

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Philippe Pimenta Nunes

**USO DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*  
PARA CONTROLE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ENDOMETRIAL BOVINA**

Belo Horizonte

2021

Philippe Pimenta Nunes

**USO DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*  
PARA CONTROLE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ENDOMETRIAL BOVINA**

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Álan Maia Borges

Coorientador: Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte**

**2021**

Nunes, Philipe Pimenta, 1989 -  
N972u      Uso de nanopartículas de carbono em modelos in vitro e in vivo para controle da  
resposta inflamatória endometrial bovina/ Philipe Pimenta Nunes. – 2021.

132 f.:il.

Orientador: Álan Maia Borges

Coorientador: Renato de Lima Santos

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Bibliografias: f. 65 – 75.

1. Camundongo - Teses – 2. Bovino – Doença - Teses – 3. Nanotecnologia – Teses – 4.  
Ciência animal – Teses – I. Borges, Álan Maia – II. Santos, Renato de Lima - III. Universidade  
Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

PHILIFE PIMENTA NUNES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Reprodução Animal.

Aprovada em 30 de abril de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Alan Maia Borges

Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Tatiane Alves da Paixão

Dr.(a). Guilherme Pugliesi

Dr.(a). Mariana Machado Neves

Dr.(a). Antônio de Pinho Marques Júnior



Documento assinado eletronicamente por Alan Maia Borges, Professor do Magistério Superior, em 30/04/2021, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Guilherme Pugliesi, Usuário Externo, em 30/04/2021, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Tatiane Alves da Paixao, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 30/04/2021, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Antonio de Pinho Marques Junior, Professor do Magistério Superior, em 01/05/2021, às 20:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Mariana Machado Neves, Usuário Externo, em 05/05/2021, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0693266 e o código CRC 1676CFC8.



*Dedico esse trabalho à minha noiva Alessandra,  
pelo amor, companheirismo e cumplicidade  
durante toda minha Pós-graduação. Em  
especial, dedico aos meus pais, Márvido e  
Margarete, e ao meu irmão Helton, por serem  
os pilares inabaláveis da minha existência.*



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paciência, serenidade, força e sabedoria para concluir mais uma etapa dessa minha longa jornada.

A Universidade Federal de Minas Gerais, em especial à Escola de Veterinária, Instituto de Ciências Exatas e ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, agradeço a possibilidade e a infraestrutura para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido a minha bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por ter fomentado a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Alan Maia Borges, pela amizade, ensinamentos, compreensão, confiança e apoio na execução do doutorado e outros projetos.

Ao meu coorientador Prof. Renato de Lima Santos, pela amizade, confiança, parceria em trabalhos, contribuição intelectual e apoio na execução do doutorado e outros projetos.

Aos professores Tatiana Alves da Paixão, Antônio Pinho de Marques Júnior, Mariana Machado Neves e Guilherme Pugliesi, pela contribuição durante o doutorado, participação na banca examinadora e sugestões para melhoria do presente trabalho.

Aos professores Ado Jorio de Vasconcelos, Luiz Orlando Ladeira, Clascídia Aparecida Furtado, Mariana Ramos de Almeida e Cristiano Fantini Leite, pelo acolhimento, confiança e ensinamentos na área de nanotecnologia e espectroscopia voltados à aplicação de nanotubos de carbono.

A Flávia Pacheco, Raquel de Oliveira e Marina Ladeira pela amizade construída, imenso apoio durante a condução dos processos de padronização de nanotubos de carbono e fullerol, além da contribuição intelectual para o desenvolvimento do presente trabalho.



A equipe do Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária, em especial a Juliana Mol, Camila Eckstein, Monique Silva, Thaynara Carvalho, Diego Batista, Fabíola Costa e Pâmela Lima, pela amizade, carinho, parceria e imensa disposição em ajudar e contribuir para a melhor condução experimental.

Aos meus amigos de Pós-graduação na área de Reprodução Animal, Ana Carolina Leite, Luciano Carvalheira, Adolfo Perez, Victor Mutti, Rita Palhares, Aline Machado e à técnica administrativa Eliane Beatriz Magalhães Silva, pela amizade, companheirismo, descontrações, estudos e apoio em todas as fases do doutorado.

A todos os funcionários do Frigobet Frigorífico Industrial Betim Ltda e Hipercarnes Indústria e Comércio Ltda, por abrirem as portas e com muita simpatia, permitirem a colheita de material para o experimento.

A minha família e amigos pelo incentivo, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada.

A todos aqueles que estiveram comigo durante meu doutorado e que porventura não foram citados,

Muito obrigado!

*Emancipate yourselves from mental slavery,  
none but ourselves can free our minds.*

*(Bob Marley)*



## RESUMO

Nanobiotecnologias baseadas em nanopartículas de carbono para controle de doenças, seja via silenciamento da expressão gênica ou ação anti-inflamatória, surgem como possibilidade para o controle da resposta inflamatória endometrial em fêmeas bovinas no pós-parto. Tendo em vista a possível aplicação de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) em fêmeas bovinas e o desenvolvimento de método de detecção para avaliação da segurança de MWCNT *in vivo*, a primeira parte do estudo objetivou avaliar a capacidade da técnica de FT-Raman em detectar, qualitativamente e quantitativamente, MWCNT diluídos em leite de vaca *in natura*. A técnica de FT-Raman discriminou qualitativamente a presença de MWCNT em leite acima de 1µg/mL. Entretanto, o modelo de análise de regressão linear não determinou, quantitativamente, diferentes concentrações de MWCNT em leite *in natura*. Na segunda parte do trabalho, células endometriais bovinas foram submetidas a silenciamento gênico da molécula MyD88, utilizando MWCNT como agente de transcrição, ou cultivadas em meio contendo fulerol ou dexametasona, com o objetivo de controlar a transcrição endometrial de IL-1β, IL-6 e CXCL8 induzida *in vitro* por lipopolissacarídeo (LPS). MWCNT não induziram resposta inflamatória endometrial, porém o complexo silenciador MWCNT-MyD88 siRNA não silenciou a expressão de MyD88 ( $P>0,05$ ) ou reduziu o número de transcritos para IL-1β ( $P>0,05$ ), IL-6 ( $P>0,05$ ) e CXCL8 ( $P>0,05$ ) pós-estimulação com LPS. Fulerol reduziu o número de transcritos para IL-1β ( $P<0,01$ ) e dexametasona o número de transcritos para IL-1β ( $P<0,05$ ) e IL-6 ( $P<0,05$ ) após estimulação de células endometriais com LPS. O último estudo teve como objetivo verificar, por meio de avaliação histopatológica, a ação anti-inflamatória do fulerol sobre modelo murino *in vivo* de endometrite induzida por LPS. Entretanto, o modelo proposto não foi efetivo em gerar uma resposta inflamatória endometrial, impossibilitando assim a avaliação da ação anti-inflamatória do fulerol sobre o endométrio murino inflamado. Em conclusão, o uso de MWCNT padronizados como agente de transfecção para siRNA em células endometriais bovinas requer estudos mais aprofundados visando atingir o potencial da técnica no controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, fulerol e dexametasona podem reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, com potencial para controlar, *in vivo*, a resposta inflamatória endometrial bovina.

Palavras-chave: Nanopartícula. Carbono. Endométrio. Inflamação. Bovino.



## ABSTRACT

Nanobiotechnologies based on carbon nanoparticles for disease control, either by gene silencing or anti-inflammatory action, rise as a possibility for the control of endometrial inflammatory response in post-partum cows. The possibility to apply multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in cow and the development of a methodology to detect carbon nanotubes safety *in vivo*, the first study aimed to evaluate the qualitative and quantitative potential of the FT-Raman technique to detect MWCNT diluted in bovine whole fresh milk. The FT-Raman qualitatively identified MWCNT in milk over 1µg/mL. However, the linear regression analysis model did not quantitatively predict, with precision, different MWCNT dilutions in fresh milk. In the second study, bovine endometrial cells were cultured with MyD88 silencing complex, composed by MWCNT as vector for siRNA targeting MyD88, fullerol, or dexamethasone aiming to control the endometrial transcription of IL-1β, IL-6 and CXCL8 induced by lipopolysaccharide (LPS) stimulation *in vitro*. MWCNT did not induce endometrial inflammatory response. However, the silencing complexes MWCNT-MyD88 siRNA did not silence the MyD88 expression ( $P>0.05$ ) or reduced the transcript levels for IL-1β ( $P>0.05$ ), IL-6 ( $P>0.05$ ) and CXCL8 ( $P>0.05$ ) post LPS stimulation. Fullerol reduced the transcript level for IL-1β ( $P<0.01$ ) and dexamethasone decreased transcription of IL-1β ( $P<0.05$ ) and IL-6 ( $P<0.05$ ) post endometrial cells stimulation with LPS. The third study aimed to evaluate, by histopathological analysis, the anti-inflammatory effect of fullerol over an *in vivo* murine model of endometritis induced by LPS. However, the proposed model was not effective to induce an endometrial inflammatory response, avoiding the evaluation of the fullerol anti-inflammatory effect over murine inflamed endometrium. In conclusion, the use standardized MWCNT as transfection agent for siRNA in bovine endometrial cells require more studies aiming to achieve the technique potential for control the expression of pro-inflammatory cytokines. However, fullerol and dexamethasone can reduce the expression of pro-inflammatory cytokines *in vitro*, with potential to control, *in vivo*, the endometrial inflammatory response in cattle.

Keywords: Nanoparticles. Carbon. Endometrium. Inflammation. Bovine.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema ilustrando cascatas de sinalização intracelular e seus produtos após estimulação de TLRs por seus respectivos ligantes	34
Figura 2	Representação esquemática da conformação dos nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e múltipla (MWCNT) a partir de uma folha de grafeno	57
Figura 3	Representação esquemática de nanotubos de carbonos funcionalizados.	58
Figura 4	Representação estrutural de moléculas de fulerenos	61
Cap. I		
Figure 1	Raman spectra, derivative thermogravimetric analysis and adjusted theoretical and experimental titration curve of standardized MWCNT	81
Figure 2	Structural and size characterization of standardized MWCNT	82
Figure 3	FT-Raman spectra of cow's fresh milk and 25 µg/mL of standardized MWCNT diluted in fresh milk	82
Figure 4	FT-Raman spectra of fresh milk and various MWCNT dilutions in fresh milk	83
Figure 5	Regression analysis developed to predict an unknown concentration of MWCNT in cow's fresh milk	84
Cap. II		
Figure 1	Immunocytochemistry of primary mixed endometrial cells cultured in six-well plate	102
Figure 2	Transcription levels of MYD88 (a), IL1B (b), IL6 (c) and CXCL8 (d) in primary endometrial cell cultured with control medium, LPS, MWCNT or commercial lipofectamine	104
Figure 3	Transcription levels of MYD88, IL1B, IL6 and CXCL8 in primary endometrial cell cultured with control medium or LPS	105
Figure 4	Transcription levels of IL1B, IL6 and CXCL8 (median with minimum and maximum values) in primary endometrial cell cultured with different concentrations of fullerol (1 nM, 10 nM and 50 nM) and stimulated with LPS	106



Figure 5	Transcription levels of IL1B, IL6 and CXCL8 in primary endometrial cell cultured with 10-fold serial dilutions of dexamethasone (0.5 ng/mL, 5.0 ng/mL and 50.0 ng/mL) and stimulated with LPS	107
Cap. III		
Figure 1	Microscopic evaluation of histological sections of vagina, from different experimental groups, stained by Hematoxylin and eosin	123
Figure 2	Microscopic evaluation of histological section of vagina-cervix transition stained with hematoxylin and eosin	124
Figure 3	Microscopic evaluation of histological sections of uterus stained with hematoxylin and eosin	124
Figure 4	Scatter plot of inflammation score of vagina (a), cervix (b) and uterus (c) from animals treated with PBS, fullerol 50 nM, 1.0 mg/mL LPS and fullerol 50 nM and 1.0 mg/mL LPS	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Receptores tipo- <i>TollI</i> com respectivas localizações, ligantes (PAMP) e suas origens, e expressão no útero bovino	33
Ch. II	Forward (F) and reverse (R) nucleotide sequences, amplicon length in base pair (bp), melting temperature and NCBI reference sequence (RefSeq) for primers used in this study: MyD88, IL-1B, IL-6, CXCL8 and GAPDH	101
Ch III	Inflammation score used to classify histological sections of female genital tract from mice, according to the observed inflammation characteristics	122



## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO I	Certificado de protocolo CEUA 409/2018	131
ANEXOII	Certificado de protocolo CEUA 121/2020	132



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Imunidade inata uterina</b>	<b>28</b>
3.1.1	<i>Endométrio bovino</i>	29
3.1.2	<i>Reconhecimento de microrganismos pelo sistema imune inato</i>	30
3.1.3	<i>Receptores tipo-Toll (TLR)</i>	31
3.1.4	<i>Receptores tipo-NOD (NLR)</i>	35
3.1.5	<i>Receptores tipo-RIG-I (RLR)</i>	36
3.1.6	<i>Receptores lecitina tipo-C (CLR)</i>	37
3.1.7	<i>Padrões moleculares associados a dano celular (DAMP)</i>	37
3.1.8	<i>Resposta endometrial ao reconhecimento de patógenos</i>	38
3.1.9	<i>Relação entre hormônios esteroides sexuais e resposta imune inata uterina</i>	42
<b>3.2</b>	<b>Puerpério fisiológico</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Fatores predisponentes a ocorrência de infecções uterinas pós-parto</b>	<b>45</b>
<b>3.4</b>	<b>Puerpério patológico</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Etiologia das infecções uterinas pós-parto na vaca</b>	<b>48</b>
3.5.1	<i>Escherichia coli</i>	49
3.5.2	<i>Trueperella pyogenes</i>	50
3.5.3	<i>Fusobacterium necrophorum e Prevotella melaninogenica</i>	52
3.5.4	<i>Herpesvírus Bovino tipo 4</i>	53
<b>3.6</b>	<b>Definições das infecções uterinas</b>	<b>54</b>
<b>3.7</b>	<b>Nanociência, nanotecnologia e nanobiotecnologia</b>	<b>56</b>
3.7.1	<i>Nanotubos de carbono</i>	56
3.7.1.1	<i>Nanotubos de carbono em terapia gênica</i>	59
3.7.2	<i>Fulerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(n)</sub></i>	60
3.7.3	<i>Toxicidade de nanopartículas</i>	62
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>

## **CAPÍTULO I**

<b>Standardization and detection of oxydized multi-walled carbon nanotubes in bovine fresh milk through FT-Raman spectroscopy</b>	<b>76</b>
<b>Abstract</b>	<b>76</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>77</b>
<b>2 Material and methods</b>	<b>78</b>
2.1 Standardization and characterization of multi-walled carbon nanotubes	78
2.2 Bovine fresh milk and milk diluted MWCNT FT-Raman acquisition	80
2.3 Linear modeling for MWCNT detection in liquid fresh milk	80
<b>3 Results</b>	<b>80</b>
<b>4 Discussion</b>	<b>84</b>
4.1 Conclusion	88
<b>Acknowledgments</b>	<b>88</b>
<b>Competing Interests</b>	<b>89</b>
<b>References</b>	<b>89</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>Use of carbon nanoparticles and dexamethasone to downregulate inflammatory response in bovine endometrial cells in vitro</b>	<b>93</b>
<b>Abstract</b>	<b>93</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>94</b>
<b>2 Material and methods</b>	<b>95</b>
2.1 Ethical statement	95
2.2 Carbon nanotubes	96
2.3 Endometrial cells primary culture	96
2.4 Endometrial cells phenotyping by immunocytochemistry	97
2.5 Small interfering RNA (siRNA) complexes	98
2.6 Endometrial cell culture treatments	99
2.6.1 MWCNT and lipofectamine as potential endometrial inflammation agents	99
2.6.2 MyD88 gene silencing	99

2.6.3	Fullerol as an anti-inflammatory nanoparticle for endometrial cells	99
2.6.4	Dexamethasone as local anti-inflammatory drug for endometrial cells	100
2.7	RNA extraction and real time RT-qPCR	100
2.8	Statistical analysis	101
<b>3</b>	<b>Results</b>	<b>101</b>
3.1	Endometrial cells phenotyping	101
3.2	MWCNT and lipofectamine as potential endometrial inflammation agents	102
3.3	MyD88 gene silencing	102
3.4	Fullerol as anti-inflammatory nanoparticle for endometrial cells	103
3.5	Dexamethasone as local anti-inflammatory drug for endometrial cells	103
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>108</b>
4.1	Conclusions	112
	<b>Acknowledgments</b>	<b>112</b>
	<b>Competing Interests</b>	<b>113</b>
	<b>References</b>	<b>113</b>

### **CAPÍTULO III**

	<i>In vivo</i> murine model of lipopolysaccharide-induced endometritis to assess local anti-inflammatory effect of fullerol	119
	<b>Abstract</b>	<b>119</b>
<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>120</b>
<b>2</b>	<b>Material and methods</b>	<b>121</b>
2.1	Animals and drugs	121
2.2	Experimental design	121
2.3	Statistical analysis	122
<b>3</b>	<b>Results</b>	<b>123</b>
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>125</b>
4.1	Conclusion	127
	<b>Acknowledgements</b>	<b>127</b>
	<b>Competing Interests</b>	<b>127</b>
	<b>References</b>	<b>127</b>





## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de infecções uterinas em bovinos está diretamente relacionada à queda da eficiência reprodutiva em rebanhos de corte e, principalmente, de leite, com a manutenção de animais subfêrteis e/ou infêrteis no plantel (Sheldon et al., 2008). Em rebanhos leiteiros, infecções uterinas pós-parto representam grande desafio aos criadores, não só pelo aumento do intervalo de partos e menor número de lactações na vida produtiva do animal, mas também pelo elevado custo com tratamento dos animais acometidos, descarte de leite por resíduo de antibióticos, aumento da taxa de serviço e número de doses de sêmen por concepção, além do descarte involuntário de animais (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2008; Martins et al., 2013).

Fatores como retenção de anexos fetais, distocia, partos gemelares, abortamentos, ordem de parto e acentuado desbalanço energético no período de transição são predisponentes à ocorrência de infecções uterinas em fêmeas bovinas (Potter et al., 2010; Sheldon et al., 2019; Pascotinni e LeBlanc, 2020). A imunidade inata uterina desempenha importante papel tanto na restauração da fisiologia uterina normal quanto na defesa do organismo contra microrganismos colonizadores do útero pós-parto. Células endometriais e fagócitos presentes no ambiente uterino reconhecem componentes estruturais de patógenos por meio de receptores de reconhecimento padrão, como por exemplo os receptores tipo-*toll* (TLR). A estimulação de tais receptores, principalmente os TLRs de membrana, acionam o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), uma molécula associada a TLR extremamente importante na ativação da cascata de sinalização intracelular, que resultará na síntese de citocinas e indução de resposta inflamatória com o intuito de eliminar os microrganismos invasores (Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Sheldon et al., 2014). Concomitantemente ao reconhecimento de patógenos, as células endometriais reconhecem componentes celulares que também auxiliam na resposta inflamatória endometrial, com o intuito de promover a reparação tecidual e restaurar a arquitetura e fisiologia do ambiente uterino normal (Healy et al., 2014; Sheldon et al., 2019). Entretanto, a associação entre descamação do epitélio endometrial no pós-parto, presença de elevada carga de bactérias patogênicas ao útero e intenso balanço energético negativo, com redução da capacidade imunológica da vaca, podem resultar em respostas inflamatórias insuficientes ou exacerbadas, que irão caracterizar os quadros agudos de metrite ou crônicos de doenças uterinas, como endometrite citológica (Sheldon et al., 2019; Pascotinni e LeBlanc et al., 2020).

Diversas são as abordagens na tentativa de reduzir a ocorrência dos quadros de infecções uterinas, como as alterações de manejo que visam melhorar a ambiência, conforto, nutrição e imunidade das vacas no pré-parto, e a utilização de fármacos com o intuito de auxiliar na eliminação de patógenos e reduzir a resposta inflamatória exacerbada (Bisinotto et al., 2012; Sheldon et al., 2019). Com o desenvolvimento da nanociência, uma nova classe de materiais vem se destacando no ramo da biologia devido à sua ampla variedade de aplicações em sistemas biológicos.

As nanoestruturas de carbono, em especial os nanotubos de carbono (CNT) e fulerenos, possuem aplicações como biosensores (Liu et al., 2008a), arcabouços para engenharia de tecidos (Dubin et al., 2008; Shimizu et al., 2012), aplicações em engenharia genética, para terapia de doenças e produção de animais transgênicos (Ladeira et al., 2010; Apartsin et al., 2014), atuação como carreadores de fármacos a tecidos específicos (Wong et al., 2013), agente antioxidante (Yang et al., 2014; Pei et al., 2019), anti-inflamatório (Liu et al., 2013; Jin et al., 2017; Xiao et al., 2018) e antimicrobiano (Al-Jumali et al., 2017). No ramo da terapia gênica, os CNT vêm se destacando por sua biocompatibilidade e capacidade de transpor a membrana celular, com o intuito de liberar no citosol pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA). Esses fragmentos são capazes de bloquear a expressão de um determinado gene por meio da destruição específica do seu RNA mensageiro (Ladeira et al., 2010). Dessa forma, os CNT funcionam como vetores de siRNA específicos para o controle da expressão de genes associados a alguma doença ou processo inflamatório. O fullerol  $C_{(60)}OH_{(n)}$ , derivado hidrossolúvel do fulereno, possui como principal característica a capacidade de receber elétrons ou estabilizar espécies reativas de oxigênio (ERO), reduzindo o estresse oxidativo em sistemas biológicos (Xiao et al., 2006). Concomitantemente à redução do estresse oxidativo, o fullerol reduz a resposta inflamatória local, impactando em redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias (Xiao et al., 2018).

Diante das propriedades e da ampla variedade de aplicações de nanopartículas de carbono, principalmente as que objetivam o controle da expressão gênica para terapia de doenças e controle da resposta inflamatória, o uso de nanotubos de carbono como vetores para o silenciamento gênico (Ladeira et al., 2010) e de fullerol como agente antioxidante e anti-inflamatório (Yudoh et al., 2009; Liu et al., 2013; Jin et al., 2017) possui enorme potencial no controle da resposta inflamatória uterina no período pós-parto. Entretanto, a aplicação de nanoestruturas de carbono no organismo da vaca durante o período lactacional levantam questionamentos sobre biodistribuição das nanopartículas no organismo bovino, eliminação residual no leite e conseqüente preocupação com a saúde alimentar em humanos. Até o presente

momento, aplicações de nanotubos de carbono em vacas lactantes e metodologias padronizadas para detecção de concentrações residuais de nanopartículas de carbono em leite *in natura* de vaca, não foram relatadas na literatura. O desenvolvimento de tecnologias capazes de detectar concentrações residuais de contaminantes ou adulterantes no leite se tornam cada vez mais necessárias para atestar as características de qualidade e identidade dos produtos lácteos. Com essa finalidade, a utilização de espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) vem ganhando grande destaque para caracterização de amostras de leite fluido e em pó (Almeida et al., 2011, 2012; Mazurek et al., 2015; Júnior et al., 2016).

O uso de nanopartículas de carbono em bovinos, tanto para avaliação de propriedades terapêuticas como para avaliação de biodistribuição e eliminação via secreções corporais, enfrenta barreiras no âmbito da ética em experimentação animal, disponibilidade de animais para estudo, complexidade na condução experimental e quantidade de material nanoparticulado a ser empregado. Devido à praticidade de manejo, grande disponibilidade de animais, protocolos éticos de experimentação animal e metodologias experimentais bastante consolidadas, modelos murino foram amplamente utilizados para se estudar a biodistribuição de nanopartículas de carbono, em diferentes apresentações de concentração, forma estrutural e funcionalização, após administração por diferentes vias (Ali-Boucetta et al., 2013; Rodriguez-Yañes et al., 2013; Jacobsen et al., 2017). Entretanto nenhum estudo avaliou e relatou ação anti-inflamatória de nanopartículas de carbono no tecido uterino ou acúmulo em tecido mamário.

