidas em várias vias metabólicas celulares, como a gliconeogênese, síntese de ácidos graxos, oxidação de ácidos graxos, catabolismo da leucina entre outros (McMahon, 2002; Kuroishi, 2015). Ainda há outros importantes papéis para biotina como na regulação do estresse celular oxidativo, expressão de genes e na função de células do sistema imune (Agrawal et al., 2016; Kuroishi, 2015; Kuroishi et al., 2008; Rodriguez-Melendez e Zemleni, 2003; Said, 2012).

Ruminantes produzem biotina como resultado da fermentação bacteriana no rúmen, e é um essencial nutriente tanto para o crescimento bacteriano quanto para gado de leite. Recentes estudos demonstraram que a suplementação com biotina é importante para aumentar a lactação no gado leiteiro (Chen et al., 2011; Lean e Rabiee, 2011). Além disso, a biotina é um cofator para as enzimas microbianas envolvendo a síntese do ácido propiônico, e também presente na gliconeogênese e outros papéis metabólicos em mamíferos (Chen et al., 2011; Lean e Rabiee, 2011).

A contínua inflamação e resposta imune inata contra infecção bacteriana no útero após o parto compromete o bem-estar animal e também está associada a redução de fertilidade. Durante a infecção, células do sistema imune reconhecem os patógenos invasores e reagem com inflamação sistêmica e local com a produção de citocinas (Dervishi et al., 2016; Sheldon et al., 2009; Sheldon e Dobson, 2004).

Citocinas servem como mensageiras entre células do sistema imune e ainda possuem importância em várias funções da resposta inflamatória. A proliferação e

síntese de citocinas podem aumentar a demanda nutricional pela necessidade de nutrientes requeridos pela energia metabólica, vias biosintéticas, coenzimas, síntese de DNA. Aumento das citocinas pró-inflamatórias vem sendo reportada quando ocorre deficiência em biotina (Agrawal et al., 2016; Kuroishi, 2015; Kuroishi et al., 2008; Zemleni et al., 2001).

Embora o metabolismo e o papel da biotina já estão bem estabelecidos, a biotina ainda permanece uma das vitaminas menos entendidas em termos de requerimento nutricional e sua resposta frente aos estados fisiológicos, patológicos e farmacológicos (McMahon, 2002).

Nesse trabalho, avaliamos se a suplementação de biotina em tecido endometrial bovino desafiado com LPS direciona efeitos anti-inflamatórios.

Coletamos útero sem nenhuma evidência de contaminação bacteriana ou doença uterina de um frigorífico em Swansea, Reino Unido, após o procedimento normal e rotineiro do estabelecimento. Culturas do tecido endometrial (*explants*) foram obtidas utilizando *punchs* de biópsia de 8mm de diâmetro, imediatamente colocados em placas de 24-poços contendo 1 ml de meio de cultura por poço, e incubados a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂.

Para determinar se biotina tem efeito sobre a resposta inflamatória no endométrio contra LPS, o tecido endometrial foi cultivado em meio DMEM (Thermo Fisher Scientific, Paisely, UK; A1443001) livre de glicose, glutamina, vitaminas. Para cada experimento adicionou-se 8mM de biotina (Sigma, B4501) com 5mM de glicose (Sigma, G8644) ou 2mM de glutamina (Sigma, G7513), e desafiados com veículo ou 100ng/mL de LPS ultrapuro de *E. coli* O111:B4 (Invivogen, Toulouse, França).

Foi utilizado glicose e glutamina como fontes de energia ao *explant* endometrial para a produção de citocinas inflamatórias como já demonstrado em estudo anterior

(Turner et al., 2016).

Ao final de cada experimento, sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para as análises finais, e também os *explants* foram pesados e anotados. Concentrações de IL-6 e IL-8 nos sobrenadantes foram mensurados em duplicata por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Bovine IL-6 DuoSet DY8190, R&D; Bovine IL-8 foi mensurado de acordo com Cronin et al. (2012)). Coeficientes de variação entre-ensaio e inter-ensaio foram menores que 10%, e os limites de detecção foram 75 pg/mL para IL-6 e 32pg/mL para IL8.