Dessa forma, o presente estudo foi dividido em três grandes propostas experimentais cujas hipóteses foram: I) A espectroscopia FT-Raman é um método analítico capaz de detectar em leite *in natura* de vaca pequenas diluições de nanotubos de carbono de parede múltipla padronizados para uso biológico; II) O silenciamento gênico da molécula MyD88, por meio de transfecção de células endometriais bovinas com nanotubos de carbono carreando siRNA alvo para MyD88, assim como o uso de fulerol e dexametasona, são capaz de modular a resposta inflamatória endometrial ao lipopolissacarídeo (LPS), reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*; III) o modelo murino de inflamação do trato genital feminino induzida por infusão de LPS via intravaginal, após protocolo de superovulação com eCG e hCG, permite avaliar o efeito anti-inflamatório local do fulerol sobre as diferentes porções do trato reprodutivo.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo avaliar possíveis alternativas de controle da resposta inflamatória endometrial bovina por meio da utilização de nanopartículas de carbono em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, assim como detectar analiticamente diluições de nanotubos de carbono em leite *in natura* de vaca. O primeiro capítulo objetivou avaliar a capacidade da técnica de espectroscopia FT-Raman em detectar, qualitativamente e quantitativamente, diferentes diluições de nanotubos de carbono de parede múltipla (*multi-walled carbono nanotubes - MWCNT*) em leite *in natura* de vaca. O segundo capítulo teve como objetivos: I - silenciar a expressão gênica da molécula MyD88 e, conseqüentemente, reduzir a transcrição de IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL8 em células endometriais bovinas estimuladas *in vitro* por LPS, por meio de RNAi utilizando nanotubos de carbono como agente de transfecção para siRNA; II – Avaliar se fulerol é capaz de modular a resposta inflamatória endometrial, reduzindo a transcrição de IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL8 por células endometriais bovinas estimuladas *in vitro* com LPS; III - Avaliar se dexametasona é capaz de modular a resposta inflamatória endometrial, reduzindo a transcrição de IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL8 por células endometriais bovinas estimuladas *in vitro* com LPS. O terceiro capítulo objetivou desenvolver modelo murino de inflamação do trato genital feminino induzida por LPS, com o intuito de avaliar o efeito anti-inflamatório local do fulerol sobre a resposta inflamatória do trato genital *in vivo*.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Imunidade inata uterina

O sistema reprodutivo da fêmea bovina sofre diversas alterações morfológicas e funcionais sob influência dos esteroides sexuais. Ele deve apresentar um sistema imunológico tolerante à espermatozoides e conceito, e prevenir a instalação de processos infecciosos durante a gestação, no período pós-parto e após a cópula (Lewis, 2003; Dadarwal et al., 2017; Kelly et al., 2019).

Os mecanismos de proteção do trato reprodutivo feminino podem ser divididos em imunidade inata e adquirida. A imunidade inata é caracterizada por ser resposta não-específica, desempenhada por estruturas anatômicas, células e moléculas do organismo. É baseada no reconhecimento de moléculas estruturais em microrganismos (Turner et al., 2012). A imunidade adquirida caracteriza-se por ser resposta mais tardia, desempenhada por células

diferenciadas e moléculas sintetizadas para combater determinado desafio antigênico (Sordillo et al., 2009).

A imunidade inata é considerada como o mecanismo mais importante na manutenção do equilíbrio funcional e higidez do trato reprodutivo feminino, pois é a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores (Sheldon e Dobson, 2004; Herath et al., 2006a). É composta por barreiras anatômicas como vulva, constrição vestibulo-vaginal e cérvix; barreiras fisiológicas como muco e contrações miometriais; células endometriais e imunes; moléculas responsáveis pelo reconhecimento de componentes estruturais de patógenos, por mediadores inflamatórios e por microbiota comensal do trato genital feminino (Sheldon e Dobson, 2004; Turner et al., 2012; Jeon et al., 2015; Moore et al., 2017; Wang et al., 2018). A resposta inflamatória decorrente da ativação da imunidade inata tem como objetivo conter e debelar a infecção do trato genital, estimular o desenvolvimento de imunidade adquirida e, quando necessário, reparar injúrias teciduais decorrentes do processo infeccioso e inflamatório (Sordillo et al., 2009; Sheldon et al., 2014).

### 3.1.1 Endométrio bovino

Após o parto, microrganismos são capaz de migrar pelo trato reprodutivo da vaca e colonizar o útero (Sheldon et al., 2008). Dessa forma, o endométrio possui importante papel na imunidade inata local, representando a primeira barreira uterina contra a invasão microbiana (Turner et al., 2012). O endométrio é composto por camada de epitélio colunar simples secretório, que se sobrepõe ao estroma endometrial. Esse é formado por tecido conjuntivo contendo células estromais, células imunes, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, terminações nervosas e glândulas endometriais formadas por epitélio colunar simples secretório similar ao epitélio luminal (Monteiro et al., 2003; Davies et al., 2008, Dadarwal et al., 2017).

As células epiteliais do endometrio são unidas por meio de fortes junções intercelulares, do tipo *tight-junctions*, que conferem a mucosa característica de barreira física à penetração de microrganismos. As células secretam mucina que recobre toda a superfície epitelial. O muco exerce barreira fisiológica que aprisiona microrganismos em uma fase gel, impedindo-os de alcançar a porção apical das células epiteliais do endométrio (Davies et al., 2008).

O estroma endometrial é composto principalmente por fibroblastos, responsáveis pela síntese de tecido conjuntivo. Funciona como tecido de sustentação ao epitélio, vasos sanguíneos e terminações nervosas, além de abrigar células imunes, como neutrófilos, macrófagos, células Natural Killer (NK) e linfócitos, que estão migrando e patrulhando o endométrio (Dadarwal et

al., 2017). Os neutrófilos são considerados as principais células da linhagem leucocitária na defesa uterina, pois são as primeiras células recrutadas da circulação periférica para o lúmen uterino. Desempenham processos de fagocitose e destruição de microrganismos, síntese e secreção de citocinas, além de gerar exsudato purulento quando da sua degeneração e morte (Sheldon e Dobson, 2004).

Apesar da barreira física epitelial e ação fagocítica de neutrófilos no lúmen uterino, o principal mecanismo utilizado pela imunidade inata no combate à infecção uterina é o reconhecimento em patógenos de componentes estruturais por meio de receptores presentes nas células endometriais, em especial, nas células epiteliais (Herath et al., 2006a; Sheldon et al., 2008).

### 3.1.2 Reconhecimento de microrganismos pelo sistema imune inato

As células que compõem o sistema imune inato uterino devem ser capazes de reconhecer uma ampla variedade de microrganismos que colonizam o útero e direcionar a melhor resposta com o objetivo de debelar o agente infeccioso. O sistema imune inato evoluiu ao ponto de identificar inúmeras moléculas conservadas ao longo do processo evolutivo dos microrganismos. Tais moléculas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), são componentes estruturais essenciais à sobrevivência dos microrganismos e que não são encontradas nas células do organismo animal (Medzhitov e Janeway, 1997). Exemplos de PAMP são o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, o peptidoglicano (PGN) e o ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas, a flagelina constituinte do flagelo e ácidos nucleicos não-metilados de algumas bactérias, dentre diversos outros PAMP (Medzhitov e Janeway, 1997).

A identificação de PAMP é realizada por meio de receptores proteicos, denominados receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Esses estão localizados na superfície da membrana celular ou no interior de endossomos (Medzhitov e Janeway, 1997). Os PRR foram descritos inicialmente por Hashimoto et al. (1988) ao identificarem o gene *Toll* em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. Esse gene está associado à produção de proteínas envolvidas na orientação do eixo dorsoventral durante a embriogênese inicial dessa espécie e na resistência a infecções através da rápida produção de peptídeos antimicrobianos frente a estímulos microbiológicos (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996). O receptor *Toll* é uma proteína transmembrana que possui uma porção externa, com sítios de repetição ricos em leucina e um

domínio citoplasmático homólogo ao da família de receptores de interleucina 1 (IL-1R) de mamíferos, denominado TIR (*Toll-IL-1R module*) (Muzio e Montovani, 2000).

Receptores homólogos ao *Toll* foram descritos em bovinos por Werling e Jungi (2003) e McGuire et al. (2005), sendo atualmente denominados como família de receptores tipo-*Toll*. Dentre os PRRs mais estudados podemos citar os receptores do tipo-*toll* (*Toll-like receptors* – TLR), receptores tipo-NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain like receptors* – NLR), receptores tipo-RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene I like receptors* – RLR) e receptores lecitina tipo-C (*C-type lectin like receptors* – CLR) (Takeuchi e Akira, 2010). Em relação ao reconhecimento de microrganismos no ambiente uterino bovino, os TLR e NLR são os de maior importância e os mais estudados, pois ambos são expressos por todas as células que compõem o endométrio bovino (Herath et al., 2009b; Davies et al., 2008; Sheldon et al., 2014).

### 3.1.3 Receptores tipo *Toll* (TLR)

Os TLR são glicoproteínas integrais de membrana envolvidas na identificação de PAMP. Eles possuem em sua porção N terminal repetições ricas em leucina, flanqueadas por sítios contendo cisteína. Em sua porção interna, possuem um domínio homólogo ao receptor Toll/IL-1 (TIR), essencial para a sinalização intracelular (Takeuchi e Akira, 2010). Em bovinos já foram identificados dez tipos distintos de TLR em diversos tecidos, inclusive no endométrio (McGuire et al., 2005; Davies et al., 2008). A expressão de TLR no endométrio bovino irá depender do tipo celular, da região uterina e da condição reprodutiva em que a fêmea bovina se encontra (Sheldon et al., 2014; Martins et al., 2016).

Vacas cíclicas não-gestantes expressam constitutivamente todos os TLR no endométrio, sendo os TLR 1 ao 7 e 9 expressos por células epiteliais e os TLR 1 ao 4, 6, 7 e 9 expressos por células estromais (Davies et al., 2008). No período pós-parto, todos os TLR também são constitutivamente expressos pelo endométrio bovino, entretanto os TLR 2, 3, 4, 6 e 9 são mais expressos entre 4 e 6 horas pós-parto em áreas carunculares, comparadas às áreas intercarunculares (Sheldon et al., 2009). Vacas com puerpério normal ou que manifestaram algum tipo de infecção uterina, não apresentaram diferença na expressão de TLR 1, 2, 4, 5 e 6 entre 6 e 12 horas após o parto (Martins et al., 2011). Porém, fêmeas com puerpério normal apresentaram elevada expressão de TLR4, 5, 6 e 10 em 14 dias após o parto, decrescendo em até 63 dias pós-parto (Chapwanya et al., 2009). Vacas consideradas inférteis em até 200 dias após o parto, apresentaram elevada expressão de TLR4 em 7 dias pós-parto, com redução da expressão de TLR2 e TLR4 a partir de 21 dias pós-parto, quando comparadas a fêmeas férteis,



que gestaram em até 75 dias após o parto (Herath et al., 2009b). Fêmeas que manifestaram placenta retida apresentaram redução da expressão de TL2 e 4 aos 7 dias pós-parto (Martins et al., 2016). O endométrio bovino apresenta maior expressão de TLR no período pós-parto recente, no qual o útero apresenta maior susceptibilidade à colonização e infecção uterina. Entretanto essa expressão é constitutiva durante todas as fases da vida do animal, indicando ampla capacidade de resposta do endométrio a variada população de microrganismos colonizadores do útero. As informações sobre os TLR expressos no endométrio bovino estão resumidas na Tabela 1.

A estimulação de TLR de membrana plasmática por seus respectivos PAMP induz o domínio citoplasmático TIR a ativar a molécula adaptadora denominada como fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (Takeuchi e Akira, 2010). Essa molécula possui um domínio TIR C-terminal que interage com proteína quinase associada a receptores de IL-1 (IRAKs) que, por sua vez, promove a fosforilação e ativação do fator 6 associado a receptores TNF (TRAF6). TRAF6 ativa um complexo molecular composto por proteína quinase 1 ativada por TGF $\beta$  (TAK1) e proteína de ligação à TAK1 (TAB). Esse complexo ativa duas outras vias de sinalização importantes no processo inflamatório, a via das proteínas quinases associadas a mitógenos (MAPK) (Chapwanya et al., 2009; Takeuchi e Akira, 2010) e a via do fator de transcrição nuclear NF $\kappa$ B (Takeuchi e Akira, 2010; Cronin et al., 2012). A via MAPK é composta por cascata de ativação de proteínas quinases, que resultarão na ativação do fator de transcrição nuclear proteína ativadora 1 (AP1).

Os fatores AP1 e NF $\kappa$ B translocam-se para o núcleo celular, onde se ligam, respectivamente, aos sítios AP1 e  $\kappa$ B das regiões promotoras de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), quimiocinas (CXCL8, CXCL5, CCL2 e CCL5) (Yunhe et al., 2013; Sheldon et al., 2014), mucina (MUC1), peptídeos antimicrobianos (peptídeos antimicrobianos lingual e traqueal – LAP e TAP),  $\beta$ -defensinas (BNBD4 e DEFB5) (Davies et al., 2008; Martins et al., 2011), proteínas de ligação ao cálcio (S100A8, S100A9 e S100A12), metaloproteinases (MMP1, 3, 9 e 13) (Swangchan-Uthai et al., 2012), enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Herath et al., 2006a), fosfolipases A2 (PLA2), cicloxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina endoperóxido E sintase (PGES) (Herath et al., 2009a; Koh et al., 2018).

Tabela 1. Receptores tipo *Toll* com respectivas localizações, ligantes e suas origens, e expressão no útero bovino.

<b>Receptor tipo-<i>Toll</i></b>	<b>Localização</b>	<b>Ligante (PAMP)</b>	<b>Origem</b>	<b>Expressão uterina</b>
<b>TLR1</b>	Membrana plasmática de células epiteliais e estromais	Lipoproteínas triacetiladas	Bactérias gram +, vírus e protozoários	Não gestante; Pós-parto tardio.
<b>TLR2</b>	Membrana plasmática de células epiteliais e estromais	Ácido lipoteicóico, peptidoglicano e lipoproteínas	Bactérias gram +	Não gestante; Pós-parto tardio; Caruncular pós-parto recente (4-6 h); Elevada em animais inférteis aos 7dpp; Redução aos 7dpp com RP.
<b>TLR3</b>	Membrana endossomal de células epiteliais e estromais	dsRNA	Vírus	Não gestante; Pós-parto tardio; Caruncular pós-parto recente (4-6 h);
<b>TLR4</b>	Membrana plasmática e endossomal de células epiteliais e estromais	Lipopolissacarídeo e glicoproteína de envelope	Bactérias gram - e vírus	Não gestante; Pós-parto tardio; Caruncular pós-parto recente (4-6 h); Elevada em animais inférteis aos 7dpp; Redução aos 7dpp com RP.
<b>TLR5</b>	Membrana plasmática de células epiteliais	Flagelina	Bactérias flageladas	Não gestante; Pós-parto tardio.
<b>TLR6</b>	Membrana plasmática de células epiteliais e estromais	Lipoproteínas diacetiladas	Bactérias gram +	Não gestante; Pós-parto tardio; Caruncular pós-parto recente (4-6 h);
<b>TLR7</b>	Membrana endossomal de células epiteliais e estromais	ssRNA	Vírus	Não gestante; Pós-parto tardio.
<b>TLR8</b>	Membrana endossomal, sem definição de tipo celular	ssRNA	Vírus	Não gestante; Pós-parto tardio.
<b>TLR9</b>	Membrana endossomal de células epiteliais e estromais	DNA não-metilado rico em CpG	Bactérias e vírus	Não gestante; Pós-parto tardio; Caruncular pós-parto recente (4-6 h);;
<b>TLR10</b>	Membrana plasmática de células estromais	Peptidoglicano e lipoproteínas	Bactérias	Não gestante; Pós-parto tardio.

Abreviações: dsRNA = RNA de fita dupla; ssRNA = RNA de fita simples; G- = Gram-negativas; G+ = Gram-positivas; dpp = dias pós-parto; RP = retenção de placenta. Animais inférteis são considerados aqueles que apresentam algum processo inflamatório endometrial crônico e que não se tornaram gestantes após liberação para a reprodução. Fonte: McGuire et al., 2005; Davies et al., 2008; Sheldon et al., 2009; 2014; Seabury et al., 2010; Martins et al., 2011, 2016.

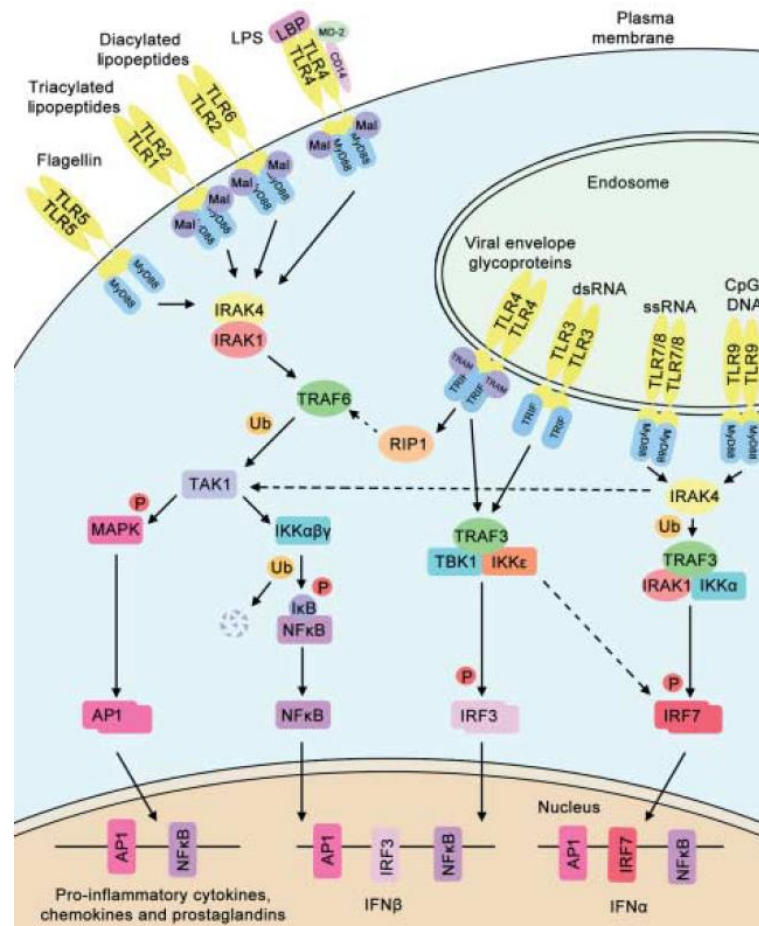


Figura 1. Esquema ilustrando cascatas de sinalização intracelular e seus produtos após estimulação de TLRs por seus respectivos ligantes (Sheldon et al., 2014).

A estimulação de TLR7, 8 e 9 induz a produção de interferons do tipo I (INF-I), por via dependente da molécula MyD88, e outras citocinas pela via do NFκB. A molécula de MyD88 forma um complexo com IRAK, TRAF3 e IκB proteína quinase (IKK) para fosforilação do fator de regulação de interferon 7 (IRF7) que é translocado ao núcleo para ativar a transcrição de genes codificadores de INF-I, principalmente INF-α (Takeuchi e Akira, 2010; Sheldon et al., 2014). A estimulação de TLR3 e TLR4 nos endossomos ativa via de sinalização dependente de domínio TIR contendo proteína adaptadora indutora de interferon β (TRIF) e molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) para o TLR4. TRIF associa-se a TRAF3, que por sua vez, ativam duas IKKs. Essas IKKs fosforizam IRF3 e IRF7, que juntos são translocados para o núcleo celular e ativam a transcrição de genes codificadores de INF-I, principalmente INF-α e INF-β (Takeuchi e Akira, 2010; Sheldon et al., 2014). Em quadros de infecção viral, INF-α e INF-β, sintetizados e secretados pelas células infectadas, possuem importante efeito inibidor da replicação viral em células adjacentes (Abbas et al., 2012).

### 3.1.4 Receptores tipo-NOD (NLR)

Os NLR são receptores citosólicos compostos por um domínio central de ligação a nucleotídeos, uma porção C-terminal com repetições ricas em leucina e uma porção N terminal efetora, que abriga sítios de ligação proteica, como domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD), domínio de pirina e domínio de proteína de baculovírus inibidora de apoptose (BIR) (Takeuchi e Akira, 2010). Dentre tais domínios efetores, o CARD é considerado o mais importante. Por essa razão, os NLR também são denominados de receptores tipo-CARD ou NLRC. NLR que possuem domínios efetores de pirina e BIR não estão envolvidos na ativação de mediadores inflamatórios, porém são componentes do complexo proteico ativador de caspase-1, denominado inflamossomo (Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012).

Os receptores NOD1 e NOD2 possuem, respectivamente, domínios efetores denominados CARD4 e CARD15. O NOD1 reconhece D- $\gamma$ -glutamil ácido diaminopimélico (DAPA) de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, enquanto NOD2 reconhece dipeptídeos muramil de todos os PGN, além de ssRNA virais (Shaw et al., 2008; Takeuchi e Akira, 2010). O NLRP3 reconhece cristais de ácido úrico e citolisinas dependentes de colesterol enquanto NLRC4 reconhece flagelina e proteínas do sistema de secreção do tipo III de bactérias (Sheldon et al., 2014). A estimulação de NLR, sinergicamente com a estimulação de TLR, ativam cascatas de sinalização com liberação de NF $\kappa$ B para translocação nuclear e transcrição de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, peptídeos antimicrobianos, além de ativar o complexo proteico inflamossomo. Esse complexo é importante na resposta inflamatória, pois ativa caspases (1 e 4), enzimas responsáveis por transformarem as pró-citocinas IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 em citocinas ativas (Davis et al., 2011; Turner et al., 2012).

Informações sobre a expressão de NLR no endométrio bovino são escassas na literatura. A maioria se baseia no conhecimento descrito anteriormente, com expressão de receptores NLR em leucócitos provenientes da circulação periférica, infiltrados no endométrio inflamado (Turner et al., 2012). Recentemente, Kelly et al. (2019) pesquisaram a expressão e secreção de IL-1 $\beta$  via formação de inflamossomo e ativação de caspase, por meio da estimulação de NLR (NLRP3) por LPS e nigericina. Os autores verificaram que as células epiteliais e estromais do endométrio bovino expressam NLRP3 constitutivamente. Após a estimulação por LPS e nigericina, a ativação de NLRP3 resulta em produção considerável de IL-1 $\beta$  ativa pelas células endometriais. Entretanto, foi verificado que as células epiteliais e estromais, com ou sem estimulação por ligantes, não expressam RNAm para caspase-1, mas sim para caspase-4. Esse resultado sugere que a síntese e secreção de IL-1 $\beta$  ativa pelo endométrio bovino, decorrente da

estimulação de NLRP3, seja dependente da formação do complexo inflamossomo-caspase 4 e não caspase-1 como ocorre em leucócitos provenientes de sangue periférico (Kelly et al., 2019).

### 3.1.5 Receptores tipo-RIG-I (RLR)

Os RLR são receptores citosólicos que reconhecem RNAs de fita dupla ou simples. São capazes de reconhecer vírus cujo genoma é composto por RNA e transcritos de vírus cujo genoma é composto por DNA. Logo, tais receptores exercem importante papel na resposta imune contra vírus (Turner et al., 2012). Os dois RLR mais estudados são o RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) e o MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*). Ambos possuem dois domínios de recrutamento de caspases em suas porções N-terminal e um domínio RNA-helicase. Após reconhecimento de RNA, os RLR iniciam cascatas de sinalização com ativação final de fatores de transcrição IRF3 e IRF7, cujo objetivo final é a indução da produção de INF-I. Além da ativação de fatores de regulação de interferons, a estimulação de RLR pode desencadear cascatas de sinalização com ativação final do fator de transcrição NFκB, dependendo do agente ligante ao receptor (Abbas et al., 2012).

Apesar do papel dos RLR em infecções uterinas em bovinos não ser totalmente elucidado, eles merecem considerável atenção, pois infecções virais por Herpesvírus Bovino tipo 4 (BoHV-4) e vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) estão associadas a quadros de infertilidade e aborto em vacas (Donofrio et al., 2010; Carneiro et al., 2017). O BoHV-4 possui tropismo pelas células estromais do endométrio, nas quais a estimulação resulta na ativação de resposta inflamatória com produção de CXCL8 (Donofrio et al., 2010). Estudo de Carneiro et al. (2017) demonstrou que células endometriais respondem ao estímulo viral de BoHV-4 e BVDV por meio de mecanismos que associam a ativação conjunta de receptores RIG-I e TLR3. Segundo os mesmos autores, a indução da expressão de receptores RIG-I em células estromais, por estimulação com BoHV-4, é dependente da estimulação de TLR3 por PAMP viral. Enquanto isso, a estimulação de células estromais com BVDV não induziu aumento na expressão de RIG-I, o que sugere que a resposta inflamatória a esse vírus é dependente de outros mecanismos, como por exemplo, a ativação de TLR3. Células epiteliais e estromais do endométrio, quando cultivadas sob estimulação de BoHV-4, acumularam maiores concentrações de CXCL8, enquanto houve redução do acúmulo de IL-6 por células epiteliais. Já sob estimulação de BVDV, células endometriais secretaram IL-6, enquanto apenas as células estromais secretaram CXCL-8 (Carneiro et al., 2017).

### 3.1.6 Receptores lecitina tipo-C (CLR)

Os CLR são proteínas integrais de membrana presentes em fagócitos e células dendríticas, mas também se apresentam como proteínas solúveis presentes no plasma sanguíneo. São responsáveis por reconhecerem carboidratos na superfície de microrganismos, facilitando, assim, o processo de fagocitose. São receptores que possuem domínios conservados que reconhecem e se ligam a carboidratos na dependência de íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), por isso denominados lecitina tipo-C (Abbas et al., 2012).

A lecitina de ligação à manose (*mannose binding lectin* – MBL) está presente na circulação e é capaz de reconhecer carboidratos de manose e frutose, levando à ativação do sistema complemento via lecitina, o que resulta em produtos da degradação do complemento com função quimiotática e ativadora de neutrófilos e macrófagos, além de opsonização dos microrganismos (Abbas et al., 2012; Turner et al., 2012). Como CLR de membrana celular podemos citar as dectinas e receptores de manose. A Dectina-1 é o receptor mais estudado dos CLR por ser expresso, principalmente, em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Sua principal característica é reconhecer polímeros de glicose na superfície da parede celular de alguns fungos, como *Candida albicans* (Turner et al., 2012).

### 3.1.7 Padrões moleculares associados a dano celular (DAMP)

Os DAMP são moléculas endógenas presentes no interior das células do organismo ou constituintes da matriz extracelular, que são liberadas no compartimento extracelular quando ocorre injúria tecidual (Chen e Nuñez, 2010; Healy et al., 2014). A exposição do conteúdo celular ou a degradação da matriz extracelular permite com que DAMP sejam reconhecidos pelos mesmos PRR que reconhecem PAMP, resultando em indução de resposta inflamatória local. Essa resposta pode ocorrer na presença de microrganismos patogênicos, responsáveis pela injúria tecidual, ou em sua ausência, como resultado de isquemia e necrose tecidual. Nesse último caso, a inflamação é denominada de inflamação estéril (Chen e Nuñez, 2010).

Diversas são as moléculas endógenas capazes de estimular inflamação via PRR. Dentre as mais estudadas podemos citar HMGB1 (*High Mobility Group Box-1*), ácidos nucleicos, ATP, proteínas do choque térmico (HSP), cristais de ácido úrico, proteínas de ligação ao cálcio S100 e  $\text{IL1}\alpha$ , que são de origem intracelular. Dentre os de origem extracelular, oriundos da degradação da matriz extracelular, temos o ácido hialurônico e proteoglicanos (Chen e Nuñez, 2010; Healy et al., 2014; Sheldon et al., 2019). O endométrio bovino é capaz de reconhecer

DAMP via estimulação de TLR. As células endometriais bovinas reconhecem ácido hialurônico por meio de sua ligação com o TLR2 ou TLR4. Já o HMGB1 é reconhecido por TLR9, uma vez que é uma proteína ligada à cromatina (Healy et al., 2014). A estimulação de TLR por DAMP resulta na transcrição e secreção de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8, com o objetivo de atrair fagócitos, debelar o agente estressor e promover a reparação tecidual. Funciona para o organismo como um sistema de alarme contra danos teciduais (Healy et al., 2014; Sheldon et al., 2019).

Além dos TLR, os NLR também parecem estar envolvidos no reconhecimento de DAMP e desencadeamento de inflamação estéril. Um exemplo disso é a ativação do complexo inflamossomo NLRP3 dependente de caspase. NLRP3 é ativado indiretamente por maior aporte intracelular de ATP, por desestabilização de membranas lisossomais ou pelo estresse oxidativo decorrente de elevada concentração de espécies reativas de oxigênio no meio extracelular (Chen e Nuñez, 2010). No endométrio bovino, entretanto, a estimulação de NLRP3 induz a produção de IL-1 $\beta$  ativa, via ativação de caspase-4 (Kelly et al., 2019).

Apesar de reconhecer diversos DAMP por meio da estimulação de TLR, as células epiteliais e estromais do endométrio bovino reconhecem IL-1 $\alpha$  como principal sensor endógeno de dano tecidual (Healy et al., 2014). A IL-1 $\alpha$  é reconhecida via seu receptor IL-1R1 e MyD88. A IL-1 $\alpha$  é sintetizada e acumulada no interior das células endometriais via estimulação de TLR. Porém, ela só é liberada para o meio extracelular quando há lesão tecidual (Healy et al., 2014). A IL-1 $\alpha$  estimula a produção de IL-6 e CXCL8 pelas células endometriais. Com base nisso, além de DAMP, a IL-1 $\alpha$  funciona como amplificador da resposta inflamatória endometrial, principalmente quando há reconhecimento de patógeno intrauterino seguido por dano endometrial. Em fêmeas bovinas esse quadro associativo é extremamente comum no período pós-parto. Nesse período há lesão tecidual decorrente do parto e infecção uterina por patógenos com elevado potencial inflamatório e deletério ao tecido endometrial, como é o caso da *T. pyogenes* (Healy et al., 2014; Sheldon et al., 2019).

### 3.1.8 Resposta endometrial ao reconhecimento de patógenos

A resposta endometrial à colonização uterina por microrganismos é caracterizada por processo inflamatório em resposta à estimulação dos PRRs. A estimulação de tais receptores leva ao aumento da transcrição de genes codificadores e secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, INF- $\gamma$ , quimiocinas CXCL8, CXCL5, CCL2 e CCL5, enzimas iNOS, COX-2 e lipoxigenase, com produção de prostaglandinas e leucotrienos, além

da síntese de peptídeos antimicrobianos e proteínas de fase aguda (Herath et al., 2009ab; Sheldon et al., 2014).

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são extremamente importantes na resposta inflamatória do endométrio bovino, pois atuam em células adjacentes, estimulando a síntese de citocina IL-6, quimiocinas CXCL5, CXCL8, CCL2 e CCL5 e enzimas iNOS e COX-2, amplificando a resposta inflamatória (Koh et al., 2018). Atuam também sobre células endoteliais de capilares sanguíneos, promovendo dilatação e aumento da permeabilidade capilar, aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, como selectinas e integrinas, tornando tais células mais aderentes aos neutrófilos e monócitos (Dinarello, 1994; Galvão et al., 2011; Abbas et al., 2012). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 são responsáveis pela ativação de neutrófilos e monócitos da corrente circulatória, aumentando sua capacidade fagocítica e destruição de patógenos (Galvão et al., 2011). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 atuam sobre as células endometriais estimulando a produção de peptídeos antimicrobianos como peptídeo antimicrobiano lingual (LAP), peptídeo antimicrobiano traqueal (TAP),  $\beta$ -defensina neutrofílica bovina 4 (BNBD4),  $\beta$ -defensina 5 (DEFB5) e proteínas de ligação ao cálcio da família S100 (Davies et al., 2008; Martins et al., 2011; Swangchan-Uthai et al., 2012). Ainda sobre o próprio tecido endometrial e sobre o fígado, tais citocinas estimulam a transcrição e produção de proteínas de fase aguda como haptoglobina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e proteína amiloide sérica A (SAA3), responsáveis por auxiliarem na reparação tecidual durante e após a resolução do processo inflamatório endometrial (Williams et al., 2007; Davies et al., 2008; Chapwanya et al., 2009; Turner et al., 2014).

Vacas acometidas por processos infecciosos uterinos no pós-parto apresentam elevação de transcritos para TNF- $\alpha$  em biópsias endometriais (Herath et al., 2006a). Entretanto, concentrações significativas de TNF- $\alpha$  não foram detectadas em sobrenadantes de cultivo celular (Herath et al., 2006a; Sheldon e Roberts, 2010; Swangchan-Uthai et al., 2012) ou na corrente circulatória de animais com infecção uterina (Williams et al., 2007). Galvão et al. (2011) observaram, em biópsias endometriais de vacas acometidas por endometrite, redução na transcrição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em 7 dias pós-parto, com posterior elevação entre 21 e 28 dias após o parto. Segundo Gabler et al. (2010), a expressão de transcritos para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 varia com a evolução do período puerperal, sendo máxima aos 17 dias pós-parto e decaindo para níveis normais no 31º dia após o parto. Células endometriais bovinas, estimuladas por diferentes PAMP, expressam mais transcritos de IL-1 $\beta$  e IL-6 e acumulam maiores concentrações dessas citocinas em sobrenadantes de cultivo celular e de explantes endometriais (Borges et al., 2012; Amos et al., 2014). Células endometriais de animais acometidos por quadro de endometrite citológica e considerados inférteis apresentaram maior expressão de



transcritos para IL-1 $\beta$  e IL-6 dentro de sete dias pós-parto, quando comparados a animais saudáveis (Herath et al. 2009b).

As quimiocinas são produtos celulares, homólogos estruturalmente às citocinas, cuja principal função é estimular e regular a movimentação de leucócitos da corrente circulatória para os tecidos onde são produzidas (Abbas et al., 2012). As principais quimiocinas secretadas pelas células endometriais, após estimulação por citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são CXCL8 e CXCL5, responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos, e CCL2 e CCL5, responsáveis pela atração de monócitos e macrófagos, respectivamente, ao sítio de infecção (Gabler et al., 2010; Swangchan-Uthai et al., 2012; Koh et al., 2018). As quimiocinas, além de orientarem a movimentação de leucócitos por meio de um gradiente de concentração, que se eleva quanto mais próximo ao tecido inflamado, aumentam a capacidade de adesão dos leucócitos ao endotélio vascular, estimulam a liberação de grânulos citoplasmáticos e aumentam a capacidade de explosão oxidativa, elevando assim o potencial de destruição de microrganismos (Abbas et al., 2012; Turner et al., 2014). Assim como para as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, Gabler et al. (2010) observaram maior expressão de transcrito para CXCL8 em biópsias endometriais de fêmeas primíparas aos 17 dias pós-parto, reduzindo até 31 dias pós-parto. Vacas diagnosticadas com endometrite citológica também apresentaram maior expressão de transcrito para CXCL8 no endométrio (Fischer et al., 2010). Em experimento com cultivo de células endometriais estimuladas com LPS, Swangchan-Uthai et al. (2012) observaram aumento de transcritos para CXCL5 e CXCL8, e Koh et al. (2018) verificaram aumento de transcritos para CXCL5, CXCL8, CCL2 e CCL5. Já em experimento utilizando explantes endometriais *in vitro*, Borges et al. (2012) observaram maior produção de CXCL8 em resposta à estimulação por *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, LPS, PAM3 e flagelina.

As prostaglandinas são lipídeos vasoativos oriundos da transformação de fosfolipídios da membrana celular em ácido araquidônico, pela ação de fosfolipase (PLA2) e cicloxigenase (COX-2). As principais prostaglandinas sintetizadas pelo endométrio em processos infecciosos do útero são as prostaglandinas F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) e E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Herath et al., 2009a). A PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  atua sobre a musculatura lisa miometrial e de artérias, provocando contrações miometriais e constrição de vasos sanguíneos, promove luteólise e estimula a produção de citocinas que irão induzir a síntese de leucotrieno B<sub>4</sub> (LB<sub>4</sub>). O LB<sub>4</sub> é um lipídeo vasoativo resultante da ação de lipoxigenases sobre o ácido araquidônico e que possui função quimiotática e de ativação de neutrófilos (Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2007; Herath et al., 2009a). Já a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) possui ações luteotrófica e imunossupressora, reduzindo a capacidade fagocítica de neutrófilos (Sheldon et al., 2014).

Durante os sete primeiros dias pós-parto a concentração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se encontra elevada no organismo da fêmea bovina, e decresce até o 15º pós-parto associado à elevação da concentração plasmática de progesterona (Kozicki, 1998). Porém, animais que apresentam infecções uterinas pós-parto, por bactérias Gram-negativas, possuem maiores concentrações de  $\text{PGE}_2$  na corrente circulatória (Herath et al., 2006a). Células epiteliais do endométrio, cultivadas *in vitro* e sob estimulação de LPS, sintetizam ambas as prostaglandinas, porém, acumulam maior concentração de  $\text{PGE}_2$  no sobrenadante quando comparado à concentração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Herath et al., 2009a). MacKintosh et al. (2013) observaram que cultura de células epiteliais polarizadas, estimuladas com ocitocina e ácido araquidônico, acumularam maiores concentrações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no compartimento baso-lateral, enquanto a estimulação com LPS resultou em maior acúmulo de  $\text{PGE}_2$  no mesmo compartimento. Esse mecanismo de secreção vetorial de prostaglandinas corrobora com a fisiologia de transporte de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do endométrio ao ovário, durante o processo de luteólise e com o efeito luteotrófico da  $\text{PGE}_2$  sobre o corpo lúteo em quadros de infecção uterina por bactérias Gram-negativas (Herath et al., 2006a; MacKintosh et al., 2013).

Peptídeos antimicrobianos são moléculas catiônicas de estrutura anfipática, cuja região hidrofóbica é capaz de se inserir na estrutura lipídica da membrana plasmática, enquanto a região hidrofílica é responsável pela formação de poros ou, simplesmente, recobrir a membrana, resultando em morte microbiana devido à ruptura da membrana celular. São moléculas normalmente sintetizadas e secretadas pelas células epiteliais do endométrio, neutrófilos e macrófagos e interagem diretamente com fosfolípidios microbianos e outras estruturas da parede celular bacteriana (Abbas et al., 2012). Dentre os peptídeos microbianos produzidos pelo epitélio endometrial de fêmeas bovinas podemos citar  $\beta$ -defensinas bovinas BBD19, BBD123 e BBD124 (Davies et al., 2008),  $\beta$ -defensinas BNBD4 e DEFB5, LAP, TAP, MUC1 (Davies et al., 2008; Chapwanya et al., 2009; Martins et al., 2011) e proteínas de ligação ao cálcio da família S100 (Swangchan-Uthai et al., 2012).

A mucina é uma glicoproteína sintetizada no endométrio apenas por células epiteliais, cuja função é aprisionar microrganismos e, junto com as junções celulares do epitélio endometrial, evitar a penetração de patógenos no endométrio (Davies et al., 2008). Transcritos para MUC1 são constitutivamente expressos em células epiteliais do endométrio, porém, estas apresentam menor expressão quando cultivadas sob estimulação com progesterona. Entretanto, a expressão de MUC1 se eleva após estimulação com LPS, independente da coestimulação ou não por progesterona (Davies et al., 2008).

Em estudo *in vitro*, genes para  $\beta$ -defensinas BBD123, BNBD4 e DEFB5 foram expressos constitutivamente por células epiteliais do endométrio, enquanto os peptídeos antimicrobianos LAP e TAP foram expressos tanto por células epiteliais quanto estromais (Davies et al., 2008). Aumento na expressão de genes codificadores de tais peptídeos antimicrobianos foram observados quando células epiteliais foram estimuladas com LPS, o que não foi observado nas células estromais. Quando estimuladas por lipopeptídios acetilados, células epiteliais não alteraram a expressão de peptídeos antimicrobianos, porém, as células estromais reduziram expressão de LAP e aumentaram expressão de TAP (Davies et al., 2008). Já em estudos *in vivo*, utilizando vacas no pós-parto, Chapwanya et al. (2009) observaram maior produção de transcritos para DEFB5 e TAP pelo endométrio bovino em duas semanas pós-parto, enquanto Martins et al. (2011) observaram semelhante expressão constitutiva de DEFB5 entre 6 e 12 horas após o parto, entre vacas com puerpério normal e, também, em vacas que apresentaram retenção de placenta e posterior quadro de infecção uterina.

As proteínas de ligação ao íon cálcio da família S100 são responsáveis por regularem diversos mecanismos extra e intracelulares. Dentre tais mecanismos podemos citar a regulação de enzimas como NADPH oxidase, regulação do citoesqueleto durante processo de fagocitose, regulação do metabolismo do ácido araquidônico, além de induzir a síntese de TNF- $\alpha$  e metaloproteinases. Todos esses processos possuem importante papel durante processos inflamatórios e reparação tecidual do endométrio (Swangchan-Uthai et al., 2012). Em experimento avaliando a resposta de células endometriais à estimulação por LPS, Swangchan-Uthai et al. (2012) observaram que células endometriais expressam constitutivamente transcritos para as proteínas de ligação ao cálcio S100A8, S100A9 e S100A12 e que tal expressão se eleva em resposta ao estímulo com LPS.

### 3.1.9 Relação entre hormônios esteroides sexuais e resposta imune inata uterina

Acredita-se que hormônios esteroides sexuais, como estrógeno e progesterona, desempenham importante papel sobre a modulação da resposta imune inata no útero, uma vez que as fases luteal e folicular do ciclo estral da vaca estão associadas, respectivamente, à maior e menor susceptibilidade uterina às infecções bacterianas (Lewis, 2003; Herath et al., 2006b).

A indução de infecção uterina por meio da infusão intrauterina de *E. coli* e *T. pyogenes* em vacas de corte foi limitada durante o estro ou enquanto a concentração de progesterona era basal. Porém, a infusão durante o diestro ou após administração exógena de progesterona, predis põe o útero ao estabelecimento de infecção (Lewis, 2003). Tal predisposição se deve ao

efeito imunossupressor da progesterona sobre o sistema imune inato uterino. A progesterona é associada à redução da capacidade fagocítica de neutrófilos intrauterinos e redução da síntese de eicosanoides envolvidos na resposta inflamatória local (Lewis, 2003; Herath et al., 2006a).

Glicocorticoides são hormônios esteroides capazes de regular o sistema imune inato, principalmente por meio de bloqueio da sinalização celular via AP1 e NF $\kappa$ B (Ogawa et al., 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que células epiteliais e estromais do endométrio bovino, pré-sensibilizadas com dexametasona e estimuladas por lipopeptídeos ou LPS, apresentaram menor expressão de transcritos e produção de citocinas pró-inflamatórias (Saut et al., 2014; Turner et al., 2014). Entretanto, quando explantes endometriais de fêmeas bovinas, em diferentes fases do ciclo estral, foram estimulados com LPS, apresentaram aumento na expressão de transcritos e acúmulo de citocinas para IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL8, sem diferença significativa na resposta inflamatória entre as fases (Borges et al., 2012; Saut et al., 2014). Fischer et al. (2010), entretanto, observaram maior expressão de transcritos para IL-1 $\beta$  e CXCL8 em fragmentos endometriais de vacas abatidas em fase folicular, pré-ovulatória, quando comparada às abatidas em fase luteal.

### **3.2 Puerpério fisiológico**

O puerpério é o período que se inicia logo após a expulsão do feto e se estende até a primeira ovulação de oócito fértil, compatível com a manutenção de gestação pelo trato reprodutivo fisiologicamente restaurado (Senger et al., 2003). Durante esse período devem ocorrer contrações miometriais, expulsão dos anexos fetais e lóquio, involução uterina, reparação endometrial, retorno da função ovariana e eliminação da contaminação bacteriana do trato reprodutivo (Sheldon et al., 2019).

O parto é dividido em três fases, sendo elas: I) o início das contrações miometriais; II) expulsão do feto; e III) expulsão das membranas fetais (Senger, 2003). Para que haja a eliminação das membranas fetais logo no início do puerpério é necessário que ocorra adequada maturação dos placentomas. A maturação tem início com o aumento da expressão de complexo principal de histocompatibilidade-II (MHC-II) e apresentação de peptídeos MHC-I por células apresentadoras de antígeno maternas nas criptas carunculares. Esse processo ativa a resposta imune endometrial, com ativação de células Th1 e macrófagos, e produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, CXCL-2, CXCL-8) e metaloproteinases (MMP2, MMP9) (Attupuran et al., 2016). Como resultado, tem-se o aumento de apoptose de células epiteliais trofoblásticas e endometriais, influxo de leucócitos para os placentomas e

remodelação da matriz extracelular (Martins et al., 2004; Dobson-Hill, 2009). A interrupção abrupta do fluxo sanguíneo para os cotilédones fetais após o parto e a remodelação da matriz extracelular dos placentomas, permite o encolhimento e o colapso das vilosidades coriônicas, que associados às contrações miométriais, promovem a distorção dos placentomas e a separação das membranas fetais das criptas carunculares (Attupuran et al., 2016).

Após a expulsão das membranas fetais, as contrações miométriais reduzem de intensidade, porém aumentam em frequência, visando a eliminação do lóquio e redução das fibras musculares do miométrio. Além da redução da massa muscular, deve ocorrer a redução da vascularização e fluxo sanguíneo ao útero, remodelação caruncular e reepitelização do endométrio nas regiões carunculares e intercarunculares (Dobson-Hill, 2009). A redução do tamanho uterino é rápida até o décimo quinto dia pós-parto, lenta até o trigésimo, e imperceptível até o quinquagésimo dia após o parto (Gier e Marion, 1968; Martins, 2010). A região intercaruncular não apresenta muitos danos decorrentes do parto, apresentado reepitelização completa no oitavo dia após o parto. Já as áreas carunculares sofrem diversas alterações após a expulsão das membranas fetais. No segundo dia pós-parto, as carúnculas apresentam áreas de necrose próximo a vasos carunculares e proliferação de fibroblastos na tentativa de estenosar vasos sanguíneos. Do quinto ao décimo quinto dia pós-parto ocorre descamação de tecido necrótico que recobre as carúnculas e parte do endométrio, com liberação de pequenos vasos sanguíneos e extravasamento de sangue. Após a eliminação de tecido necrótico tem-se o início da reepitelização caruncular, que se inicia das bordas em direção ao centro e perdura por até 25 a 30 dias após o parto (Sheldon et al., 2008; Dadarwal et al., 2017). Porém nesse período, as carúnculas ainda possuem grande diâmetro, retornando ao tamanho normal por volta dos 40 a 60 dias após o parto (Dobson-Hill, 2009).

Os processos de apoptose e descamação do epitélio e do tecido necrótico caruncular, no período pós-parto, promovem a liberação de DAMP, com destaque para a IL-1 $\alpha$  em bovinos (Healy et al., 2014). A liberação de IL-1 $\alpha$  no lúmen uterino, associada a presença de microrganismos colonizadores do útero, estimulam receptores de reconhecimento padrão (PRR) nas células epiteliais e estromais do endométrio. A estimulação de tais receptores ativa a resposta inflamatória endometrial fisiológica com o intuito de atrair fagócitos, remover debris celulares, fagocitar e eliminar patógenos, além de promover a remodelação e reparação tecidual do endométrio (Sheldon et al., 2019). Fisiologicamente, a eliminação da colonização bacteriana ocorre dentro de três a quatro semanas em animais com o puerpério normal, e a involução uterina completa dentro de 40 a 60 dias pós-parto (Sheldon et al., 2008).

Durante o puerpério fisiológico, concomitante ao processo de involução uterina, deve ocorrer o retorno da atividade ovariana luteal cíclica (RAOLC) (Sheldon et al., 2019). Ao final da gestação e após o parto, a hipófise ainda é refratária à ação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Para que ocorra o RAOLC, é necessário o restabelecimento da sensibilidade hipofisária ao GnRH, liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) para novo recrutamento folicular pós-parto e elevação da secreção de hormônio luteinizante (LH), indutor do crescimento final e ovulação do folículo dominante (Martins, 2010). Fatores determinantes para o rápido RAOLC são a adequada condição corporal que a fêmea bovina se encontra no momento do parto e a menor intensidade do balanço energético negativo enfrentada pela vaca após o parto (Butler et al., 2003; Diskin et al., 2003). Quanto menor for a intensidade do balanço energético negativo e mais eficiente for o sistema imune inato uterino em eliminar a colonização bacteriana no pós-parto, mais rápido serão os processos de involução uterina e retorno da atividade ovariana no pós-parto (Sheldon et al., 2019).

### **3.3 Fatores predisponentes a ocorrência de infecções uterinas pós-parto**

São considerados fatores predisponentes a ocorrência de infecções uterinas: quadros de retenção de membranas fetais, partos gemelares, distocia, natimortos, ordem de parto (primíparas e acima de três partos) e fatores nutricionais e metabólicos (Sheldon et al., 2008; 2019; Potter et al., 2010; Bromfield et al., 2015). Normalmente, durante o parto ocorrem lesões no epitélio endometrial, com exposição da camada subepitelial e comprometimento da barreira física frente aos microrganismos colonizadores do útero. A ocorrência de retenção de membranas fetais após o parto também resulta em lesões do epitélio endometrial caruncular, com exposição do estroma endometrial e acúmulo de material necrótico e séptico no interior do útero pós-parto (Sheldon et al., 2019). A ocorrência de partos distócicos, partos gemelares, abortamentos e natimortos, além de causarem lesões ao próprio epitélio endometrial, invariavelmente resultam em retenção dos anexos fetais no pós-parto, constituindo importantes fatores predisponentes à colonização e infecção uterina. A ordem de parto também está associada à maior ocorrência de infecções uterinas. Fêmeas primíparas são mais propensas a ocorrência de partos distócicos por incompatibilidade feto-pélvica. Já fêmeas em terceira ordem de parto ou mais possuem maior probabilidade de reterem anexos fetais após o parto, principalmente se sob influência de balanço energético negativo acentuado (Bromfield et al., 2015).

Alterações homeorréticas são necessárias para adaptar, hormonal e metabolicamente, o organismo da vaca para atendimento da nova demanda lactacional. Diante do baixo consumo experimentado no período periparto, alta demanda energética para produção de leite, e o quadro de resistência periférica à insulina, com baixa disponibilidade de glicose para os tecidos corporais, o organismo animal depende da mobilização de reservas corporais para manter a demanda energética corporal e suprir a glândula mamária (LeBlanc, 2014). Vacas que enfrentam acentuado desbalanço energético no pós-parto possuem reduzida disponibilidade de glicose e glutamina para os tecidos e células imunes, principalmente neutrófilos. Isso reduz a capacidade fagocítica e oxidativa de neutrófilos frente a microrganismos invasores, principalmente no ambiente uterino pós-parto (Turner et al., 2016; Noletto et al., 2017). Logo, vacas em elevada ou baixa condição corporal e mantidas em manejo nutricional deficiente no período de transição, irão sofrer com balanço energético negativo mais acentuado e são mais propensas ao desenvolvimento de infecções uterinas após o parto (Sheldon et al., 2019; Pascottini e LeBlanc et al., 2020).