A atividade de lactato desidrogenase foi mensurada para avaliar se houve deterioração dos *explants*, conforme descrito anteriormente (Borges et al., 2012; Turner et al., 2016), usando Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Cambridge Bioscience, Ltd, Cambridge, UK), de acordo com as instruções do fabricante.

Os dados foram normalizados para o peso de cada *explant* e apresentado em média (SEM). Análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, USA), como o animal como experimento individual. Comparações entre os tratamentos foram realizados por ANOVA com pós-teste Bonferroni. Significância foi atribuída quando $P < 0,05$.

Para explorar se a biotina depende de glicose ou glutamina na resposta inflamatória, *explants* foram cultivados em meio contendo glicose 5mM ou glutamina 2mM com a suplementação ou não de 8mM de biotina (Figuras 1 e 2). A presença de glicose ou glutamina não foi um fator limitante para a resposta de biotina na resposta inflamatória. Na suplementação de biotina, mesmo com adição de glicose ou glutamina, não recuperou a produção de citocinas, demonstrando então que os mecanismos de biotina na ação anti-inflamatória não são dependentes de glicose ou glutamina.

Para determinar os efeitos da biotina, foi investigado a produção de citocinas no

sobrenadante de tecido endometrial desafiado com LPS, na presença de glutamina (Figura 1) ou glicose (Figura 2). Após a estimulação de 24 hs, sobrenadantes foram coletados para análise de ELISA e IL-6 e IL-8. Houve diferença estatística entre controle e desafiado com LPS, porém, ao adicionar biotina, houve redução da produção de citocinas, tornando-se os valores entre LPS e controle menos significantes. O nível de citocinas foi substancialmente diferente entre controle e LPS quando se compara o *explant* sem biotina com aquele com biotina.

Na presença de glicose (Figura 2), a suplementação de biotina torna a comparação entre LPS e controle não significativa. E apenas para IL-6 na presença de glicose, biotina se mostrou significativamente importante na redução da produção dessa citocina pró-inflamatória ($P < 0,01$) contra LPS.

Estudos anteriores demonstraram que a deficiência de biotina tem um impacto na resposta imune (Kuroishi, 2015; Kuroishi et al., 2008) e em células dendríticas (Agrawal et al., 2016). Neste estudo, o efeito da biotina no tecido endometrial desafiado com LPS na presença de glicose ou glutamina mostraram que mesmo não significativo houve uma redução do processo inflamatório, reduzindo a produção de citocinas IL-6 e IL-8. Os *explants* produziram altas concentrações de citocinas quando desafiadas com LPS comparado com o controle, e após a adição de biotina, essa diferença foi reduzida ou tornou-se não significativo e para IL-6 na presença de glicose, houve significância.

Nosso estudo entre em acordo com outros realizados em macrófagos que aumentaram a produção de TNF-alfa em culturas que tiveram deficiência em biotina (Kuroishi et al., 2008), e ainda aumento e produção de espécies reativas de oxigênio quando há ausência de biotina (Madsen et al., 2015) e aumento de citocinas TNF-alfa, IL-1 β , IL-23 e IL-12 em células dendríticas desafiadas com LPS cultivadas em meio reduzido de biotina (Agrawal et al., 2016).

A biotina tem papel maior no controle da homeostase de energia celular porque sua função é a chave para várias carboxilases que são essenciais para o metabolismo mitocondrial da glicose, ácidos graxos e aminoácidos (Kuroishi, 2015). Nós mostramos, que na presença de glicose ou glutamina, a adição de biotina tem papel anti-inflamatória, reduzindo citocinas pró-inflamatórias, sendo mais eficiente na presença de glicose e na produção de IL-6. A dose de 8mM de biotina utilizada deve-se ao fato de ser o valor normalmente encontrado nos meios de suplementação celular, uma dose considerada fisiológica. Acreditamos que se utilizássemos também dose farmacológica, dez a cem vezes maior que a dose utilizada, os valores poderiam ser mais significantes (Agrawal et al., 2016; Zemleni et al., 2001).