### **3.4 Puerpério patológico**

Com o advento do parto, as barreiras anatômicas do trato genital feminino da vaca encontram-se abertas, o que facilita a colonização bacteriana do útero. Praticamente todas as fêmeas bovinas apresentam colonização uterina no pós-parto. Essa colonização é um processo dinâmico, onde bactérias colonizadoras são eliminadas pelo sistema imune inato e novas bactérias passam a colonizar o útero (Sheldon e Dobson et al., 2004; Sheldon et al., 2008). Fisiologicamente, lesões endometriais e liberação da placenta são processos relacionados à liberação de DAMP no lúmen uterino, que somados à presença de microrganismos, estimulam resposta inflamatória endometrial. O objetivo de tal resposta é controlar e debelar a colonização bacteriana e promover a reparação endometrial durante o processo de involução uterina normal. Entretanto, fêmeas bovinas que apresentaram distocia ou que não eliminaram os anexos fetais dentro do período normal após o parto, possuem intensa perda de tecido epitelial, com ampla exposição do estroma endometrial, e acúmulo de grande quantidade de lóquio composto por sangue, debris celulares e material necrótico no interior do útero. Esse conteúdo rico em nutrientes é propício à multiplicação bacteriana, o que resulta em elevação da carga bacteriana no lúmen uterino (Potter et al., 2010).

As células epiteliais do endométrio, embora em menor número que as estromais, são mais sensíveis à estimulação de PRR por serem a primeira linha de defesa do endométrio frente

a microrganismos (Herath et al., 2006a). Sob estimulação de grande concentração de DAMP e PAMP, secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para iniciar e amplificar a resposta inflamatória. A secreção de CXCL8 e IL-6 por células epiteliais após estimulação por PAMP é direcionada para a porção apical, em direção ao lúmen uterino. Essa secreção vetorial tem como objetivo atrair e ativar neutrófilos apenas no lúmen uterino, onde tais células são necessárias para combater microrganismos (Mackintosh et al., 2013; Healy et al., 2015). Esse mecanismo procura evitar efeitos colaterais decorrentes da resposta inflamatória e explosão oxidativa sobre o tecido endometrial, reduzindo dano tecidual e inflamação endometrial exacerbada. Contudo, fêmeas bovinas que apresentaram distocia ou retenção de placenta possuem extensas áreas de comprometimento epitelial com exposição do estroma endometrial, o que representa porta de entrada para a elevada carga bacteriana intrauterina (Sheldon et al., 2019). As células estromais respondem ao estímulo patogênico com a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL8 direcionada para todas as porções celulares. Devido à maior população celular quando comparadas às células epiteliais, a secreção de citocinas por células estromais é maior e tem efeito potencializador da resposta inflamatória endometrial (Sheldon e Roberts, 2010; Healy et al., 2015). Dessa forma, processos infecciosos do útero que vencem a barreira epitelial e comprometem o estroma endometrial tem elevado potencial de produzirem resposta inflamatórias exacerbadas, resultando em quadros clínicos mais intensos ou inflamação crônica do útero (LeBlanc, 2014; Noleto et al., 2017).

A resposta imune inata uterina é diretamente influenciada pelo perfil metabólico e energético sob o qual a fêmea bovina se encontra no período de transição e puerpério. Vacas leiteiras, em especial as de alta produção (acima de 35 litros de leite/dia), apresentam baixa ingestão de matéria seca no peri e pós-parto e redução das concentrações de glicose, insulina e IGF-I (*insulin-like growth factor – I*) na corrente circulatória (Esposito et al., 2014; Sheldon et al., 2018). Após o parto, a demanda energética para lactação eleva-se consideravelmente, sendo necessária a mobilização de reservas corporais para suprir a glândula mamária e tecidos periféricos (Esposito et al., 2014). A elevação da concentração sérica de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e corpos cetônicos, aliados a menor disponibilidade de glicose e glutamina no organismo animal (Turner et al., 2016; Noleto et al., 2017), impactam diretamente sobre a resposta imune da vaca (Sheldon et al., 2019). Elevadas concentrações de AGNE e corpos cetônicos estão associadas à redução da capacidade quimiotática, fagocítica e destrutiva de fagócito via explosão oxidativa. Além disso, AGNE estão associados à menor proliferação de linfócitos (Esposito et al., 2014; Pascottini e Leblanc, 2020). Os AGNE também estimulam receptores TLR4 nas células do organismo, com secreção de citocinas pró-inflamatórias,



proteínas de fase aguda e indução de resistência periférica à insulina, resultando em quadro denominado de inflamação metabólica (LeBlanc, 2014).

O útero pós-parto também demanda glicose para manter a resposta inflamatória necessária para a involução uterina adequada e eliminação bacteriana. Entretanto, o quadro de resistência periférica à insulina aliado a baixa disponibilidade de glicose e glutamina resultam em menor secreção de citocinas pró-inflamatórias por células endometriais, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL-8 (Turner et al., 2016; Noleto et al., 2017). Dessa maneira, vacas que apresentaram distocia, retenção de placenta e se encontram sob influência de acentuado balanço energético negativo estão propensas ao desenvolvimento de infecções uterinas no pós-parto (Pascottini e LeBlanc, 2020). A menor secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo endométrio, sob estimulação de DAMP e PAMP, aliada à menor migração de neutrófilos competentes para o útero, em decorrência do déficit energético, pode resultar em resposta inflamatória uterina insuficiente durante o período puerperal (LeBlanc, 2014; Sheldon et al. 2018).

### **3.5 Etiologia das infecções uterinas pós-parto na vaca**

Infecções uterinas podem ocorrer em diferentes estádios da vida reprodutiva da vaca, como no pós-parto, após o coito (BonDurant, 2005; Bromfield et al., 2015) ou durante a gestação (Silva et al., 2009; Silva et al., 2012). Diversos microrganismos estão associados ao seu desenvolvimento e a prevalência das infecções pode variar de acordo com o estágio reprodutivo. Disfunções uterinas e ovarianas, em decorrência de tais afecções, estão diretamente relacionadas à redução de fertilidade em rebanhos bovinos, tanto de leite quanto de corte, e a consideráveis perdas econômicas (Overton e Fetrow, 2008; Sheldon et al., 2009; Martins et al., 2013).

Durante o período pós-parto, diversos microrganismos colonizam o útero da vaca e normalmente são classificados em colonizadores oportunistas, potencialmente patogênicos ou patogênicos ao útero (Sheldon, 2004; Williams et al., 2007). Dentre os microrganismos patogênicos mais comumente associados a quadros de infecção uterina no pós-parto podemos citar a *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica* (Sheldon, 2004; Williams et al., 2007; Bicalho et al., 2012; Cunha et al., 2018; Wang et al., 2018) e Herpesvírus bovino tipo 4 (BoHV4) (Donofrio et al., 2007; Sheldon et al., 2009).

### 3.5.1 *Escherichia coli*

A colonização uterina por *E. coli* é o primeiro passo para o desenvolvimento de infecções uterinas pós-parto, precedendo infecções por *T. pyogenes* e outras bactérias anaeróbias (Sheldon et al., 2010; Bicalho et al., 2012). É frequentemente isolada em vacas que apresentam quadros de metrite na primeira semana pós-parto, decrescendo seu isolamento nas semanas seguintes (Williams et al., 2007; Wagener et al., 2014; Prunner et al., 2014). *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, em formato de bacilo, anaeróbia facultativa, fermentadora de açúcares e comensal ao trato digestivo de mamíferos e aves (Gyles et al., 2010). Grande diversidade genética dessa bactéria existe no meio ambiente e fezes, porém, era assumido que os isolados uterinos de *E. coli* seriam provenientes de contaminação fecal durante o parto. Entretanto, técnicas moleculares evidenciaram que quadros de infecções uterinas estão associados a um grupamento filogenético de *E. coli* patogênica ao endométrio, denominada EnPEC, diferente de outros grupamentos patogênicos extra intestinais (ExPEC) (Sheldon et al., 2010).

EnPEC é desprovida de alguns fatores de virulência comuns à *E. coli* entérica, como por exemplo a presença de gene para a produção de shiga toxina. Porém, esse grupamento se mostrou mais adesivo e invasivo às células epiteliais e estromais do endométrio bovino *in vitro* (Sheldon et al., 2010). A adesão de EnPEC às células endometriais uterinas foi favorecida, em parte, pela presença do fator de adesão FimH do pili tipo I, fator esse extremamente importante para a adesão de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) no trato urinário. A invasão de células endometriais por EnPEC foi associada ao citoesqueleto celular, utilizando-se de microfilamentos e microtúbulos para a invasão sem promover morte celular. EnPEC também possui o gene *fyuA* responsável por codificar a proteína yersiniabactina, importante na captação de ferro extracelular e formação de biofilme (Sheldon et al., 2010). Além desses fatores de virulência, EnPEC também possui em sua estrutura celular o lipopolissacarídeo (LPS), importante fator de virulência e principal responsável por estimular o sistema imune inato uterino (Sheldon et al., 2010).

Por ser bastante adesiva e invasiva às células endometriais e por possuir LPS, EnPEC é responsável por induzir inflamação endometrial no pós-parto via ativação de TLR4 em células epiteliais, estromais e células fagocíticas que se encontram no lúmen uterino (Sheldon et al., 2010; 2014). A estimulação de TLR4 induz a síntese de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, que irão induzir o processo inflamatório endometrial com atração de neutrófilos e macrófagos, resultando em acúmulo de pus no lúmen uterino e sintomas de síndrome febril (Sheldon et al., 2014).

Ainda no endométrio, o LPS induz maior síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) em detrimento da síntese de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (Herath et al., 2009a). Em bovinos, a PGF<sub>2α</sub>, além de induzir a luteólise, estimula a contração da musculatura lisa miometrial, auxiliando na expulsão de lóquio e das membranas fetais após o parto. Já PGE<sub>2</sub> possui função luteotrófica e é responsável pela modulação da resposta inflamatória endometrial, reduzindo a capacidade fagocítica de neutrófilos (Sheldon et al., 2009). Com isso, animais que apresentam quadros de infecção uterina pós-parto por EnPEC possuem menor capacidade de expulsar o conteúdo uterino e menor capacidade fagocítica no lúmen uterino, além de manter a sobrevivência do primeiro corpo lúteo pós-parto com produção de concentração subluteal de progesterona (P<sub>4</sub>) (Herath et al., 2009a; Sheldon et al., 2014). A progesterona também atua como imunossupressor sobre neutrófilos, o que reduz ainda mais a capacidade imunológica do animal (Lewis, 2003).

Além da estimulação da resposta inflamatória endometrial, o LPS de EnPEC pode acessar a corrente circulatória e ser carregado para outras áreas do organismo animal associados à regulação da fisiologia reprodutiva. No hipotálamo o LPS reduz a síntese dos hormônios liberador de gonadotrofinas (GnRH) e luteinizante (LH). Nos ovários, atua estimulando o desenvolvimento inicial dos folículos primordiais, e reduzindo a atividade da enzima aromatase nos folículos terciários, que aliado à baixa síntese e secreção de LH pela adenohipófise, resulta em comprometimento da saúde folicular e oocitária (Herath et al., 2007; Bromfield et al., 2015).

### 3.5.2 *Trueperella pyogenes*

*T. pyogenes* é uma bactéria Gram-positiva em forma de bacilo, não móvel e não formadora de esporos, que cresce tanto em ambiente aeróbio quanto anaeróbios, com crescimento ótimo em ambientes ricos em CO<sub>2</sub>. É um patógeno oportunista comumente isolado em mucosas de bovinos, como glândula mamária, trato urinário e trato respiratório superior. Entretanto, pode agir como patógeno primário em infecções quando ocorre trauma prévio da mucosa, espalhando-se pelo organismo (Jost e Billington, 2005).

*T. pyogenes* expressa diversos fatores de virulência importantes para adesão, colonização e danos ao tecido hospedeiro. Dentre tais fatores podemos citar: expressão de gene *nanH* e *nanP* codificadores de neuraminidases, importantes para clivagem de resíduos terminais de carboidratos e glicoproteínas, permitindo, assim, a redução da viscosidade de muco, exposição de receptores celulares e maior adesão à superfície de células epiteliais; expressão de proteína ligadora de colágeno *cbpA*, que se liga aos colágenos tipo I, II e IV, promovendo

maior adesão a tecidos ricos em colágenos; expressão do gene *fimA*, necessário para síntese de fímbrias e adesão da *T. pyogenes* às superfícies mucosas (Jost e Billington, 2005).

O fator de virulência de maior importância na patogenia de infecções por *T. pyogenes* é a expressão do gene *PLO*, responsável por codificar a piolisina. Essa enzima pertence à família de citolisinas dependentes de colesterol (CDC), que se ligam ao colesterol presente em membranas plasmáticas das células do hospedeiro e se oligomerizam formando poros de 30 a 50 nm de diâmetro através da membrana. A formação desses poros resulta em desbalanço osmótico, lise e morte celular (Jost e Billington, 2005; Amos et al., 2014).

A ocorrência de infecção uterina mais intensa no período puerperal, principalmente entre os dias 15 e 40 pós-parto, com consequente evolução para infertilidade, normalmente está associada ao isolamento de *T. pyogenes* do conteúdo uterino (Sheldon et al., 2009; Bicalho et al., 2012; Prunner et al., 2014; Bromfield et al., 2015). Com o parto, a superfície epitelial é parcialmente perdida expondo a submucosa à colonização bacteriana no pós-parto imediato. A colonização e indução de resposta inflamatória por EnPEC e a perda da camada epitelial do endométrio são fatores que facilitam a posterior colonização uterina por *T. pyogenes* (Dohmen et al., 2000; Turner et al., 2012). Entretanto, Wagener et al. (2014) sugerem que tal ação cooperativa entre *E. coli* e *T. pyogenes* não deva ocorrer, uma vez que vacas negativas para *E. coli* em isolados uterinos apresentaram 4,3 vezes mais chances de terem infecção por *T. pyogenes*. Além disso, a presença de *E. coli* próximo aos 35 dias pós-parto houve pouca relação com infecção uterina ou infertilidade (Bicalho et al., 2012; Bromfield et al., 2015).

A maior gravidade dos casos de infecção uterina pós-parto relacionados à infecção por *T. pyogenes* se deve à ação da piolisina. As células estromais do endométrio são mais sensíveis à ação da piolisina, quando comparadas às células epiteliais, neutrófilos, monócitos e linfócitos. Isto porque a membrana plasmática das células estromais possuem mais colesterol em relação à membrana das outras células endometriais. Com a perda parcial da camada epitelial do endométrio durante o parto, as células estromais ficam mais expostas à ação da piolisina, levando à lise celular endometrial em quadros de infecção por *T. pyogenes* (Amos et al., 2014). Além da ação da piolisina, *T. pyogenes* também induz resposta inflamatória endometrial pela estimulação conjunta de TLR2 e NLRs por ácido lipoteicóico e peptidoglicano, com produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (Takeuchi e Akira, 2010; Sheldon et al., 2014).

Embora diversos fatores de virulência justifiquem a severidade dos quadros de infecção uterina associados a *T. pyogenes*, essa bactéria também atua de forma sinérgica com bactérias

*F. necrophorum* e *P. melaninogenica*, aumentando ainda mais a severidade dos casos (Sheldon et al., 2009).

### 3.5.3 *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella melaninogenica*

*F. necrophorum* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbico e comensal do trato gastrointestinal e urogenital dos animais (Nagaraja et al., 2005; Gyles et al., 2010). Possui como principais fatores de virulência envolvidos em infecções a hemaglutinina, LPS e leucotoxina. A hemaglutinina é uma proteína externa de membrana que possui função de adesão às células epiteliais do hospedeiro no início do processo infeccioso. O LPS do *F. necrophorum* subsp. *necrophorum* possui elevada ação endotoxêmica quando comparado por exemplo ao LPS do *F. necrophorum* subsp. *funduliforme*. A leucotoxina sintetizada e secretada por *F. necrophorum* é uma proteína com ação tóxica para neutrófilos e macrófagos de ruminantes (Nagajara et al., 2005). Em baixa concentração a leucotoxina é capaz de induzir apoptose e, quando em concentração elevada, promove lise celular (Nagaraja et al., 2005). Devido ao seu efeito tóxico, a leucotoxina é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, ativando e induzindo a morte de fagócitos e células efectoras por meio de processo apoptótico (Gyles et al., 2010).

*P. melaninogenica* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbico, sacarolítico e caracterizado por possuir pigmentação preta (Gyles et al., 2010). Normalmente é isolada em casos de metrite e endometrite, porém em menor quantidade quando comparada a outras bactérias com maior potencial patogênico ao útero (Cunha et al., 2018). Seu isolamento em infecções uterinas tem sido associado a atuação sinérgica com os microrganismos *T. pyogenes* e *F. necrophorum* (Sheldon et al., 2009; Cunha et al., 2018). *P. melaninogenica* produz uma molécula ainda não identificada que inibe a fagocitose por neutrófilos e macrófagos, potencializando a ação patogênica de outros microrganismos associados ao processo infeccioso (Cunha et al., 2018).

O reconhecimento de *F. necrophorum* e *P. melaninogenica* pelas células endometriais é mediado pela identificação do LPS de ambos os microrganismos pelo TLR4 (Takeuchi e Akira, 2010; Sheldon et al., 2014). Porém, devido aos efeitos imunossupressores resultantes dos fatores de virulência, a colonização concomitante e o desenvolvimento de ações sinérgicas com bactérias *E. coli* e *T. pyogenes* são importantes no desenvolvimento e intensidade de infecções uterinas no período pós-parto (Willians et al., 2007; Sheldon et al., 2009; Bicalho et al., 2012; Cunha et al., 2018).

#### 3.5.4 *Herpesvírus Bovino tipo 4*

O Herpesvírus Bovino tipo 4 (BoHV4) é um vírus pertencente à família Herpesviridae, geneticamente relacionado aos membros da subfamília *gamaherpesvirinae*, e seu material genético está contido em DNA de fita dupla. Normalmente tem sido isolado de animais saudáveis, bezerros com quadros de doença respiratória e ocular, e de vacas apresentando metrite pós-parto, abortamento e infertilidade (Chanrot et al., 2017).

BoHV4 consegue replicar em algumas linhagens celulares, causando efeito citopático. Porém, assim como outros herpesvírus, consegue estabelecer infecção persistente em hospedeiros naturais e experimentais, tendo como reservatório as células da linhagem monócito/macrófago (Donofrio e van Santen, 2001; Donofrio et al., 2007). Foi demonstrado que o BoHV4 possui tropismo por células endometriais bovinas cultivadas *in vitro* (Donofrio et al., 2007, Chanrot et al., 2017) e apresenta alta eficiência de replicação, devido à ativação precoce de genes virais (Donofrio et al., 2007). Esses genes são expressos imediatamente durante a infecção celular e replicação lítica viral, não requerendo a síntese prévia de proteínas virais. Esse processo é mediado pelo conjunto de fatores de transcrição sintetizados pela própria célula hospedeira no momento da infecção (Donofrio et al., 2007).

Infecção *in vitro* de células epiteliais e estromais por BoHV4 resulta em processo de morte celular não apoptótico, com rápida replicação viral. Caso ocorresse rápida morte celular por apoptose, o vírus não conseguiria se replicar e esse processo seria limitador eficiente da produção viral. Dessa forma, o mecanismo anti-apoptótico, baseado principalmente na ativação precoce de genes virais, pode estar correlacionado à metrite viral por BoHV4 em bovinos (Donofrio et al., 2007).

Além da ativação precoce de genes virais, BoHV4 induz aumento da síntese de cicloxigenase 2 (COX-2) em células estromais do endométrio e consequente secreção de PGE<sub>2</sub>. Sugere-se que tal secreção de PGE<sub>2</sub> seja o mecanismo pelo qual a replicação viral é estimulada em macrófagos, considerados como reservatório para infecção persistente em bovinos (Donofrio et al., 2007).

A identificação de BoHV4 em infecções uterinas em bovinos normalmente é concomitante à infecção bacteriana. Acredita-se que infecções uterinas por *E. coli*, com estimulação de TLR4 por LPS e indução da síntese endometrial de PGE<sub>2</sub>, podem atuar como indutores de reativação do BoHV4 em macrófagos com infecção latente (Sheldon et al., 2009). Isso sugere a composição de um ciclo vicioso composto por: endometrite bacteriana, produção de PGE<sub>2</sub> por células endometriais estimuladas por LPS, ativação da replicação viral em

macrófagos por ação conjunta de LPS e PGE<sub>2</sub>, infecção de células endometriais por BoHV4, estimulação de TLR3 com produção de interferons do tipo-I (INF-I) e citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL8, CCL2, CCL5, mais lesão e inflamação endometrial, com atração de monócitos e macrófagos, que são infectados por BoHV4 e podem tornar-se latentes (Sheldon et al., 2009; Chanrot et al., 2017).

### **3.6 Definições das infecções uterinas**

As infecções uterinas após o parto podem ser classificadas em metrite, endometrite clínica, endometrite subclínica ou citológica e piometra. Metrite ocorre nos primeiros 10 dias após o parto e é caracterizada por aumento anormal do volume uterino, apresentando descarga purulenta fétida variando em aspecto de fluido marrom-avermelhado a pus viscoso esbranquiçado. A intensidade dos quadros de metrite normalmente são divididos em três graus, de acordo com os sinais clínicos associados, sendo: grau I sem sinais sistêmicos de doença; grau II apresentando alguns sinais clínicos sistêmicos como febre, apatia e redução da produção de leite; e grau III, ou metrite puerperal, apresentando sinais sistêmicos acentuados como toxemia, redução do apetite, depressão e resfriamento das extremidades do corpo (Sheldon et al., 2019).

A endometrite clínica é definida como inflamação endometrial sem sinais sistêmicos associados, contendo descarga uterina purulenta ou mucopurulenta detectável via vaginoscopia ou ultrassonografia após 21 dias ou mais após o parto, com diâmetro cervical superior a 7,5 cm (LeBlanc, 2014; Sheldon et al., 2019). Deve-se atentar para o acúmulo de secreção purulenta em região cranial da vagina, denominado de descarga vaginal purulenta (PVD), decorrente de cervicite ou vaginite, sem comprometimento endometrial (Dubuc et al., 2010). A cervicite é a inflamação no interior da cérvix, contendo mais de 5% de neutrófilos na citologia em um mês pós-parto. A vaginite se restringe apenas à inflamação da vagina, sem comprometimento da cérvix ou endométrio (LeBlanc, 2014).

A endometrite subclínica ou citológica é caracterizada pela inflamação endometrial sem manifestação de sinais clínicos de endometrite clínica. É diagnosticada pela proporção de neutrófilos em lavado ou citologia endometrial superior a 5% entre três e nove semanas pós-parto, de acordo com ponto de corte definido pelo operador (Sheldon et al., 2019).

Piometra é caracterizada pela distensão e acúmulo de material purulento ou mucopurulento no interior do útero, na presença de um corpo lúteo funcional em um dos

ovários. A cérvix normalmente se encontra fechada, porém alguma abertura pode ocorrer com liberação de conteúdo uterino pela cérvix na vagina (Sheldon et al., 2006).

Todas as fêmeas bovinas apresentam colonização uterina após o parto e cerca de 20 a 40% desenvolvem quadros de metrite. Destas, cerca de 15 a 20% desenvolvem endometrite clínica após a terceira semana pós-parto e 15 a 30% evoluem para endometrite citológica (LeBlanc et al., 2011; Sheldon et al., 2019). A piometra é uma patologia não muito frequente, acometendo apenas 5% das vacas no período puerperal (Sheldon et al., 2008).

As afecções uterinas estão diretamente relacionadas com quadros de subfertilidade e infertilidade em rebanhos leiteiros. Como consequência direta, observa-se aumento dos custos com tratamentos, prolongamento do intervalo do parto a concepção, maior número de serviços por concepção, e aumento do descarte involuntário de animais inférteis (Sheldon et al., 2008). Em análise de diversos estudos acerca dos impactos das infecções uterinas na fertilidade de vacas leiteiras, observa-se que vacas possuindo endometrite citológica, em comparação com vacas saudias, apresentaram, em média, taxa de concepção 20% menor ao primeiro serviço, intervalo do parto à concepção 30 dias mais longo, e aumento de 3% no número de animais abatidos por não conceberem (LeBlanc *et al.*, 2002). Segundo Kasimanickam et al. (2004) e Gilbert et al. (2005), a endometrite citológica resulta em queda de 30% na taxa de concepção ao primeiro serviço, redução de 20 a 26% do número de vacas gestantes aos 300 dias pós-parto, aumento de 30 a 88 dias no período de serviço, aumento médio de três serviços por concepção e aumento de 30% na taxa de descarte involuntário de animais. Além disso, a endometrite citológica é um dos principais fatores relacionados à ocorrência de quadros de vacas repetidoras de estro, outra afecção importante relacionada com a queda de fertilidade de vacas leiteiras (Salasel et al., 2010).

De acordo com Sheldon et al. (2009), os custos com infecção uterina em relação a tratamento, descarte de leite, queda da produção e infertilidade chegam a 131,00 libras/vaca ou a 1,4 bilhões de euros anualmente na União Europeia. Nos Estados Unidos, os custos com infecções uterinas até 10 dias após o parto giram em torno de 358,00 dólares (Overton e Fetrow, 2008), atingindo valores anuais em torno de 650 milhões de dólares (Sheldon et al., 2009). No Brasil, Martins *et al.* (2013) avaliando os custos referentes a tratamento, descarte e queda na produção de leite, estimaram custo médio de 598 litros de leite por vaca que apresenta infecção uterina durante 42 dias após o parto.



### 3.7 Nanociência, nanotecnologia e nanobiotecnologia

Nanociência é a área do conhecimento que estuda os fenômenos e a manipulação de materiais em escala atômica, molecular e supramolecular, cujas propriedades diferem significativamente das propriedades de materiais de larga escala. Já nanotecnologia é o desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, em que uma de suas três dimensões esteja em escala nanométrica (*The Royal Society and The Royal Academy of Engineering*, 2004).

Materiais que possuem características dimensionais em escala que varia de um a cem nanômetros são denominados de nanomateriais. Os nanomateriais podem ser divididos em nanocamadas ou nanopartículas, ou seja, possuem apenas uma dimensão ou as três dimensões em escala nanométrica, respectivamente (*The Royal Society and The Royal Academy of Engineering*, 2004). As propriedades dos nanomateriais se devem a dois fatores principais, à grande área relativa de superfície e aos efeitos quânticos. Tais fatores podem alterar ou potencializar propriedades de reatividade, resistência e características elétricas dos nanomateriais. Quanto menor o nanomaterial, maior o percentual relativo de átomos em sua superfície por unidade de massa, o que aumenta sua reatividade, e maior o domínio dos efeitos quânticos sobre as propriedades do mesmo, influenciando assim os comportamentos ópticos, elétricos e magnéticos de tais materiais (*The Royal Society and The Royal Academy of Engineering*, 2004).

A nanobiotecnologia, ramo da nanociência que se desenvolveu a partir dos interesses nas propriedades específicas dos nanomateriais e da multidisciplinariedade de áreas como física, engenharia e biologia molecular, tem como objetivo o desenvolvimento de dispositivos e sistemas nanométricos de aplicação química e biológica, com alta sensibilidade, especificidade e facilidade de reconhecimento por métodos analíticos (Morais et al., 2014). A nanobiotecnologia tem utilizado diversas nanoestruturas com propriedades distintas para aplicações biológicas como biosensores, diagnóstico, entrega de fármacos, terapia gênica, terapia contra o câncer, engenharia de tecidos e segurança alimentar (Salata, 2004; Liu, 2006; Moraes et al., 2014).

#### 3.7.1 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (*carbono nanotubes* - CNT) foram descobertos por Iijima et al. (1991) e são estruturas compostas por átomos de carbono ligados covalentemente entre si

em estrutura hexagonal, correspondendo a uma folha de grafeno enrolada e ligada em suas extremidades. De acordo com o número de folhas enroladas de forma concêntrica, podem ser classificados em nanotubos de carbono de parede única (*single-walled carbono nanotubes* – SWCNT) ou parede múltipla (*multi-walled carbono nanotubes* – MWCNT) (Figura 1). Possuem diâmetro que varia de 0,4 a 2,0 nm para SWCNT e de 2,0 a 100,0 nm para MWCNT, com espaçamento entre camadas de 0,34 nm e comprimentos que variam de alguns nanômetros a micrômetros (Dresselhaus et al., 2001; Yang et al., 2007; Martins et al., 2016b).

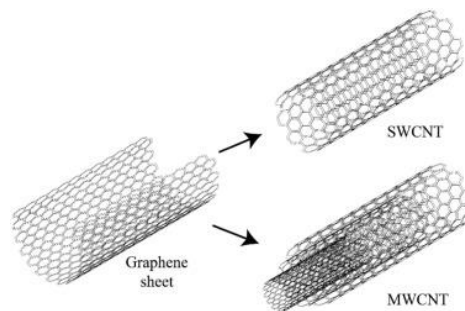


Figura 2. Representação esquemática da conformação dos nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e múltipla (MWCNT) a partir de uma folha de grafeno.

Devido a seu diâmetro nanométrico, os CNT são considerados como nanoestruturas unidimensionais com grande área superficial, elevada resistência mecânica e flexibilidade, peso ultraleve, estabilidade química e térmica, além de ótimas propriedades eletrônicas, sendo considerado um excelente condutor elétrico (*The Royal Society and The Royal Academy of Engineering*, 2004; Yang et al., 2007). Apesar de tantas características intrínsecas aos CNTs, esses carecem de solubilidade em meio aquoso quando utilizados na forma bruta (Yang et al., 2007; Bianco et al., 2011).

Para aplicação biológica, os CNT devem sofrer adição de grupamentos químicos funcionais em sua superfície externa ou extremidades, processo denominado funcionalização. A funcionalização pode ser covalente, quando há formação de defeitos na estrutura do nanotubo para a inserção de um grupamento químico em sua estrutura, ou não covalente, quando moléculas são adsorvidas na superfície dos nanotubos sem causar defeitos nas ligações entre os átomos de carbono. A funcionalização facilita a solubilização e dispersão dos CNT em água ou outro solvente, e permite a interação com biomoléculas (Yang et al., 2007; Bianco et al., 2011). Além disso, CNT funcionalizados conseguem translocar pela membrana plasmática celular, apresentam reduzido efeito citotóxico e maior facilidade de biodegradação por células do sistema imunológico, principalmente neutrófilos e macrófagos (Kostarelos et al., 2007; Bianco et al., 2011).

A funcionalização covalente de CNT pode ser realizada de diversas maneiras. A mais comum é a oxidação de nanotubos utilizando ácidos fortes, como o ácido nítrico e ácido sulfúrico (Souza Filho e Fagan, 2007; Feitosa, 2009; Sajid et al., 2016). Podem ser utilizadas também reações de cicloadição (cicloadição foto-induzida, reação de Bingel e cicloadição 1,3-dipolar) e reações entre CNT e peróxidos ou sulfóxidos (Sajid et al., 2016). A funcionalização não covalente pode ser realizada por meio da dispersão de feixes de CNT em ultrassom, na presença de moléculas poliméricas ou surfactantes, como polietilenoglicol, tween 20, dodecil sulfato de sódio (SDS), dentre outros. Essas moléculas normalmente possuem características anfifílicas, onde a porção hidrofóbica é responsável por interagir com a parede dos nanotubos, enquanto a porção hidrofílica interage com as moléculas de água. Dessa forma, eleva-se a solubilidade dos CNTs em meio aquoso sem ocasionar alterações estruturais, eletrônicas e ópticas nos nanotubos (Souza Filho e Fagan, 2007; Feitosa, 2009; Sajid et al., 2016).

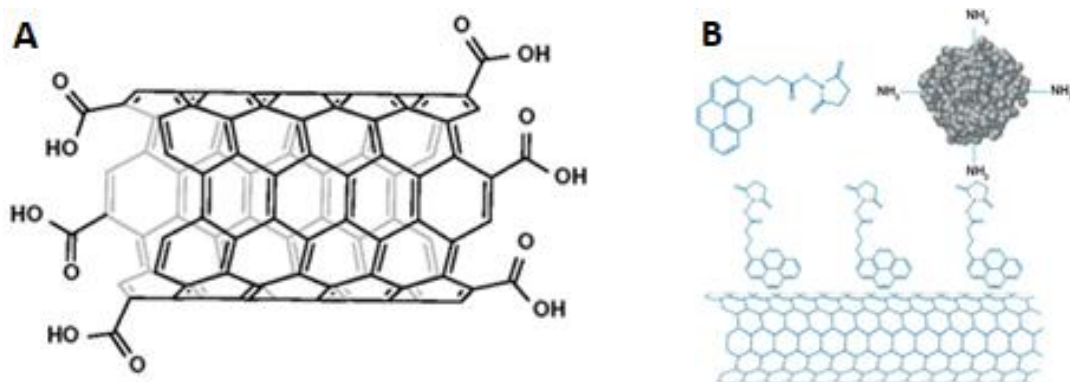


Figura 3. Representação esquemática de nanotubos de carbonos funcionalizados. A) Adição de grupamentos carboxílicos por meio da funcionalização covalente de SWCNT, via oxidação (Krajcik et al., 2008). B) Funcionalização não covalente de SWCNT por empilhamento de pireno para adsorção de proteínas (Sajid et al., 2016).

A funcionalização permitiu ampla aplicação dos nanotubos de carbono em diversas áreas da biologia e nanomedicina. Sua elevada área de superfície relativa ao volume e a adição de grupamentos químicos reativos em sua superfície fornecem diversos pontos de interação dos nanotubos com diferentes moléculas bioativas. Dessa forma, materiais híbridos são gerados com melhora em propriedades sinérgicas, alta especificidade e função biológica específica. Tais características, somadas à capacidade de interagir e transportar a membrana plasmática celular, permitiram o desenvolvimento de pesquisas na área de entrega de fármacos, terapia contra câncer, terapia gênica, diagnósticos por imagem e reparação tecidual (Martins et al., 2016).

### 3.7.1.1 Nanotubos de carbono em terapia gênica

A terapia gênica é uma ferramenta em biologia molecular que se baseia no bloqueio seletivo da ação de determinado gene. Esse bloqueio ocorre mediante ao efeito de interferência de pequenos fragmentos de RNA sobre a leitura do RNA mensageiro (RNAm) do gene alvo, modalidade essa denominada de RNA de interferência ou apenas RNAi. Por ser um processo que ocorre naturalmente no interior das células, o RNAi também pode ser denominado como silenciamento gênico pós-transcricional (Elbashir et al., 2001). A técnica pode ser realizada por meio da introdução de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) ou de RNA fita dupla (dsRNA) que contém, em média, de 19 a 22 nucleotídeos de extensão, no citoplasma de células alvo (Elbashir et al., 2001; Kurreck, 2006). No interior da célula, o siRNA é identificado por um complexo proteico de silenciamento induzido por RNA (RISC), responsável por degradar qualquer molécula de RNAm que seja complementar à molécula de siRNA, impedindo a síntese proteica codificada (Hammond et al., 2000, Xin et al., 2017).

Devido sua alta especificidade de ação, a terapia gênica apresentou elevado potencial para utilização como ferramenta para tratamento de diversas doenças. Para que haja sucesso no silenciamento gênico pela técnica de RNAi, é necessário um sistema de entrega de siRNA que seja capaz de transportar com estabilidade e proteger o siRNA, transpor a membrana plasmática celular e liberar o siRNA no compartimento citoplasmático, além de induzir poucos efeitos imunogênicos, citotóxicos, apoptóticos e inflamatórios (Ladeira, 2009; Guantimosim et al., 2016). Nesse contexto, os CNTs surgiram como alternativa promissora de vetor para siRNA. Após o processo de funcionalização dos CNTs, com adição de grupamentos químicos carregados positivamente em sua superfície, esses são capazes de adsorver a fita de siRNA em sua superfície, devido a interações por pontes de hidrogênio com as bases nitrogenadas dos nucleotídeos carregadas negativamente (Ladeira et al., 2010; Brandão et al., 2016). Essa interação permite o transporte do siRNA para o interior da célula junto ao CNT e sua fácil liberação no citoplasma celular. Os nanotubos funcionalizados são mais biocompatíveis e induzem poucos efeitos citotóxicos, genotóxicos e de indução de resposta inflamatória (Cherukuri et al., 2006; Dubin et al., 2008).

A funcionalização dos CNTs para atuação em terapia gênica se mostra de fundamental importância para o sucesso da técnica. Diversos estudos na literatura foram conduzidos utilizando diferentes processos de funcionalização em SWCNTs (Liu et al., 2007; Krajcik et al., 2008; Ladeira et al., 2010; Apartsin et al., 2014) e MWCNTs (Varkouhi et al., 2011; Spinato et al., 2016).

### 3.7.2 Fulerol $C_{(60)}OH_{(n)}$

O fulereno  $C_{(60)}$  é uma molécula composta por átomos de carbono  $sp^2$  ligados covalentemente uns aos outros, em uma estrutura de gaiola tridimensional, poliédrica, oca, semelhante a uma bola de futebol (Kroto et al., 1991). Os 60 átomos de carbono estão organizados em 12 pentágonos de ligações simples C5 – C5 e 20 hexágonos com ligações duplas C5 = C6. Devido à sua conformação, os fulerenos são nanopartículas estáveis (Kroto et al., 1991), insolúveis em meio aquoso e pouco solúveis em solventes orgânicos (Kazemzadeh e Mozafari, 2019). Em sua forma bruta, os fulerenos possuem a capacidade de se ligar a seis elétrons, que se movem pela nanopartícula por meio da formação momentânea de dipolos na estrutura (Emelyantsev et al., 2019). Por funcionar comoceptor de elétrons, os fulerenos também são conhecidos como “esponja de radicais livres”, capturando elétrons de espécies reativas de oxigênio (EROs), estabilizando-as (Xiao et al., 2006; Yudoh et al., 2007; Bernardes et al., 2015). Entretanto, a aplicação de fulereno em sua forma bruta é limitada pela insolubilidade em meio aquoso. Assim como para nanotubos de carbono, a funcionalização da molécula de fulereno permite sua solubilização em água e ampla variedade de aplicações em sistemas biológicos. Nesse caso, a funcionalização é realizada pela poli-hidroxilação, que consiste na adição de radicais hidroxila na superfície da nanopartícula (Djordjevic et al., 2015). A hidroxilação de fulereno resulta em uma molécula anfifílica denominada fulerol  $C_{(60)}OH_{(n)}$  (ou também Fulerenol). Os radicais hidroxila promovem a solubilidade da molécula em água, enquanto o esqueleto de carbono confere afinidade a estruturas lipídicas como membranas celulares por exemplo, tornando a molécula biocompatível. Com maior capacidade de capturar elétrons e interagir com EROs, a molécula de fulerol possui a interessante característica de agir como agente antioxidante (Yang et al., 2014; Pei et al., 2019).

Diversos são os mecanismos antioxidantes apresentados pelo fulerol. Contra radicais livres  $OH^\cdot$ , o fulerol pode se ligar ao radical  $OH^\cdot$  por meio de um carbono estrutural, incorporando-o à nanopartícula, ou doar elétrons para o radical  $OH^\cdot$ , liberando energia e promovendo rearranjo e estabilização da molécula (Kato et al., 2009). A utilização dos mecanismos irá depender da quantidade de radicais hidroxila existirem na superfície. Caso haja poucos radicais hidroxila na superfície, os radicais  $OH^\cdot$  serão incorporados à nanopartícula. Por outro lado, se a nanopartícula já possuir muitos radicais em sua superfície, elétrons serão doados para o radical  $OH^\cdot$  com o intuito de estabilizá-lo (Ueno et al., 2014). Outro mecanismo empregado pela molécula de fulerol é a catalização de reação entre duas moléculas de

superóxido ( $O_2^-$ ) e duas moléculas de água, resultando em duas moléculas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (Djosdjevic et al., 2006).

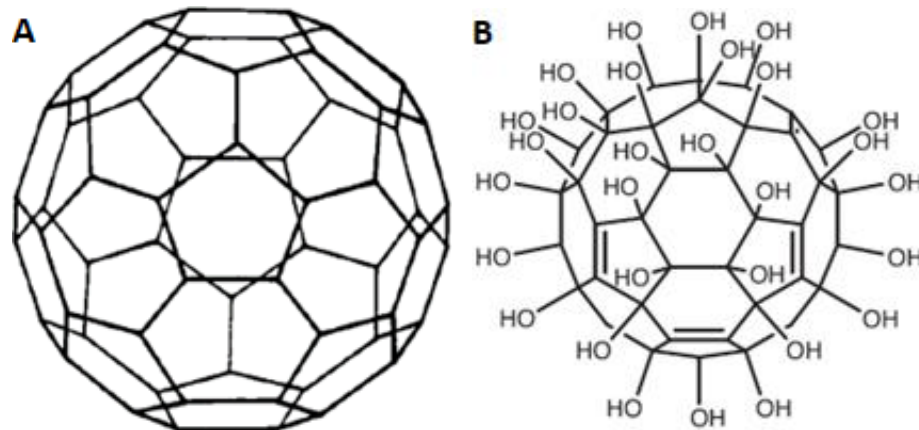


Figura 4. Representação estrutural de moléculas de fulerenos. A) Fulereno ou  $C_{60}$  *Buckminsterfullerene* (Kroto et al., 1991). B) Fulerol  $C_{(60)}OH_{(n)}$  (Aoshima et al., 2009).

Além da ação antioxidante, o fullerol já foi empregado em diversos sistemas biológicos com o intuito de verificar possíveis características anti-inflamatória e antimicrobiana. O uso de fullerol em cultivo de células estromais de medula óssea vertebral de camundongo foi capaz de suprimir a secreção de  $IL-1\beta$ , reduzindo a resposta inflamatória induzida pela citocina, com redução da secreção de  $TNF-\alpha$ , metaloproteinases e produção de EROs (Liu et al., 2013). Em estudos *in vitro* visando o controle de dores lombares por degeneração de núcleo pulposo, inflamação neuronal ou da raiz do gânglio dorsal, o uso de fullerol foi capaz de suprimir a síntese de EROs e  $TNF-\alpha$ , reduzindo a degeneração do núcleo pulposo (Yang et al., 2014; Xiao et al., 2018) e reduzindo o processo inflamatório neuronal (Liu et al., 2013; Jin et al., 2017; Xiao et al., 2018). A supressão da síntese de  $TNF-\alpha$  resultou em redução da secreção de  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , cicloxigenase-2 (COX-2), no gânglio dorsal e neurônios (Liu et al., 2013). Além disso, a supressão de  $TNF-\alpha$  está relacionada à menor ativação do inflamossomo NLRP3 e caspase-1. Tal fato pode explicar a menor secreção de  $IL-1\beta$  em processos inflamatórios em células neuronais do gânglio dorsal (Jin et al., 2017). Em modelo *in vivo*, Xiao et al. (2018) observaram que o uso de fullerol em camundongos com protusão de núcleo pulposo reduziu a secreção de  $TNF-\alpha$  e controlou os níveis intracelulares de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), reduzindo a hiperalgesia em decorrência da hérnia de disco. Os mesmos autores também observaram que o emprego de fullerol reduziu a ativação de proteínas quinase (MAPK) associadas à sinalização intracelular e transcrição de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias.

Fulereno e fullerol também possuem características antimicrobianas em consequência da produção de radicais livres. Aoshima et al. (2009) relataram que a ação antimicrobiana de

fulerol é mais forte contra fungos (*Candida albicans* e *Malassezia furfur*) do que contra bactérias (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Bacillus* sp.). Pressupõe-se que tal resultado seja devido à maior interação do fulerol com  $\beta$ -glicanos e quitina na parede celular de fungos do que com peptidoglicano da membrana celular das bactérias. Segundo Al-Jumali et al. (2017), fulereno e fulerol são capazes alterar o metabolismo energético, de induzir alterações na membrana celular e material genético de microrganismos, além de, sob estimulação luminosa (luz visível ou ultravioleta), aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, impactando na sobrevivência microbiana.

Além de estudos avaliando os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos, o fulerol também já foi empregado em diversos estudos avaliando o possível papel de carreador de moléculas em sistemas biológicos de entrega de fármacos (Pinteala et al., 2009; Kazemzadeh e Mozafari, 20019).

### 3.7.3 Toxicidade de nanopartículas

A toxicidade de um determinado material corresponde aos efeitos resultantes de interações do mesmo com organismos vivos ou o meio ambiente. Tais interações podem ser do tipo química, física ou biológica. Ao se trabalhar com nanopartículas, as propriedades observadas são diferentes daquelas observadas em materiais de maior escala, compostos pelo mesmo elemento. Portanto, diferentes propriedades das nanopartículas podem resultar em diferentes tipos de interação com organismos vivos e ambiente, resultando em toxicidades diferentes (De Paula et al., 2016).

A toxicidade está diretamente relacionada ao tamanho das nanopartículas, da extensão da área de superfície relativa para interação com outras moléculas, do elemento que compõe a nanoestrutura, da capacidade da mesma em formar agregado de nanopartícula, da funcionalização empregada ou molécula adsorvida, do tempo de exposição da nanopartícula e da capacidade de biodegradação das mesmas (Morais et al., 2014; De Paula et al., 2016; Khan et al., 2017). Quanto maior a superfície relativa, ou seja, maior razão entre comprimento/diâmetro, maior será a capacidade da nanopartícula em interagir com outras moléculas ou com outras partículas. A formação de agregados nanoparticulados são mais difíceis de serem eliminados ou biodegradados em organismos vivos, aumentando assim a toxicidade do nanomaterial (De Paula et al., 2016). A funcionalização de nanopartículas, além de permitir a ligação/adsorção a moléculas específicas, tornam as nanopartículas mais solúveis

em solventes, reduzindo a formação de agregados e aumentando a capacidade de biodegradação pelo organismo (Kostarelos et al., 2007; Bianco et al., 2011).

A toxicidade dos nanotubos de carbono, assim como demais nanoestruturas, é dependente da forma de exposição (virgem ou funcionalizado), do tipo e grau de funcionalização, do surfactante ou polímero utilizado para funcionalização não covalente, do tamanho do nanotubo e da via de administração (Firme III e Bandaru, 2010; Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013; Jacobsen et al., 2017; Madannejad et al., 2019). Nanotubos virgens, não funcionalizados, são mais propensos à formação de agregados particulados, insolúveis, que são de difícil eliminação pelo organismo, acumulando em determinados órgãos, dependendo da via de administração dos mesmos no organismo (Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013; Firme III e Bandaru, 2013). Já os CNT funcionalizados, e principalmente os de tamanho reduzido, por serem hidrossolúveis e possuírem maior interação com outras biomoléculas, são rapidamente biotransformados por neutrófilos e macrófagos, além de serem rapidamente eliminados pela urina, bile ou secreção mucociliar do trato respiratório (Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013; Rodriguez-Yañez et al., 2013). Quanto maior o grau de funcionalização e maior a solubilidade dos nanotubos em meio aquoso, mais rápida será sua eliminação do organismo (Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013).

Nanotubos de carbono variando entre 200 e 800 nm são mais facilmente fagocitados por macrófagos e neutrófilos, o que permite maior biotransformação via mecanismos oxidativos no interior dos fagócitos (Firme III e Bandaru, 2010). Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que o principal mecanismo empregado pelos fagócitos é a produção hipoclorito e intermediários de espécies reativas de oxigênio, por meio da ação de mieloperoxidases, que atacam grupamentos carboxílicos na superfície dos nanotubos, catalisando sua biodegradação *in vitro* (Kagan et al., 2010). Entretanto, alguns trabalhos na literatura demonstram que CNT de menor tamanho e maior área relativa possuem maior capacidade de induzirem estresse oxidativo, resultando em inflamação, peroxidação lipídica, danos a proteínas, organelas, membrana celular e DNA tanto em ratos como em queratinócitos humanos (Shvedova et al., 2003; Rodriguez-Yañez et al., 2013; Chuang et al., 2015; Madannejad et al., 2019).

A utilização de agentes solubilizantes, como surfactantes, auxilia na maior dispersão dos nanotubos em meio aquoso, tornando-os possíveis para aplicação biológica. Entretanto, alguns agentes surfactantes utilizados apresentam características toxicológicas (Firme III e Bandaru, 2010; Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013). O polietilenoglicol (PEG), um dos surfactantes mais utilizados na funcionalização de nanotubos de carbono, possui características mutagênicas e indução de toxicidade aguda quando administrado via oral ou derme. Entretanto,



MWCNT funcionalizados com PEG e administrados em camundongos via intravenosa resultaram em menor injúria hepática quando comparados a nanotubos funcionalizados com Tween 20 (Zhang et al., 2010).

Estudos em camundongos avaliando a farmacocinética *in vivo* de CNT funcionalizados por diferentes métodos demonstram que, de acordo com a via administração, os nanotubos podem se acumular em diferentes órgãos do organismo. A infusão intravenosa de nanotubos funcionalizados resulta em maior acúmulo no fígado e baço, e menor acúmulo nos pulmões e rins, após grande eliminação dos mesmos pela urina (Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013; Rodriguez-Yañez et al., 2013; Jacobsen et al., 2017). A administração intraperitoneal resulta em acúmulo no estômago, rins, ossos, circulação, baço e fígado (Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013; Jacobsen et al., 2017). O fornecimento de CNT, via oral, resulta em acúmulos no estômago e intestinos, com grande eliminação pelas fezes (Rodriguez-Yañez et al., 2013; Jacobsen et al., 2017). Quando inalado ou instilado nas vias aéreas superiores, CNT acumulam-se na região da nasofaringe, nos alvéolos pulmonares, espaço subpleural entre as células mesenquimais e a matriz de colágeno, além de serem detectados no interior de células epiteliais e macrófagos dos alvéolos pulmonares (Rodriguez-Yañez et al., 2013; Jacobsen et al., 2017). A detecção de nanotubos no espaço subpleural e no interior de macrófagos sugerem que a inalação de nanotubos podem resultar em translocação e distribuição dos mesmos pelo organismo por meio da circulação sanguínea (Jacobsen et al., 2017).

Apesar dos diversos pontos de acúmulo no organismo animal, os efeitos toxicológicos dos CNT funcionalizados ainda não são totalmente elucidados. Isso porque os diversos estudos realizados nessa linha de pesquisa utilizaram diferentes tipos e tamanhos de nanotubos, diferentes formas de funcionalização e diferentes concentrações administradas no organismo animal ou em cultivos celulares. Embora alguns estudos demonstrem excelente biocompatibilidade dos nanotubos em diferentes linhagens celulares (Dubin et al., 2008; Ladeira et al., 2010; Munk et al., 2016), outros relatam efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, imuno e genotóxicos (Firme III e Bondaru, 2010; Di Giorgio et al., 2011; Yang et al., 2012; Ali-Boucetta e Kostarelos, 2013; Rodriguez-Yañez et al., 2013; Madannejad et al., 2019).