Embora muito ainda tem que ser estudado sobre os mecanismos que possam vir a interferir a biotina na produção de citocinas, Rodriguez-Melendez et al. (2004) demonstraram que em meio suplementado com biotina, o fator NF- κ B foi consideravelmente menor e que a ausência de biotina aumenta a translocação do fator NF- κ B, resultando assim na produção de citocinas. O fator NF- κ B é um dos mais importantes fatores de translocação que regula a expressão de vários genes envolvendo a resposta imune e inflamatória (Li e Verma, 2002; Tornatore et al., 2012). Assim, quando suplementa o meio com biotina, o fator NF- κ B pode não ser ativado, não translocando nuclearmente, culminando na não produção de citocinas. Este achado corrobora com os achados por Cronin et al. (2012), quando a inibição de NF- κ B resultou na redução das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 em células estromais e epiteliais do endométrio bovino.

É sabido que desnutrição pode impedir a função do sistema imune (Hotamisligil e Erbay, 2008), entretanto, neste estudo foi mostrado que a suplementação de biotina também interferiu no sistema imune, diminuindo a resposta inflamatória.

Em conclusão, foi demonstrado que a suplementação de biotina reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias no endométrio bovino. Mais estudos são necessários para conhecer os mecanismos na qual a biotina integra metabolismo e sistema imune no endométrio bovino.

O financiamento foi fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior/CAPES (99999.010219/2014-05), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (486143/2013-9) e Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BB/I017240/1). Nós também agradecemos Dr. James Cronin, Dr. Matthew Turner e Sholeem Griffin pelos conselhos e apoio as técnicas.

Referências

- Agrawal, S., Agrawal, A., Said, H.M., 2016. Biotin Deficiency Enhances the Inflammatory Response of Human Dendritic Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* ajpcell 00141 2016. doi:10.1152/ajpcell.00141.2016
- Borges, Á.M., Healey, G.D., Sheldon, I.M., 2012. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. *Am. J. Reprod. Immunol.* 67, 526–539. doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x
- Chen, B., Wang, C., Wang, Y.M., Liu, J.X., 2011. Effect of biotin on milk performance of dairy cattle: a meta-analysis. *J Dairy Sci* 94, 3537–3546. doi:10.3168/jds.2010-3764
- Cronin, J.G., Turner, M.L., Goetze, L., Bryant, C.E., Sheldon, I.M., 2012. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 86, 51. doi:10.1095/biolreprod.111.092718
- Dervishi, E., Zhang, G., Hailemariam, D., Goldansaz, S.A., Deng, Q., Dunn, S.M., Ametaj, B.N., 2016. Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 104, 30–39. doi:10.1016/j.rvsc.2015.11.004
- Hotamisligil, G.S., Erbay, E., 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 923–934. doi:10.1038/nri2449
- Kuroishi, T., 2015. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. *Can J Physiol Pharmacol* 93, 1091–1096. doi:10.1139/cjpp-2014-0460

- Kuroishi, T., Endo, Y., Muramoto, K., Sugawara, S., 2008. Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 83, 912–920. doi:10.1189/jlb.0607428
- Lean, I.J., Rabiee, A.R., 2011. Effect of feeding biotin on milk production and hoof health in lactating dairy cows: a quantitative assessment. *J Dairy Sci* 94, 1465–1476. doi:10.3168/jds.2010-3682
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 725–34. doi:10.1038/nri910
- Madsen, C.T., Sylvestersen, K.B., Young, C., Larsen, S.C., Poulsen, J.W., Andersen, M.A., Palmqvist, E.A., Hey-Mogensen, M., Jensen, P.B., Treebak, J.T., Lisby, M., Nielsen, M.L., 2015. Biotin starvation causes mitochondrial protein hyperacetylation and partial rescue by the SIRT3-like deacetylase Hst4p. *Nat. Commun.* 6, 7726. doi:10.1038/ncomms8726
- McMahon, R.J., 2002. Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 221–39. doi:10.1146/annurev.nutr.22.121101.112819
- Rodriguez-Melendez, R., Schwab, L.D., Zemleni, J., 2004. Jurkat cells respond to biotin deficiency with increased nuclear translocation of NF- κ B, mediating cell survival. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74, 209–16.
- Rodriguez-Melendez, R., Zemleni, J., 2003. Regulation of gene expression by biotin (review). *J. Nutr. Biochem.* doi:10.1016/j.jnutbio.2003.07.001
- Said, H.M., 2012. Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects., in: *Water Soluble Vitamins*. p. 1–19. doi:10.1007/978-94-007-2199-9_1

- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H.J., 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 81, 1025–1032.
doi:10.1095/biolreprod.109.077370
- Sheldon, I.M., Dobson, H., 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 82–83, 295–306. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.006
- Tornatore, L., Thotakura, A.K., Bennett, J., Moretti, M., Franzoso, G., 2012. The nuclear factor kappa B signaling pathway: Integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol.* doi:10.1016/j.tcb.2012.08.001
- Turner, M.L., Cronin, J.G., Noleto, P.G., Sheldon, I.M., 2016. Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0151416
- Zempleni, J., Helm, R.M., Mock, D.M., 2001. In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr* 131, 1479–1484.

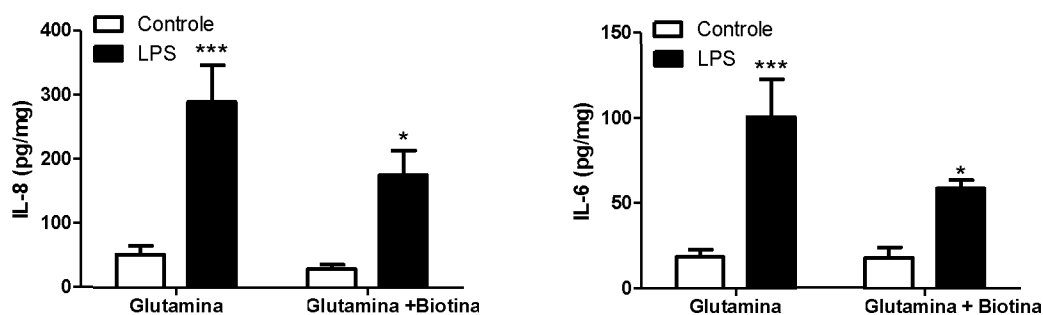


Figura 1. Biotina na presença de glutamina reduz a produção de IL-6 e IL-8 em tecido endometrial desafiado com LPS. *Explants* foram cultivados em meio com glutamina 2mM com ou sem biotina, desafiados com veículo ou LPS, por 24 hs. Após, sobrenadantes foram coletados e demonstraram acúmulo de citocina e quimiocina. Dados apresentados em média + SEM. n = 4. Diferenças entre controle e LPS, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$.

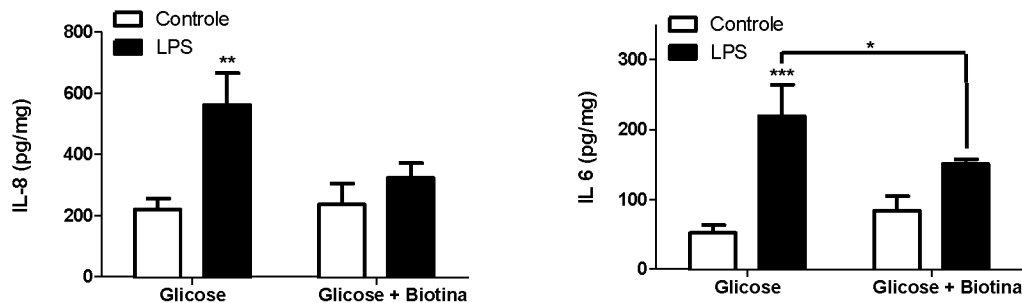


Figura 2. Biotina na presença de glicose reduz a produção de IL-6 e IL-8 em tecido endometrial desafiado com LPS. *Explants* foram cultivados em meio com glicose 5mM com ou sem biotina, desafiados com veículo ou LPS, por 24 hs. Após, sobrenadantes foram coletados e demonstraram acúmulo de citocina e quimiocina. Dados apresentados em média + SEM. n = 4. Diferenças entre controle e LPS, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$. Diferença entre LPS, * $P < 0,05$.