Em relação a fulerenos e seus derivados hidroxilados, assim como para nanotubos de carbono, a toxicidade varia de acordo com a método de funcionalização, uso surfactantes, grau de solubilidade e as condições na qual a nanopartícula é empregada (Emelyantsev et al., 2019). Em estudo *in vivo* avaliando a toxicidade de fullerol infundido via endovenosa em camundongos, Monteiro-Riviere et al. (2012) não verificaram alterações histopatológicas,

sanguíneas ou urinárias durante as primeiras 48 horas pós infusão, indicando segurança a curto prazo na aplicação de fulerol em sistemas biológicos. Avaliando os efeitos do fulerol sobre inflamação neutrofílica pulmonar em camundongos submetidos a instilação endotraqueal com partículas de quartzo, Roursgaard et al. (2008) verificaram que fulerol possui efeito anti-inflamatório, em pequenas concentrações, e pró-inflamatório, em concentrações elevadas. Quando hidroxilado, fulerenos não demonstraram efeitos citotóxicos expressivos em diversos ensaios celulares e *in vivo*, demonstrando elevada biocompatibilidade (Monteiro-Riviere et al., 2012; Liu et al., 2013; Yang et al., 2014; Xiao et al., 2018; Pei et al., 2019). Entretanto, quando sob estimulação luminosa, quer seja luz visível ou ultravioleta (UV), fulereno e fulerol deixam de ter capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio e passam a potencializar a produção das mesmas em sistemas biológicos (Roberts et al., 2008; Al-Jumali et al., 2017; Emelyantsev et al., 2019). Essa característica é desejável quando se refere ao efeito antimicrobiano das estruturas baseadas em fulereno, porém, deve-se atentar ao efeito colateral sobre as células do organismo do hospedeiro quanto à elevada produção de ERO.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and molecular immunology*. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. 545p.

ALI-BOUCETTA, H.; KOSTARELOS, K. Pharmacology of carbon nanotubes: toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.65, p.2111-2119, 2013.

AL-JUMALI, A.; ALANCHERRY, S.; BAZAKA, K.; et al. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials*, v.10:1066, p.1-26, 2017.

ALMEIDA, M. R.; OLIVEIRA, K. S.; STEPHANI, R.; et al. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. *J. Raman Spectrosc.*, v.42, p.1548-1552, 2011.

ALMEIDA, M. R.; OLIVEIRA, K. S.; STEPHANI, R.; et al. Application of FT-Raman spectroscopy and chemometric analysis for determination of adulteration in milk powder. *Anal. Lett.*, v.45, p.2589-2602, 2012.

AMOS, M. R.; HEALEY, G. D.; GOLDSTONE, R. J. et al. Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol. Reprod.*, v.90, n.3, p.1-13, 2014.

AOSHIMA, H.; KOKUBO, K.; SHIRAKAWA, S.; et al. Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol Sci.*, v.14, n.2, p.69-72, 2009.

APARTSIN, E. K.; BUYANOVA, M. Y.; NOVOPASHINA, D. S.; et al. Novel multifunctional hybrids of single-walled carbon nanotubes with nucleic acids: synthesis and interactions with living cells. *Appl. Mater. Interfaces*, v.6, p.1454-1461, 2014.

- ATTUPURAM, N. M., KUMARESAN, A., NARAYANAN, K., et al. Cellular and molecular mechanisms involved in placental separation in the bovine: a review. *Mol. Reprod. Dev.*, v.83, p.287-297, 2016.
- BERNARDES, P. T. T.; REZENDE, B. M.; RESENDE, C. B.; et al. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. *PLoS ONE*, v.10, n.4:e0123004, p.1-16, 2015.
- BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chem. Commun.*, v.47, p.10182-10188, 2011.
- BICALHO, M. L. S.; MACHADO, V. S.; OIKINOMOU, G.; et al. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet. Microbiol.*, v.157, p.125-131, 2012.
- BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.; RIBEIRO, E. S.; et al. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Anim. Reprod.*, v.9, n.3, p.260-272, 2012.
- BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet. Clin. Food. Anim.*, v.21, p.383-408, 2005.
- BORGES, A. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation *ex vivo*. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.67, p.526-539, 2012.
- BRANDAO, H. M.; MUNK, M.; CARVALHO, B. C.; et al. Carbon nanotubes as a DNA delivery agente for generation of genetically modified mammals embryos. In: JORIO, A. *Bioengineering applications of carbono nanostructures*. 1. ed. Belo Horizonte: Springer, 2016. Cap.3, p.31-56.
- BROMFIELD, J. J.; SANTOS, J. E. P.; BLOCK, J.; et al. Uterine infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. In: PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM. *J. Anim. Sci.*, v.93, p.2021-2033, 2015.
- BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, v.83, p.211-218, 2003.
- CARNEIRO, L. C.; BEDFORD, C.; JACCA, S.; et al. Coordinated role of Toll-like receptor-3 and retinoic acid-inducible gene-I in the innate response of bovine endometrial cells to virus. *Font. Immunol.*, v.8, p.1-11, 2017.
- CHANROT, M.; BLOMQUIST, G.; GUO, Y.; et al. Bovine herpes virus type 4 alters TNF- $\alpha$  and IL-8 profiles and impairs the survival of bovine endometrial epithelial cells. *Reprod. Biol.*, v.17, p.225-232, 2017.
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; DOHERTY, M. L.; et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, v.71, p.1396-1407, 2009.
- CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, v.10, p.826-837, 2010.
- CHERUKURI, P.; GANNON, C. J.; LEEUW, T.K.; et al. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.103, n.50, p.18882-18886, 2006.

- CHUANG, H.C.; CHEN, L.C.; LEI, Y.C.; et al. Surface area as a dose metric for carbon black nanoparticles: a study of oxidative stress, DNA single-strand breakage and inflammation in rats. *Atmos. Environ.*, v.106, p.329-334, 2015.
- CRONIN, J. G.; TURNER, M. L.; GOETZE, L.; et al. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.*, v.86, n.2:51, p.1-9, 2012.
- CUNHA, F.; JEON, S. J.; DAETZ, R.; et al. Quantifying known and emerging uterine pathogens, and evaluating their association with metritis and fever in dairy cows. *Theriogenology*, v.114, p.25-33, 2018.
- DADARWAL, D.; PALMER, C.; GRIEBEL, P. Mucosal immunity of postpartum bovine genital tract. *Theriogenology*, v.104, p.62-71, 2017.
- DAVIES, D.; MEADE, K. G.; HERATH, S. et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.6, p.53, 2008.
- DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, v.29, p.707-735, 2011.
- DE PAULA, A. J.; PADOVANI, G. C.; DURAN, N.; et al. Nanotoxicology of carbon-based nanomaterials. In: JORIO, A. *Bioengineering applications of carbon nanostructures*. 1. ed. Belo Horizonte: Springer, 2016. Cap.7, p.105-138.
- DI GIORGIO, M. L.; DI BUCCHIANICO, S.; RAGNELLI, A. M.; et al. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat. Res.*, v.722, p.20-31, 2011.
- DINARELLO, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of Discovery. *The FASEB Journal*, v.8, p.1314-1325, 1994.
- DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.345-370, 2003.
- DJORDJEVIC, A.; BOGDANOVIC, G.; DOBRIC, S. Fullerenes in biomedicine. *J. BUON*, v.11, p.391-404, 2006.
- DJORDJEVIC, A.; SRDJENOVIC, B.; SEKE, M.; et al. Review of synthesis and antioxidant potential of fullerene nanoparticles. *J. Nanomater.*, v.2015:567073, p.1-15, 2015.
- DOBSON-HILL, B. C., 2009. *Uterine involution in the dairy cow: comparative study between organic and conventional dairy cows*. 2009. 95f. Thesis (Master of Science in Animal Science) – Massey University, Palmerston North.
- DOHMEN, M. J. W.; JOOP, K.; STURK, A.; et al. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology*, v.54, p.1019-1032, 2000.
- DONOFRIO, G.; VAN SANTEN, V. L. A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *J. Gen. Virol.*, v.82, p.1181-1185, 2001.
- DONOFRIO, G.; HERATH, S.; SARTORI, C.; et al. Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*, v.134, p.183-197, 2007.

- DONOFRIO, G.; CAPOCEFALO, A.; FRANCESCHI, V.; et al. The chemokine IL8 is up-regulated in bovine endometrial stromal cells by the BoHV-4 IE2 gene product, ORF50/Rta: a step ahead toward a mechanism for BoHV-4 induced endometritis. *Bio. Reprod.*, v.83, p.919-928, 2010.
- DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P. Carbon Nanotubes: synthesis, structure, properties and applications. Berlin: Springer, 2001. 447p.
- DUBIN, R. A.; CALLEGARI, G. C.; KOHN, J.; et al. Carbon nanotube fibers are compatible with mammalian cells and neurons. *IEEE Trans. Nanobiosci.*, v.7, n.1, p.11-14, 2008.
- DUBUC, J.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; et al. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v.93, n.11, p.5225-5233, 2010.
- ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.144, p.60-71, 2014.
- ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature*. v.411, p.494-498, 2001.
- EMELYANTSEV, S.; PRAZDNOVA, E.; CHISTYAKOV, V.; et al. Biological effects of C<sub>60</sub> Fullerene revealed with bacterial biosensor – toxic or rather antioxidant? *Biosensors*, v.9, n.81, p.1-10, 2019.
- FEITOSA, J. P. M. *Funcionalização covalente e não covalente de nanotubos de carbono*. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- FIRME III, C. P.; BANDARU, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: NBM*, v.6, p.245-256, 2010.
- FISCHER, C.; DRILLICH, M.; ODAU, S.; et al. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.22, p.818–829, 2010.
- GABLER, C.; FISCHER, C.; DRILLICH, M.; et al. Time-dependent mRNA expression. Of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.8, p.152-160, 2010.
- GALVAO, K. N.; SANTOS, N. R.; GALVAO, J. S.; et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*, v.76, p.290-299, 2011.
- GIER, H. T.; MARION, G. B. Uterus of the cow after parturition involuntional changes. *Am. J. Vet. Res.*, v.29, p.83-96, 1968.
- GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, v.64, p.1879-1888, 2005.
- GUANTIMOSIM, S.; LADEIRA, M.; RESENDE, C. R.; et al. The use of single wall carbon nanotubes as a delivery system for siRNA. In: JORIO, A. *Bioengineering applications of carbon nanostructures*. 1. ed. Belo Horizonte: Springer, 2016. Cap.2, p.17-30.
- GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; et al. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4. ed. Ames: Wiley-Blacwell, 2010. 643p.
- HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v.404, p.293-296, 2000.

- HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. The toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, v.52, 269-279, 1988.
- HEALY, L. L.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci. Rep.*, v.4, p.1-9, 2014.
- HEALY, L. L.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Polarized epithelial cells secrete interleukin 6 apically in the bovine endometrium. *Biol. Reprod.*, v.92, n.6:151, p.1-12, 2015.
- HERATH, S.; FISCHER, D. P.; WERLING, D.; et al. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, v.147, n.1, p.562-570, 2006a.
- HERATH, S.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; et al. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J. Reprod. Immunol.*, v.69, p.13-22, 2006b.
- HERATH, S.; WILLIAMS, E. J.; LILLY, S. T.; et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, v.134, p.683-693, 2007.
- HERATH, S.; LILLY, S. T.; FISCHER, D. P.; et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2α</sub> to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology*, v.150, n.4, 1912-1920, 2009a.
- HERATH, S.; LILLY, S. T.; SANTOS, N. R.; et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.7, p.55-67, 2009b.
- IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v.354, p.56-58, 1991.
- JACOBSEN, N. R.; MOLLER, P.; CLAUSEN, P. A.; et al. Biodistribution of carbon nanotubes in animal models. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.121, p.30-43, 2017.
- JEON, S. J.; VIEIRA-NETO, A.; GOBIKRUSHANTH, M.; et al. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.81, p.6324-6332, 2015.
- JIN, L.; DING, M.; OKLOPCIC, A.; et al. Nanoparticle fullerol alleviates radiculopathy via NLRP3 inflammasome and neuropeptides. *Nanomedicine*, v.13, n.6, p.2049-2059, 2017.
- JIN, L.; DING, M.; OKLOPCIC, A.; et al. Nanoparticle fullerol alleviates radiculopathy via NLRP3 inflammasome and neuropeptides. *Nanomedicine*, v.13, n.6, p.2049-2059, 2017.
- JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Leeuwenhoek*, v.88, p. 87-102, 2005.
- JÚNIOR, P. H. R.; OLIVEIRA, K. S.; ALMEIDA, C. E. R.; et al. FT-Raman and chemometric tools for rapid determination of quality parameters in milk powder: classification of samples for the presence of lactose and fraud detection by addition of maltodextrin. *Food Chem.*, v.196, p.584-588, 2016.
- KAGAN, V. E.; KONDURU, N. V.; FENG, W.; et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat. Nanotechnol.*, v.44, p.1-7, 2010.
- KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.62, p.9-23, 2004.

- KATO, S.; AOSHIMA, H.; SAITOH, Y.; et al. Highly hydroxylated or  $\gamma$ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: the antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and  $\beta$ -carotene bleaching assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.19, p.5293-5296, 2009.
- KAZEMZADEH, H.; MOZAFARI, M. Fullerene-based delivery systems. *Drug Discov. Today*, v.24, n.3, p.898-905, 2019.
- KELLY, P.; MEADE, K. G.; O'FARRELY, C. Non-canonical inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production by primary endometrial epithelial and stromal fibroblast cells ins NLRP3 and Caspase-4 Dependent. *Front. Immunol.*, v.10:102, p.1-17, 2019.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.*, in press, 2017. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1878535217300990?token=16F98AF227F903D578CE85F24F25B2201192F8A50921519F4B8EAE4303BA36554D8DC1B1E2592D773ADFB22EBF1660F5>>. Acesso em: 18 mar. 2019.
- KOH, Y. Q.; MITCHELL, M. D.; ALMUGHLLIQ, F. B.; et al. Regulation of inflammatory mediator expression in bovine endometrial cells: effects of lipopolysaccharide, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. *Physiol. Rep.*, v.6, n.9, p.1-13, 2018.
- KOSTARELOS, K.; LACERDA, L.; PASTORIN, G.; et al. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Net. Nanotechnol.*, v.2, p. 108-113, 2007.
- KOZICKI, L. E. Contribuição ao estudo do puerpério de vacas leiteiras através do acompanhamento clínico reprodutivo e determinação de progesterona pelo radioimunoensaio. *Braz. J. Res. Anim. Sci.*, v.35, p.225-228, 1998.
- KRAJCIK, R.; JUNG, A.; HIRSCH, A.; et al. Functionalization of carbon nanotubes enables non-covalent binding and intracellular delivery of small interfering RNA for efficient knock-down of genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.369, p.595-602, 2008.
- KROTO, H. W.; ALLAF, A. W.; BALM, S. P. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Chem. Rev.*, v.91, p.1213-1235, 1991.
- KURRECK, J. siRNA efficiency: structure or sequence – that is the question. *J. Biomed. Biotechnol.*, v.2006, n.4, e.83757, p.1-7, 2006.
- LADEIRA, M. S. *Utilização de nanotubos de carbono como agente de transfecção para siRNA em diferentes tipos de células de mamíferos*. 2009. 55f. Dissertação (Mestre em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LADEIRA, M. S.; ANDRADE, V. A.; GOMES, E. R. M.; et al. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology*, v.21, e.385101, p.1-12, 2010.
- LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2223-2236, 2002.
- LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.76, p.16-10-1618, 2011.
- LEBLANC, S. J. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*, v.8:s1, p.54-63, 2014.

- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v.86, p.973–983, 1996.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.1, p.117, 2003.
- LIU, W. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *J. Biosci. Bioeng.*, v.102, n.1, p.1-7, 2006.
- LIU, Z.; WINTERS, M.; HOLODNIY, M.; et al. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon nanotubes transporters. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.46, p.2023-2027, 2007
- LIU, Z.; LI, X.; TABAKMAN, S.M.; et al. Multiplexed multicolor Raman imaging of live cells with isotopically modified single walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, v.130, p.13540-13541, 2008a.
- LIU, Q.; JIN, L.; MAHON, B. H.; et al. A novel treatment of neuroinflammation against low back pain by soluble fullerol nanoparticles. *Spine*, v.38, n.17, p.1443-1451, 2013.
- MACKINTOSH, S. B.; SCHUBERTH, H.; HEALY, L. L.; et al. Polarized bovine endometrial epithelial cells vectorially secrete prostaglandins and chemotactic factors under physiological and pathological conditions. *Reproduction*, v.145, p.57-72, 2013.
- MADANNEJAD, R.; SHOAIIE, N.; JAHANPEYMA, F.; et al. Toxicity of carbon-based nanomaterials: reviewing recent reports in medical and biological systems. *Chem. Biol. Interact.*, v.301, p.206-222, 2019.
- MARTINS, V. N. V., MARQUES JUNIOR, A. P., VASCONCELOS, A. C.; et al. Placental maturation and expulsion in Holstein and Nelore Cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n. 2, p.157-167, 2004.
- MARTINS, T. M. *Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça holandesa e expressão gênica endometrial de receptores tipo-Toll e  $\beta$ -defensina 5 após o parto*. 2010. 137f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTINS, T. M.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A.; et al. Postpartum toll-like receptors and  $\beta$ -defensin 5 mRNA levels in the endometrium of Holstein cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.139, p.277-281, 2011.
- MARTINS, T. M.; SANTOS, R. L.; PAIXÃO, T. A.; et al. Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça Holandesa com puerpério normal ou patológico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.5, p.1348-1356, 2013.
- MARTINS, T. M.; MUNIZ, C. S.; ANDRADE, V. B.; et al. Changes in endometrial transcription of TLR2, TLR4 and CD14 during the first-week postpartum in dairy cows with retained placenta. *Theriogenology*, v.85, p.1282-1288, 2016a.
- MARTINS, E. M. N.; FURTADO, C. A.; SANTOS, A. P.; et al. Synthesis, purification and functionalization of carbon nanotubes for biological applications. In: JORIO, A. *Bioengineering applications of carbon nanostructures*. 1. ed. Belo Horizonte: Springer, 2016b. Cap.8, p.139-163.
- MAZUREK, S.; SZOSTAK, R.; CZAJA, T.; et al. Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. *Talanta*, v.138, p.285-289, 2015.
- MCGUIRE, K.; JONES, M.; WERLING, D.; et al. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim. Genet.*, v.37, p.47-50, 2005.



- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, v.9, p.4-9, 1997.
- MONTEIRO, C. M. R.; FARIAS, E. C.; PERRI, S. H. V.; et al. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*). *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v.40, p.45-54, 2003.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; LINDER, K. E.; INMAN, A. O.; et al. Lack of hydroxylated fullerene toxicity after intravenous administration to female sprague-dawley rats. *J. Toxicol Environ. Health A.*, v.75, n.7, p.367-373, 2012.
- MOORE, S. G.; ERICSSON, A. C.; POOCK, S. E.; et al. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *J. Dairy Sci.*, v.100, p.1-8, 2017.
- MORAIS, M. G.; MARTINS, V. G., STEFFENS, D.; et al. Biological applications of nanobiotechnology. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v.14, n.1, 1007-1017, 2014.
- MUNK, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; QUINTAO, C. C. R.; et al. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine*, v.12, p. 1151-1159, 2016.
- MUZIO, M.; MANTOVANI, A. Toll-like receptors. *Microbes and Infection*, v.2, p.251-255, 2000.
- NAGARAJA, T. G.; NARAYANAN, S. K.; STEWART, G. C.; et al. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe*, v.11, p.239-246, 2005.
- NOLETO, P. G.; Glutamine modulates inflammatory responses to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. *J. Dairy Sci.*, v.100, n.3, p.2207-2212, 2017.
- OGAWA, S.; LOZACH, J.; BENNER, C.; et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and Toll-like receptors. *Cell*, v.122, p.707-721, 2005.
- OVERTON, M.; FETROW, J. Economics of postpartum uterine health. Dairy Cattle Reproduction Council Convention Omaha, Nebraska, 2008, p 39-44.
- PASCOTTINI, O. B.; LEBLANC, S. J. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology*, v.150, p.193-200, 2020.
- PEI, Y.; CUI, F.; SHANG, G.; et al. Antioxidative nanofullerol inhibits macrophage activation and development of osteoarthritis in rats. *Int. J. Nanomedicine*, v.14, p.4145-4155, 2019.
- PINTEALA, M.; DASCALU, A.; UNGURENASU, C. Binding fullerol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> to dsDNA. *Int. J. Nanomedicine*, v.4, p.193-199, v.2009.
- POTTER, T. J.; GUITIAN, J.; FISHWICK, J.; et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, v.74, p.127-134, 2010.
- PRUNNER, I.; POTHMANN, H.; WAGENER, K.; et al. Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.82, p.1316-1322, 2014.
- ROBERTS, J. E.; WIELGUS, A. R.; BOYES, W. K.; et al. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, v.228, n.1, p.49-58, 2008.
- RODRIGUEZ-YANEZ, Y.; MUNOZ, B.; ALBORES, A. Mechanisms of toxicity by carbon nanotubes. *Toxicol. Mech. Methods*, v.23, n.3, p.178-195, 2013.

- ROUSGAARD, M.; POULSEN, S. S.; KEPLEY, C. L.; et al. Polyhydroxylated C<sub>60</sub> fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.103, p.386-388, 2008.
- SAJID, M. I.; JAMSHAD, U.; JAMSHAD, T.; et al. Carbon nanotubes from synthesis to *in vivo* biomedical applications. *Int. J. Pharm.*, v.501, p.278-299, 2016.
- SALASEL, B.; MOKHTARI, A.; TAKTAZ, T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*, v.74, p.1271-1278, 2010.
- SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnol.*, v.2, n.3, p.1-6, 2004.
- SAUT, J. P. E.; HEALEY, G. D.; BORGES, A. M.; et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS *in vitro*. *Reproduction*, v.148, p.593-606, 2014.
- SENGER, P. L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, Inc., 2003. 373p.
- SHAW, M. H.; REIMER, T.; KIM, Y. G.; et al. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr. Opin. Immunol.*, v.20, p.377-382, 2008.
- SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N. et al. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, v.123, p.837-8845, 2002.
- SHELDON, I. M. The postpartum uterus. *Vet. Clin. Food. Anim.*, v.20, p.569-591, 2004.
- SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.295-306, 2004.
- SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.15-16-1530, 2006.
- SHELDON, I. M.; WILLIAMS, E. J.; MILLER, A. N. A. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.*, v.176, p.115-121, 2008.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.*, v.81, p.1025-1032, 2009.
- SHELDON, I. M.; ROBERTS, M. H. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLoS ONE*, v.5, n.9, p.1-10, 2010.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; HEALEY, G. D.; et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction*, v.148, p.R41-R51, 2014.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; POSPIECH, M.; et al. Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium. *J. Dairy Sci.*, v.101, n.4, p.3655-3664, 2018.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.7, p.361-384, 2019.

- SHIMIZU, M.; KOBAYASHI, Y.; MIZOGUCHI, T.; et al. Carbon nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. *Adv. Mater.*, v.24, p.2176-2185, 2012.
- SHVEDOVA, A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E.; et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, v.66, n.20, p.1909-1926, 2003.
- SILVA, T. M. A., OLIVEIRA, R. G., MOL, J. P. S., et al. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural*, v.39, n.9, p.2563-2570, 2009.
- SILVA, A. P. C., COSTA, E. A., MACEDO, A. A., et al. Transcription of pattern recognition receptors and abortive agents induced chemokines in the bovine pregnant uterus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.145, p.248-256, 2012.
- SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. A.; AITKEN, S. L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.*, v.10, p.53-63, 2009.
- SOUZA FILHO, A. G.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. *Quim. Nova.*, v.30, n.7, p.1695-1703, 2007.
- SPINATO, C.; GIUST, D.; VACCHI, I. A.; et al. Different chemical strategies to aminate oxidized multi-walled carbon nanotubes for siRNA complexation and delivery. *J. Mater. Chem. B*, v.4, p431-441, 2016.
- SWANGCHAN-UTHAI, T.; LAVENDER, C. R. M.; CHENG, Z. et al. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol. Reprod.*, v.87, p.1-13, 2012.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v.140, p.805-820, 2010.
- THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. 1. ed. Londres: The Royal Society, 2004. Disponível em <<https://royalsociety.org/topics-policy/publications/2004/nanoscience-nanotechnologies/>>. Acesso em: 14 mar.2019.
- TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.402-409, 2012.
- TURNER, M. L.; Cronin, J. G.; Healey, G. D.; et al. 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, TLR6. *Endocrinology*, v.155, n.4, p.1453-1465, 2014.
- TURNER, M. L.; CRONIN, J. G.; NOLETO, P. G.; et al. Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. *PLoS ONE*, v.11, n.3:e0151416, p.1-20, 2016.
- UENO, H.; YAKAMURA, S.; ARASTOO, R. S.; et al. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using  $\beta$ -carotene bleaching assay. *J. Nanomater.*, v.2014:802596, p.1-7, 2014.
- VARKOUHI, A. K.; FOILLARD, S.; LAMMERS, T.; et al. SiRNA delivery with functionalized carbon nanotubes. *Int. J. Pharm.*, v.416, p.419-425, 2011.

- WAGENER, K.; GRUNERT, T.; PRUNNER, I.; et al. Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis. *Vet. J.*, v.202, p.527-532, 2014.
- WANG, M.; LIU, M.; XU, J.; et al. Uterine microbiota of dairy cows with clinical and subclinical endometritis. *Front. Microbiol.*, v.9, p.1-11, 2018.
- WERLING, D.; JUNGI, T. W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.91, p.1-12, 2003.
- WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E. et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, v.68, p.549-559, 2007.
- WONG, B. S.; YOONG, S. L.; JAGUSIAK, A.; et al. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.65, p.1964-2015, 2013.
- XIAO, L.; TAKADA, H.; GAN, X.; et al. The water-soluble fullerene derivative “Radical Sponge” exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.16, p.1590-1595, 2006.
- XIAO, L.; HONG, K.; ROBERSON, C.; et al. Hydroxylated fullerene: a stellar nanomedicine to treat lumbar radiculopathy via antagonizing TNF- $\alpha$ -induced ion channel activation, calcium signaling, and neuropeptide production. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, v.4, n.1, p.266-277, 2018.
- XIN, Y.; HUANG, M.; GUO, W. W.; et al. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol. Cancer*, v.16, p.134-142, 2017.
- YANG, W.; THORDARSON, P.; GOODING, J. J.; et al. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*, v.18, e412001, p.1-12, 2007.
- YANG, S. T.; LUO, J.; ZHOU, Q.; et al. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. *Theranostics*, v.2, n.3, p.271-282, 2012.
- YANG, X.; JIN, L.; YAO, L.; et al. Antioxidative nanofullerol prevents intervertebral disk degeneration. *Int. J. Nanomedicine*, v.9, p.2419-2430, 2014.
- YUDOH, K.; SHISHIDO, K.; MURAYAMA, H.; et al. Water-soluble C60 fullerene prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis via down-regulation of chondrocyte catabolic activity and inhibition of cartilage degeneration during disease development. *Arthritis Rheum.*, v.56, n.10, p.3307-3318, 2007.
- YUNHE, F.; BO, L.; XIAOSHENG, F.; et al. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.151, p.20-27, 2013.
- ZHANG, D.; DENG, X.; Ji, Z.; et al. Long-term hepatotoxicity of polyethylene-glycol functionalized multi-walled carbon nanotubes in mice. *Nanotechnology*, v.21, p.1-1-, 2010.

## CAPÍTULO I

### Standardization and detection of oxidized multi-walled carbon nanotubes in bovine fresh milk through FT-Raman spectroscopy

Philippe Pimenta Nunes<sup>1</sup>, Mariana Ramos de Almeida<sup>2</sup>, Flávia Gonçalves Pacheco<sup>3</sup>, Cristiano Fantini Leite<sup>4</sup>, Raquel Kenya Ferreira Gonçalves de Oliveira<sup>5</sup>, Clascídia Aparecida Furtado<sup>3</sup>, Luiz Orlando Ladeira<sup>4</sup>, Ado Jorio de Vasconcelos<sup>4</sup>, Antônio de Pinho Marques Júnior<sup>1</sup>, Renato de Lima Santos<sup>1</sup>, Alan Maia Borges<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Química de Nanoestruturas de Carbono, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>5</sup>Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\*E-mail: [alanmborges@hotmail.com](mailto:alanmborges@hotmail.com)

#### ABSTRACT

The potential use of carbon nanotubes to control endometrial inflammation in postpartum lactating cows brings concerns about residues in milk and food safety. This study aimed to standardize multi-walled carbon nanotubes for use in biological systems and assess the FT-Raman potential to qualitative and quantitative detect nanotubes in bovine fresh milk. MWCNT were oxidized with nitric and sulfuric acids, purified, fragmented, and characterized by Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis, potentiometric titration, and electron microscopy. MWCNT were diluted in bovine fresh milk at 25, 20, 15, 10, 7.5, 5 and 1  $\mu\text{g/mL}$ . FT-Raman spectra of milk and diluted MWCNT were acquired by spectrophotometer under 1064 m laser beam excitation, with 1000 mW of power and 1000 scans. Linear regression was applied to predict the MWCNT concentration in milk based on the normalized *D* band area of MWCNT spectra. Standardized MWCNT presented purity, small size, good structure, and low functional groups over its surface. FT-Raman discriminated the scattering signals of milk components as the MWCNT *D* and *G* bands over 5  $\mu\text{g/mL}$ . However, linear regression analysis had low capability to predict MWCNT concentration in fresh milk. In conclusion, standardization process produces biocompatible MWCNT. In addition, FT-Raman spectroscopy can qualitative detect oxidized MWCNT in bovine fresh milk over 5  $\mu\text{g/mL}$ , without quantitatively predict the concentration.

*Keywords:* Carbon nanotubes, Raman, cow, milk, food safety.

## 1. Introduction

Carbon nanotubes (CNT) are carbon-based nanoparticles composed by one or more concentrically rolled graphene sheets, with diameter ranging in the nanometer scale and length achieving few micrometers (Ijima et al., 1991; Yang et al., 2007). Because of its relatively high surface area and the possibility to add functional groups over its surface, CNT can be solubilized in water and easily interact with other biological molecules to be employed in many fields of science, as biosensor, tissue engineering, drug delivery, cancer, and gene therapy (Lacerda et al., 2007; Liu et al., 2008a; Varkouhi et al., 2011; Shimizu et al., 2012). However, for biological use, CNT should be standardized in size, functionalization, and concentration to avoid toxicity and collateral effects (Sato et al., 2005; Dubin et al., 2008; Ladeira et al., 2010). Small length and functionalized CNT present high solubility in water, good reactivity to other molecules, easy cell penetration and biocompatible to different cell lines *in vitro* (Sato et al., 2005; Dubin et al., 2008, Liu et al., 2008b). Based on this, functionalized CNT is an alternative to conventional vectors for drug delivery systems and has been employed as transfection agent for small interfering RNA into mice and human cell lines for *in vitro* gene silencing (Ladeira et al., 2010; Apartsin et al., 2014).

Endometrial inflammation in postpartum cows characterized by intense inflammatory response, with overexpression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8, can lead to chronic endometritis, impaired fertility, and significant economic losses in dairy herds (Herath et al., 2009a; Sheldon et al., 2009, 2019; Fischer et al., 2010; Pascottini and LeBlanc, 2020). The RNA interference (RNAi) technique, based on functionalized CNT as transfection agent, arises as a promising methodology to control the inflammatory response of the endometrium in postpartum cows affected with chronic endometritis, limiting the gene expression of pro-inflammatory cytokines by endometrial cells. However, the application of CNT-based RNAi methodology in postpartum lactating cows brings concerns about food safety, as milk represents an excretion route for drugs residues in lactating cows. Currently, one of the major problems faced by worldwide dairy industry is the increasing detection of drug residues in milk, due to the indiscriminate use of antibiotics and antiparasitic drugs in dairy herds without veterinary assistance and no respect to the withholding period (Brando et al., 2009; Redding et al., 2014; Tempini et al., 2018). This concern is related to the increasing microbial resistance to antibiotics, which impacts directly in veterinary and human health (Chen et al., 2019).

Studies evaluating the functionalized CNT pharmacokinetics *in vivo* (Ali-Boucetta et al., 2013; Rodriguez-Yañes et al., 2013; Jacobsen et al., 2017) had demonstrated that functionalized nanotubes, intravenously injected in mice, mainly accumulated in liver, spleen and lesser amounts in lung and kidneys, after a high excretion via urine. Through intraperitoneal route, functionalized CNT accumulated in stomach, kidney, bone, blood, spleen, and liver. Oral administration of functionalized CNT in rat results in accumulation in stomach, upper and lower intestines, with higher excretion by feces (Ali-Boucetta et al., 2013; Rodriguez-Yañes et al., 2013; Jacobsen et al., 2017). *In vitro* cell culture studies, using human and mice cell lines, had demonstrated some toxicity effect when CNT were used in higher concentrations (5 to 10 mg/mL) (Pantarotto et al., 2004; Bianco et al., 2005), while smaller ones (20 to 100 µg/mL) had no significant cell damage or toxicity (Kam et al., 2006; Singh et al., 2006; Bottini et al., 2006; Yehia et al., 2007; Ladeira et al., 2010; Firme III and Bandaru, 2010). However, no study has been conducted up to date to assess the pharmacokinetics of a known concentration of functionalized CNT given by intrauterine infusion or its accumulation in udder and elimination through milk.

Recent studies had employed Fourier-Transform Raman spectroscopy (FT-Raman) allied to regression analysis to evaluate milk quality and the presence of possible adulterants like way and starch (Almeida et al., 2011, 2012; El-Abassy et al., 2011; Mazurek et al., 2015; Júnior et al., 2016). FT-Raman is based on the detection of inelastic electromagnetic energy scattering from vibrating molecules, after excitation by a source of electromagnetic energy. The FT-Raman spectra obtained from the transformation of optical interferogram represents the fingerprint of the excited molecule studied (El-Abassy et al., 2011; Suzuki and Buzzini, 2018). In addition, FT-Raman is a rapid, non-destructive and no reagent consuming analytical process because it does not require previous sample preparation, spectrum has fast acquisition, and no damage is made to the sample (Almeida et al., 2011; El-Abassy et al., 2011). Accordingly, the first aim of this study was to standardize multi-walled carbon nanotubes for use in biological systems. Second, this study aimed to evaluate the potential of FT-Raman spectroscopy in qualitative and quantitative detect functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in bovine whole fresh milk.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Standardization and characterization of multi-walled carbon nanotubes*

The MWCNT were produced by chemical vapor decomposition (CVD) and their dimensions range from 10 to 25 nm of diameter and 5 to 30  $\mu\text{m}$  of length. Pristine MWCNT were oxidized by acid reflux using a START Synth Microwave Synthesis Labstation (Milestone, USA). Three grams of MWCNT were added to  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (3:1) and submitted to 15 heating cycles of one minute at 550 W, with 20s intervals. The mixture was neutralized by successive washes in neutral deionized water and dried in air at  $80^\circ\text{C}$  overnight. Oxidized MWCNT were purified according to Pacheco et al. (2015), using ethyl alcohol. Then, purified MWCNT were diluted in deionized water at 1 mg/mL, submitted to sonication for 60 minutes in cold bath, using ultrasound processor with tapered horn tip (Vibra-Cell VCX-500, Sonics and Materials Inc., USA), and dried in air at  $80^\circ\text{C}$  overnight.

Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis, transmission electronic microscopy and potentiometric titration were performed to assess de MWCNT structural quality, purity, length, and presence of functional groups over nanostructure surface (Jorio et al., 2004; Trigueiro et al., 2007; Bokobza and Zhang, 2012; Pacheco et al., 2015). Raman spectroscopy was performed using spectrophotometer (iHR50, Horiba, Japan) with powder pristine and standardized MWCNT samples under argon laser (514 wavelength) at 1 mW potency and 50x microscope magnification. Thermogravimetric analysis was performed by thermal decomposition of powder purified MWCNT in a thermogravimetric device (DTG60, Shimadzu, Japan). Thermal decomposition was performed from room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ) to  $900^\circ\text{C}$ , with heating rate of  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ , in a controlled air atmosphere, with air flow rate of 50 mL/min. For transmission electronic microscopy, purified MWCNT were diluted in deionized water at final concentration of 0.075 mg/mL, sonicated for 10 minutes in ultrasound bath (USC 1850 154W/25kHz, Unique, Brazil) and dripped over a 400-mesh holey carbon grid. The grid was dried in vacuum oven at room temperature for 24 hours before electronic microscopy analysis, which was performed using a Tecnai G<sup>2</sup>20 SuperTwin 200kV microscope (FEI Company, USA) from the UFMG Microscopy Center. For potentiometric titration analysis, 10 mg of powder purified MWCNT were diluted in solution composed of 99 mL potassium chloride (KCl) 0.1 M and 1 mL HCl 0.1 M, under ultrasound bath sonication (USC 1850 154W/25kHz, Unique, Brazil) for 10 minutes. Using a potentiometric titration device (Titrande 808, Metrohm, Brazil) this solution was tittered until reaches pH 11, with infusion of 0.01 mL of NaOH 0.05 M with KCl 0.05 M solution, at time intervals necessary for balance establishment of MWCNT solution. Titration data were analyzed by algorithm based in equations for strong acids titration with weak acids described elsewhere (Masini et al., 1998; Gorgulho et al., 2008).



## 2.2 Bovine fresh milk and milk diluted MWCNT FT-Raman acquisition

Bovine fresh milk samples were harvested from three crossbreed cows (Holstein x Zebu) in a commercial dairy farm. In these milk samples, oxidized MWCNT were diluted in seven different concentrations, namely 25, 20, 15, 10, 7.5, 5 and 1  $\mu\text{g/mL}$ , accordingly with oxidized MWCNT concentration used at *in vitro* cell cultures, cited by literature (Kam et al., 2006; Ladeira et al., 2010). Milk and milk diluted MWCNT samples were aliquoted in 2mL glass vials and sonicated in ultrasound bath for 10 minutes. Prior to analysis, samples were homogenized by inversion for one minute. The FT-Raman spectra of samples were collected on a Vertex 70 FT-Raman Spectrometer (Bruker, USA) using liquid nitrogen as the coolant and excited with a 1064 nm beam from a Nd:YAG laser. Laser light, with 1000 mW power, was introduced and focused on sample and scattered radiation was collected at  $180^\circ$ . Spectrum with 1000 scans were collected at a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  over the range of  $500\text{ to }3100\text{ cm}^{-1}$ . FT-Raman spectrum for isopropanol was acquired as analytical standard. The software OPUS<sup>TM</sup> (Bruker, USA) was used for FT-Raman data acquisition.

## 2.3 Linear modeling for MWCNT detection in liquid fresh milk

The obtained FT-Raman spectra were manipulated using Origin 2019 (OriginLab, USA). All Raman scattering data were normalized and subtracted the baseline. For milk diluted MWCNT samples analysis, the band at  $1286\text{ cm}^{-1}$  wavelength was chosen due to its higher Raman intensity and almost no influence of other scattering band from milk. The band peak was adjusted by Lorentzian correction and band area calculated and normalized to the adjusted band area of standard isopropanol at  $802\text{ cm}^{-1}$  wavelength. The three normalized band areas of a known MWCNT concentration were averaged and analyzed by linear regression model to predict an unknown concentration of MWCNT in fresh milk. The linear regression analysis was performed using Prism 7 (GraphPad Software, USA).

## 3. Results

Pristine and standardized MWCNT had Raman spectra with visible D and G bands near  $1350$  and  $1580\text{ cm}^{-1}$  frequencies, respectively (Figure 1a,b). The ratio between band's intensities (ID/IG) of both samples was lower than 1.0, although ID/IG from standardized MWCNT was higher than pristine. Standardized MWCNT also have a vibrational mod at  $1630$

$\text{cm}^{-1}$  more evident than pristine MWCNT. In thermogravimetric analysis, the standardized MWCNT had homogeneous weight loss, ranging from  $577.31^\circ\text{C}$  to  $645.28^\circ\text{C}$ , with a maximum weight loss rate at  $619.55^\circ\text{C}$  (Figure 1c). The addition of carboxylic acid and phenol groups over MWCNT surface, was evaluated by potentiometric titration and results are presented in Figure 1d. Calculated concentrations for carboxylic acid and phenol groups were  $1.146 \text{ mmol/g}$  and  $1.002 \text{ mmol/g}$  of MWCNT, respectively.

Oxidized MWCNT kept their structural conformation without serious damage (Figure 2a,b). The two most prevalent lengths obtained with sonication process of oxidized MWCNT were  $100\text{-}200 \text{ nm}$  ( $22.21\%$ ) and  $200\text{-}300 \text{ nm}$  ( $20.78\%$ ) (Figure 2c). With sonication process, about  $51.07\%$  of oxidized MWCNT had length under  $300 \text{ nm}$  and  $86.80\%$  under  $700 \text{ nm}$  (Figure 2d).

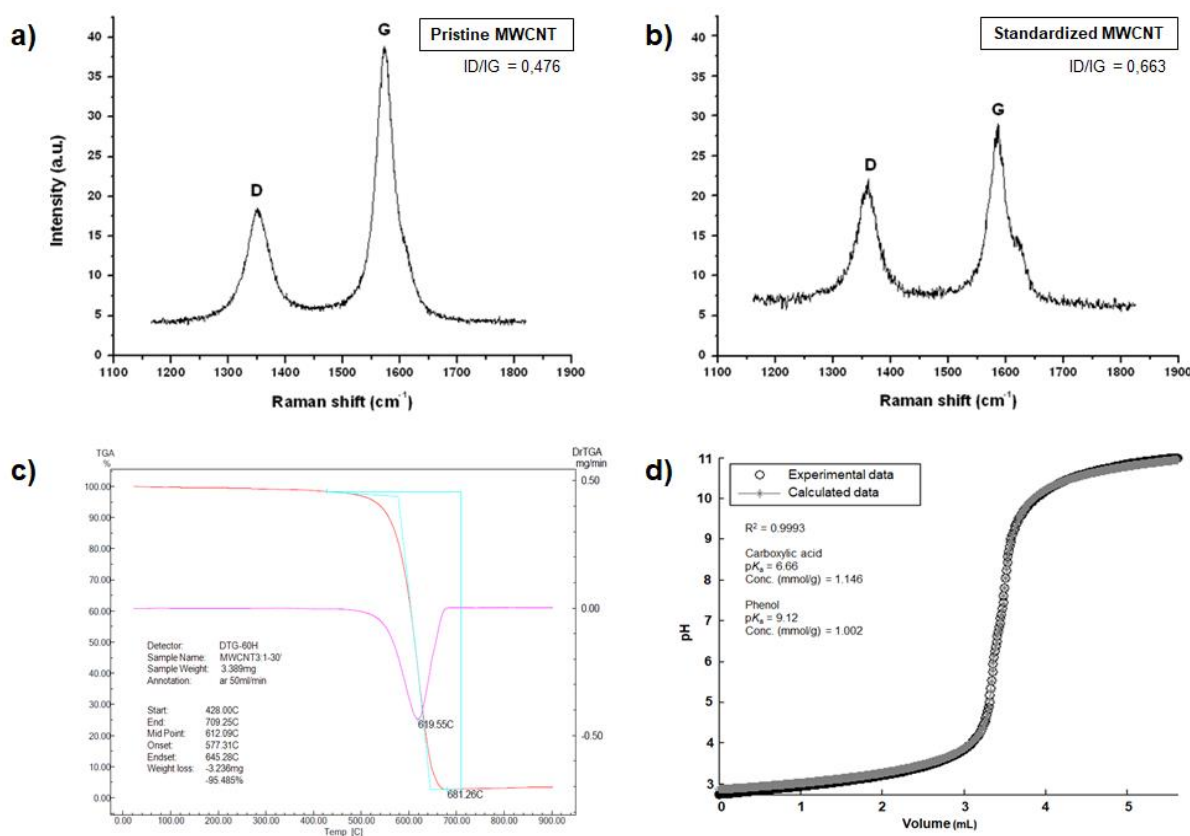


Figure 1. Raman spectra, derivative thermogravimetric analysis and adjusted theoretical and experimental titration curve of standardized MWCNT. a) Raman spectrum of pristine MWCNT; b) Raman spectrum of standardized MWCNT; c) standardized MWCNT thermogravimetric analysis and its derivative (DrTGA); d) adjusted theoretical and experimental titration curve of  $1 \text{ mg/mL}$  MWCNT solution, according to equations for strong acids titration with weak acids (Massini et al., 1998; Gorgulho et al., 2008).

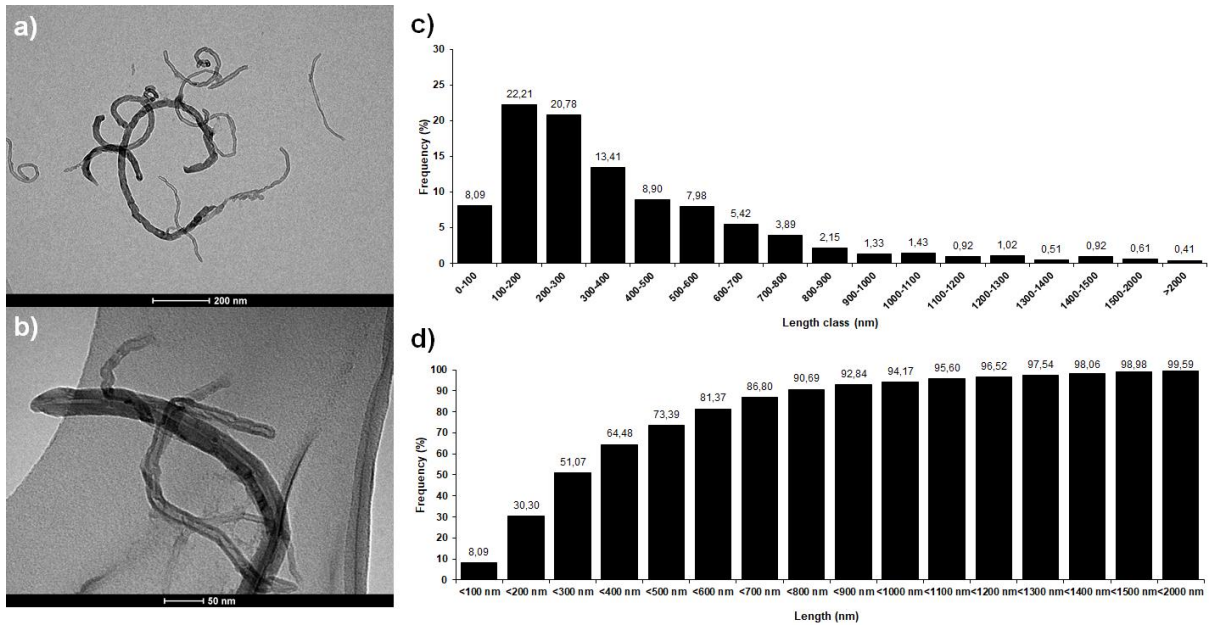


Figure 2. Structural and size characterization of standardized MWCNT. a,b) transmission electron micrographs demonstrating the variety of lengths and diameters of the nanotubes; c) length stratification; and d) total percentage by length of standardized MWCNT.

The FT-Raman spectra for LWFM and milk containing 25  $\mu\text{g/mL}$  of standardized MWCNT are presented in Figure 3. In Raman spectrum for LWFM were observed scattering bands at 2935, 2853, 1655, 1458, 1261, 1122, 1082 and 1003  $\text{cm}^{-1}$  wavelength (Figure 3A). In Raman spectrum for milk diluted MWCNT (Figure 3B), the scattering bands at 2935, 2853, 1452, 1122, 1084 and 1003  $\text{cm}^{-1}$  wavelengths were similar to those observed in milk spectrum. Conversely, scattering band at 1655  $\text{cm}^{-1}$  presented small intensity, which were not observed in the smaller milk diluted MWCNT concentrations spectra (Figure 4), and bands at 1602 and 1288  $\text{cm}^{-1}$  wavelengths had high intensities and were clearly related to the presence of standardized MWCNT diluted in milk.

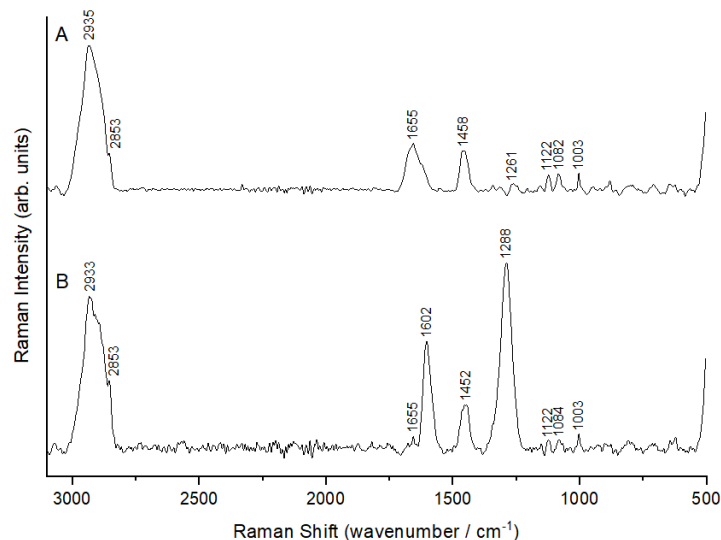


Figure 3. FT-Raman spectra of cow's fresh milk (A) and 25  $\mu\text{g/mL}$  of standardized MWCNT diluted in fresh milk (B). Each spectrum represents the mean value of three repetitions.

Considering only the spectra region comprising 1100 to 1800  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 4), markedly differences were observed between milk and MWCNT dilutions, especially in scattering bands around 1288 and 1602  $\text{cm}^{-1}$ . Higher milk diluted MWCNT concentrations had higher Raman intensities in both bands previously described, while the concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MWCNT diluted in milk had spectrum similar to those presented by LWF. Due to its grater intensity variation among samples with minimal interference of milk bands, the 1288 $\text{cm}^{-1}$  band of each repetition had its area measured and normalized with the 800  $\text{cm}^{-1}$  band area of isopropanol standard.

Every MWCNT dilution had three 1288  $\text{cm}^{-1}$  normalized band areas and the mean area was used to build a linear regression model which are presented in the Figure 5. The  $R^2$  coefficient obtained was 0.879.

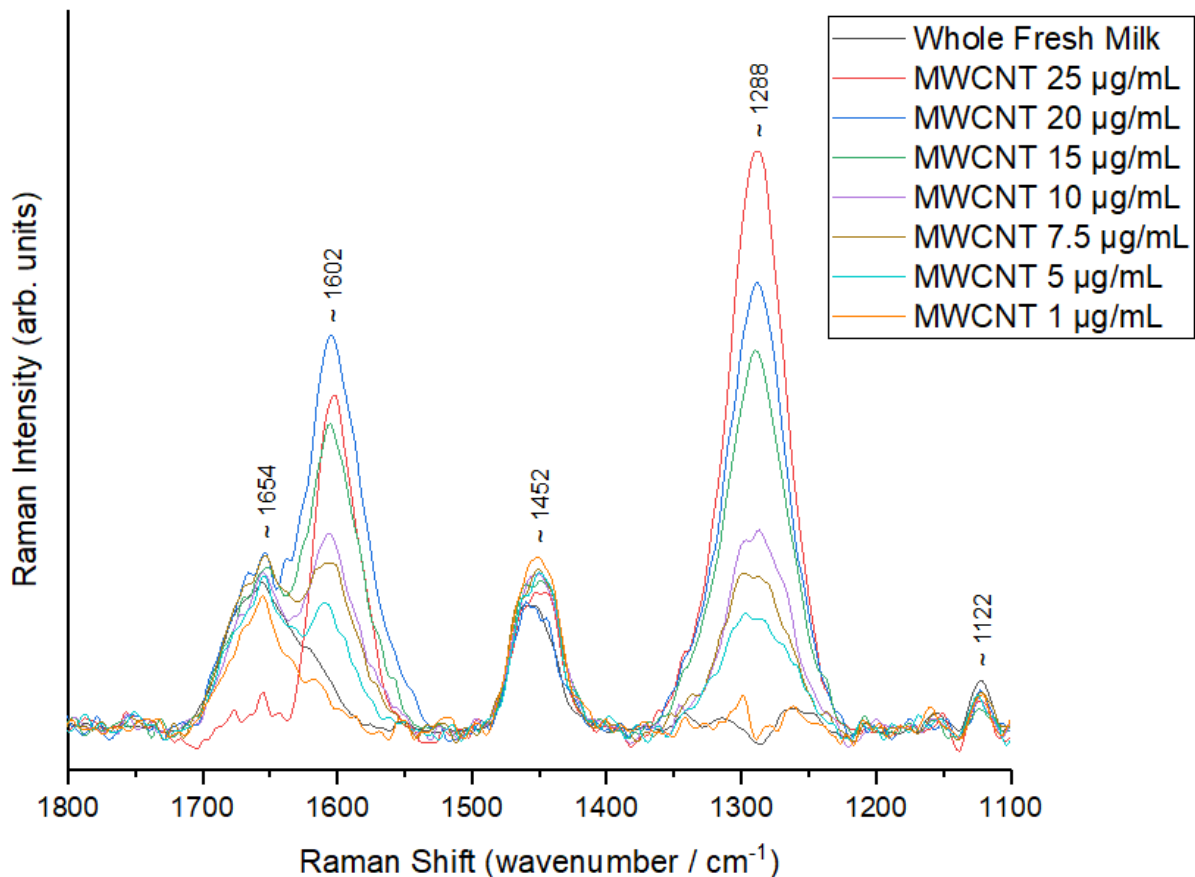


Figure 4. FT-Raman spectra of fresh milk and various MWCNT dilutions in fresh milk. Each spectrum represents the mean value of three repetitions.

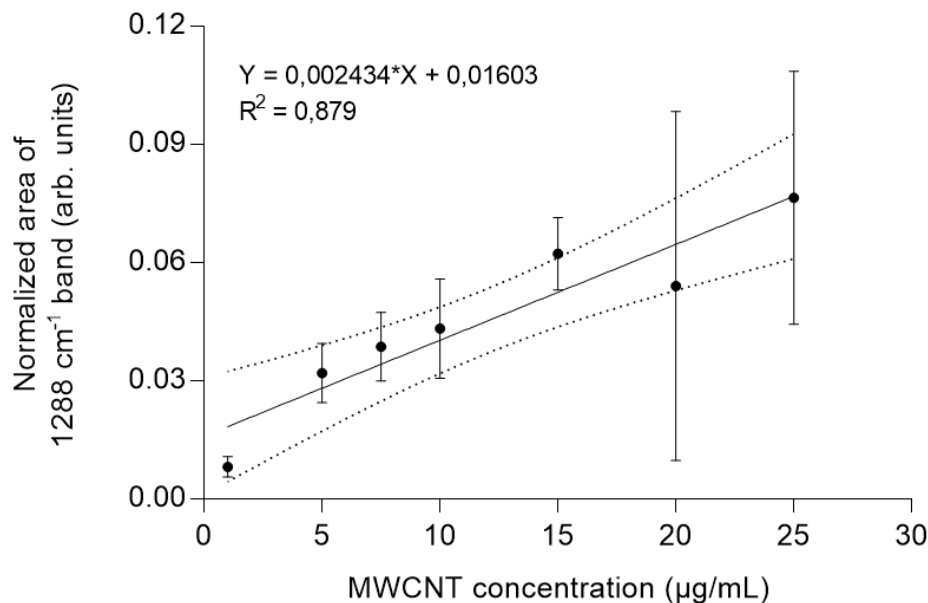


Figure 5. Regression analysis developed to predict an unknown concentration of MWCNT in cow's fresh milk. Each information represents the mean value of three normalized 1288 cm<sup>-1</sup> band areas for a given MWCNT concentration with standard error. Linear regression is presented with tendency line (full line) with 95% confidence interval (dash lines).

#### 4. Discussion

The FT-Raman spectroscopy is a fast analytical tool, which access the vibrational characteristics of molecules, determining in complexes samples, more than one organic and inorganic components at a time, without sample destruction. The growing application of nanotechnologies in disease therapy and food technology rises a worldwide concern about biocompatibility, toxicity, food safety and residual contamination with nanoparticles. To our knowledge, this is the first study that aimed to develop an alternative fast and non-expensive screening methodology using FT-Raman for detection of multi-walled carbon nanotubes, standardized for biological use, in bovine whole fresh milk. FT-Raman spectroscopy associated with linear regression model were able to qualitatively detect the presence of MWCNT in milk over 5µg/mL, but with low capability to quantitatively predict the MWCNT concentration.

Carbon nanotubes are allotropic forms of carbon, and the covalent bond of their carbon atoms makes these nanoparticles insoluble in water, which make their use in biological systems difficult (Datsyuk et al., 2008; Avilés et al., 2009; Varkouhi et al., 2011). Strong acid oxidation is an easy, non-expensive process which adds oxygenated groups, as carboxylic acid and hydroxyl, over CNT surface. These groups can interact with water molecules by hydrogen bonds, turning MWCNT soluble and stable in aqueous medium (Datsyuk et al., 2008; Avilés et al., 2009). In addition, these functional groups are responsible for a non-covalent interaction between the MWCNT and biological molecules (Ladeira et al., 2010).

The MWCNT has vibrational characteristics that can be assessed by Raman scattering spectroscopy. Pristine MWCNT has two distinct bands of intensity in the Raman spectrum, one at  $1350\text{ cm}^{-1}$  wavelength, corresponding to D band, and other at  $1580\text{ cm}^{-1}$  for G band. The D band correspond to vibrational mods of C-C bonds stretch in consequence to disorders in the hexagonal web of the carbon nanotube surface. The G band is associated with vibrational mods of carbon atoms moving tangentially against each other in the hexagonal web, representing the planar integrity of C-C bonds and consequently the integrity of CNT structure (Jorio et al., 2001; Sato et al., 2005; Bokobza and Zhang, 2012). The D band of standardized MWCNT is little higher and G band is lower than the pristine one, which indicates an elevation of CNT structural damages. The oxidation and high potency sonication steps are aggressive to MWCNT structure, making those Raman results expected and in agreement with the standardization process. The reduction in MWCNT integrity is more evident when comparing the ratio between band's intensities (ID/IG) of the two samples. The higher the ID/IG ration, the lesser is the integrity of CNT structure. Raman spectrum of standardized MWCNT also have an evident small band near  $1630\text{ cm}^{-1}$ . This band, known as D' band, represents a C-H bond stretch and its identification in Raman spectrum of standardized MWCNT is correlated to higher proportion of disorder in the nanotube (Bokobza and Zhang, 2012; Bai et al., 2016).

Thermogravimetric analysis is an important technique to evaluate the contents or impurities in MWCNT samples. In a controlled environment of thermal decomposition, MWCNT present decomposition temperatures ranging from  $570$  to  $730^{\circ}\text{C}$ . This temperature range varies according to structure of MWCNT and purity degree of the sample (Trigueiro et al., 2007). In the present study, standardized MWCNT submitted to thermogravimetric analysis had thermal stability until  $550^{\circ}\text{C}$  and decomposition temperature ranging from  $577$  to  $645^{\circ}\text{C}$ . At this interval of temperature,  $95.49\%$  of nanotubes were decomposed, with a maximum mass decomposition rate at  $619^{\circ}\text{C}$ , which agrees with literature information. In addition, low mass decomposition rate was observed between  $200$  and  $400^{\circ}\text{C}$ . Mass losses in this temperature range represent decomposition of some functional groups inserted over CNT surface, including carboxylic acid, hydroxyls, and contaminants like amorphous carbon (Trigueiro et al., 2007; Avilés et al., 2009). This information suggests that standardized MWCNT had high purity and small amounts of functional groups over their surface.

Potentiometric titration was performed to assess the functional groups content over MWCNT surface. This technique can give information about the chemical surface interaction with aqueous solution and the analysis of data by nonlinear regression allow to distinguish acidic groups with different acid ionization constants ( $\text{p}K_a$ ) on the MWCNT surface (Gorgulho

et al., 2008). The MWCNT oxidation with  $\text{HNO}_3$  and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was able to insert carboxylic acid and phenol groups over nanotubes surface. The carboxylic acids present  $\text{p}K_a$  values below 7.0 while phenolic groups present relatively high  $\text{p}K_a$  values, varying between 9.0 and 11.0 (Pacheco et al., 2015). In this study, the  $\text{p}K_a$  values for carboxylic acid and phenol agree with values presented in literature (Masini et al., 1998; Gorgulho et al., 2008; Pacheco et al., 2015). Although the purification process of MWCNT in basic reflux is responsible for elimination of oxidation debris rich in oxygenated groups (Pacheco et al., 2015), the MWCNT oxidized with strong acids and purified in basic reflux presented a low but considerable concentration of carboxylic acid and phenol groups over its surface. The relatively low carboxylic acid concentration over MWCNT surface is desirable for a better biological delivery system based on weak intermolecular interactions between CNT and molecules to be delivered, capable of penetrate plasmatic membrane of cells and promote intracytoplasmic delivery (Ladeira et al., 2010).

Despite the interesting characteristics that CNT have for application in biological delivery system as biocompatibility, low immunogenicity and pro-inflammatory effects, some potential toxicity of CNT is attributed to length of nanotubes, type of functionalization, dosage, duration of exposure, route of administration and tissue distribution (Varkouhi et al., 2011). Beyond the low addition of carboxylic and phenol groups over MWCNT surface, with a well-known biocompatibility and low *in vitro* cytotoxicity to murine and human cells lineage (Dubin et al., 2008; Ladeira et al., 2010) and bovine embryos (Munk et al., 2016), the oxidized MWCNT used in this study was submitted to high potency sonication to achieve small lengths. The delivery efficiency depends on the capability of CNT to get through plasmatic membrane of target cells, and this is related to CNT length and structure. Individualized CNT with lengths ranging from 100 to 200 nm are more easily internalized by cells in relation CNTs with lengths above 800 nm (Sato et al., 2005). Small CNT can be internalized without energy expenditure while higher CNT or nanotube agglomerate requires internalizations process with spend of energy (Firme III and Bandaru, 2010). In addition, small length CNT are related to less cells damage when compared CNT with length around 1000 nm or higher (Sato et al., 2005; Franchi et al., 2012). The sonication methodology applied in this studied were able to provide high proportion of oxidized MWCNT with length ranging from 100 to 300 nm, and high percentage of nanotubes under 700 nm of length, without serious damage in their structure. Therefore, the high potency sonication of oxidized MWCNT provided small length nanotubes with few carboxylic and phenol functional groups attached to surface. These characteristics agree with a

good vector for biological delivery system with minimal collateral effects over target cells (Firme III and Bandaru, 2010; Ladeira et al., 2010).

The FT-Raman spectrum of LWFMM observed in this study agrees with studies that also employed liquid milk (El-Abassy et al., 2011) and whole milk powder (Almeida et al., 2011; Júnior et al., 2016). The bands at 2935 and 2853  $\text{cm}^{-1}$  are related to the asymmetric ( $\nu_{\text{ass}}$ ) and symmetric ( $\nu_{\text{s}}$ )  $\text{CH}_2$  stretching modes, respectively. These (C-H) stretch is related to the milk's fatty acids content, and the prominent intensity of the symmetric  $\text{CH}_2$  stretch band at 2853  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic of milk with higher fat content. The band at 1655  $\text{cm}^{-1}$  correspond to association between  $\nu(\text{C}=\text{O})$  stretching of amide I mode from milk proteins and  $\nu(\text{C}=\text{C})$  *cis* double bond stretching from the unsaturated fatty acids. The band observed at 1458  $\text{cm}^{-1}$  are correlated to the carbohydrate content of milk and represents the  $\delta(\text{CH}_2)$  scissoring  $\text{CH}_2$  deformation. The bands observed in the LWFMM under the 1280  $\text{cm}^{-1}$  are related to carbohydrates. The band at 1261  $\text{cm}^{-1}$  correspond to the  $\gamma(\text{CH}_2)$  twisting mode, the 1122 to 1082  $\text{cm}^{-1}$  correspond to associations between  $\nu(\text{C}-\text{O})$  and  $\nu(\text{C}-\text{C})$  stretching modes and  $\gamma(\text{C}-\text{O}-\text{H})$  twisting modes. The band observed at 1003  $\text{cm}^{-1}$  are related to the ring-breathing mode of the phenylalanine amino acid present in milk. The weak and unidentified bands under 1000  $\text{cm}^{-1}$  are related to  $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$  and  $\delta(\text{C}-\text{C}-\text{O})$  scissoring modes, and the presence of glucose and lactose (Almeida et al., 2011; El-Abassy et al., 2011; Júnior et al., 2016).

Beyond LWFMM scattering bands, the two most important bands in the milk diluted MWCNT spectra are identified in 1602 and 1288  $\text{cm}^{-1}$  wavelengths. The first represents the *G* band, resulted from the aromatic  $\nu(\text{C}=\text{C})$  stretching modes of the MWCNT (Jorio et al., 2004; Nelson et al., 2007; Bokobza and Zhang, 2012). The second band represents the *D* band, resulted from the vibrational mode of the  $\nu(\text{C}-\text{C})$  stretching modes of the MWCNT, when disorders of the hexagonal web is present (Jorio et al., 2004). This *D* scattering band is also resultant from the surface deformation vibrational mode of (O-H) group and  $\nu(\text{C}-\text{O})$  carboxyl group stretching, due to addition of carboxylic and phenolic functional groups over MWCNT during oxidation process (Sato et al., 2005; Sekar et al., 2015). The higher intensity and displacement of *D* band observed in FT-Raman spectra of milk diluted MWCNT is explained by the energy of the laser beam used to excite the sample. Herein were used a Nd:YAG laser beam with 1064 nm and 1000 mW. Due to the dispersive behavior of the MWCNT *D* band according to the incident laser energy, the lower laser energy employed to acquire the FT-Raman spectra lead to an increasing *ID/IG* ratio and displacement in the *D* band from 1350  $\text{cm}^{-1}$  to 1288  $\text{cm}^{-1}$ . These findings agree with information described in literature (Brown et al., 2001; Pimenta et al., 2001; Bokobza and Zhang, 2012; Bokobza et al., 2015).



The observed intensity of *D* band in RT-Raman spectra of milk diluted MWCNT decreased as the known MWCNT concentration also decreased. Based on this, a linear regression analysis was performed to establish the relation between MWCNT concentration in milk and its normalized *D* band area signal in the FT-Raman spectra. This approach was employed in pharmaceutical study to develop and validate a direct, non-destructive quantitative method to detect drugs using FT-Raman spectroscopy (De Beer et al., 2014). Although the intensity variation observed between the different MWCNT dilutions in milk, the linear regression model established had a poor capability to predict the presence and concentration of MWCNT in unknown milk samples, especially when liquid milk samples can have MWCNT concentrations under than 5  $\mu\text{g/mL}$ . Disadvantage of this model can be observed comparing LWFM and MWCNT 1  $\mu\text{g/mL}$  dilution Raman spectra in Figure 4. Both spectra had minimum differences around 1300 – 1288  $\text{cm}^{-1}$  and it turns difficult the assessment of *D* band area to apply in the linear regression model and predict MWCNT concentration. Under 1  $\mu\text{g/mL}$  MWCNT concentration, the *D* band area assessment becomes even more difficult, so the concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$  was considered the qualitative detection threshold of the FT-Raman technique to identify MWCNT diluted in bovine whole fresh milk.

#### 4.1 Conclusion

In conclusion, the standardization process based on strong acid oxidation, purification, and high potency sonication can produced MWCNT with characteristics compatible with use in biological systems. In addition, FT-Raman spectroscopic is a rapid, non-destructive and non-expensive technique with potential application in the qualitative detection of concentrations higher than 5  $\mu\text{g/mL}$  of oxidized MWCNT diluted in cow's liquid whole fresh milk. However, the linear regression model based on normalized *D* band area from FT-Raman spectra of milk diluted MWCNT presented low capacity for quantitative prediction of the concentration of MWCNT in liquid milk.

#### Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG-CVZ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas, Brazil, Grant number APQ - 01591-14). PPN, MRA, CFL, CAF, LOL, AJV and RLS have fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). FGP works as researcher in MG Graphene Project –

CDTN/UFMG/CODEMGE (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Universidade Federal de Minas Gerais/Companhia de Desenvolvimento Econômico de Minas Gerais). RKFGO works as process technician at CTNano - UFMG (Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno - Universidade Federal de Minas Gerais).

### Competing Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this work.

### References

- Ali-Bouceta, H., Kostarelos, K., 2013. Pharmacology of carbon nanotubes: toxicokinetics, excretion and tissue accumulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 2111-2119.
- Almeida, M.R., Oliveira, K.S., Stephani, R., et al., 2011. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. *J. Raman Spectrosc.* 42, 1548-1552.
- Almeida, M.R., Oliveira, K. S., Stephani, R., et al., 2012. Application of FT-Raman spectroscopy and chemometric analysis for determination of adulteration in milk powder. *Anal. Lett.* 45, 2589-2602.
- Aspartisin, E.K., Buyanova, M.Y., Novopashina, D.S., et al., 2014. Novel multifunctional hybrids of single-walled carbon nanotubes with nucleic acids: synthesis and interactions with living cells. *Appl. Mater. Interfaces.* 6, 1454-1461.
- Avilés, F., Cauich-Rodríguez, J.V., Moo-Tah, L., et al., 2009. Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization. *Carbon.* 47,2970-2975.
- Bai, W., Raghavendra, A., Podila, R., et al., 2016. Defect density in multiwalled carbon nanotubes influences ovalbumin adsorption and promotes macrophage activation and CD4<sup>+</sup>T-cell proliferation.
- Bianco, A., Kostarelos, K., Partidos, C.D., et al., 2005. Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 5, 571.
- Bokobza, L., Zhang, J., 2012. Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. *eXPRESS Polym. Lett.* 6, 7, 601-608.
- Bokobza, L., Bruneel, J., Couzi, M., 2015. Raman spectra of carbon-based materials (from graphite to carbon black) and some silicone composites. *C.* 1, 77-94.
- Bottini, M., Bruckner, S., Yang, D., et al., 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T-lymphocyte apoptosis. *Toxicol. Lett.* 160, 121-126.

- Bando, E., Oliveira, R.C., Ferreira, G.M.Z., et al., 2009. Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Paraná, Brazil. *J. Food. Prot.* 72,4,911-914.
- Brown, S.D.M., Jorio, A., Dresselhaus, M.S., et al., 2001. Observations of the D-band feature in the Raman spectra of carbon nanotubes. *Phys. Rev. B.*, 64, 073403.
- Chen, J., Ying, G., Deng, W., 2019. Antibiotic residues in food: extraction, analysis, and human health concerns. *J. Agric. Food Chem.* 67, 7569-7586.
- Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., et al., 2008. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon.* 46, 833-840.
- De Beer, T.R.M., Vergote, G.J., Baeyens, W.R.G., et al., 2004. Development and validation of a direct, non-destructive quantitative method for medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension using FT-Raman spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23, 355-362.
- Dubin, R.A., Callegari, G.C., Kohn, J., et al., 2008. Carbon nanotube fibers are compatible with mammalian cells and neurons. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 7, 1, 11-14.
- El-Abassy, R.M., Eravuchira, P.J., Donfack, P., et al., 2011. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 56, 3-8.
- Firme III, C.P., Bandaru, P.R., 2010. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine.* 6, 245-256.
- Fischer, C., Drillich, M. Oda, S., 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 818-829.
- Franchi, L.P., Santos, R.A., Matsubara, E.Y., et al., 2012. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. *Quim. Nova.* 35, 3, 571-580.
- Gorgulho, H.F., Mesquita, J.P., Gonçalves, F., et al., 2008. Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption. *Carbon.* 46, 1544-1555.
- Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., et al., 2009a. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 1-13.
- Ijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* 354, 56-58.
- Jacobsen, N.R., Moller, P., Clausen, P.A., et al., 2017. Biodistribution of carbon nanotubes in animal models. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 121, 30-43.
- Jorio, A., Saito, R., Hafner, J.H., et al., 2001. Structural (n, m) determination of isolated single-wall carbon nanotubes by resonant Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* 86, 6, 1118-1121.

- Jorio, A., Saito, R., Dresselhaus, G., et al., 2004. Determination of nanotubes properties by Raman spectroscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 362, 2311-2336.
- Júnior, P.H.R., Oliveira, K.S., Almeida, C.E.R., et al., 2016. FT-Raman and chemometric tools for rapid determination of quality parameters in milk powder: classification of samples for the presence of lactose and fraud detection by addition of maltodextrin. *Food Chem.* 196, 584-588.
- Kam, N.W.S., Liu, Z., Dai, H., 2006. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew. Chem.*, 45, 577.
- Lacerda, L., Raffa, S., Prato, M., et al., 2007. Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics. *Nanotoday*, 2, 6, 38-43.
- Ladeira, M.S., Andrade, V.A., Gomes, E.R.M., et al., 2010. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology*. 21, 385101.
- Liu, Z., Chen, K., Davis, C., et al., 2008a. Drug delivery with carbon nanotubes for *in vivo* cancer treatment. *Cancer Res.* 68, 16, 6652-6660.
- Liu, Z., Davis, C., Cai, W., et al., 2008b. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *PNAS*, 105, 5, 1410-1415.
- Masini, J.C., Abate, G., Lima, E.C., et al., 1998. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Anal. Chim. Acta.* 364, 223-233.
- Mazurek, S., Szostak, R., Czaja, T., et al., 2015. Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. *Talanta.* 138, 285-289.
- Munk, M., Camargo, L.S.A., Quintão, C.C.R., et al., 2016. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine.* 12, 1151-1159.
- Nelson, D.J., Rhoads, H., Brammer, C., 2007. Characterizing Covalently Sidewall-functionalized SWCNTs. *J. Phys. Chem.* 111, 17872-17878.
- Pacheco, F.G., Cotta, A.A.C., Gorgulho, H.F., et al., 2015. Comparative temporal analysis of multiwalled carbon nanotube oxidation reactions: evaluating chemical modifications on true nanotube surface. *Appl. Surface Sci.* 357, 1015-1023.
- Pantaroto, D., Singh, R., McCarthy, D., et al., 2004. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew. Chem.* 43, 5242-5246.
- Pascottini, O.B., LeBlanc, S.J., 2020. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology.* 150, 193-200.
- Pimenta, M.A., Jorio, A., Brown, S.D.M., et al., 2001. Diameter dependence of the Raman D-band in isolated single-wall carbon nanotubes. *Phys. Rev. B.* 64, 041401(R).

- Redding, L.E., Cubas-Delgado, F., Sammel, M.D., et al., 2014. Antibiotic residues in milk from small dairy farms in rural Peru. *Food Addit. Contam. Part A*. 31, 6, 1001-1008.
- Rodriguez-Yañez, Y., Muñoz, B., Albores, A., 2013. Mechanisms of toxicity by carbon nanotubes. *Toxicol. Mech. Methods* 23, 3, 178-195.
- Sato, Y., Yokoyama, A., Shibata, K., et al., 2005. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Mol. BioSyst.* 1, 176-182.
- Sekar, G., Kandiyil, S.T., Sivakumar, A., et al., 2015. Binding studies of hydroxylated multi-walled carbon nanotubes to hemoglobin, gamma globulin and transferrin. *J. Photochem. Photobiol. B*. 153, 222-232.
- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., et al., 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81, 1025-1032.
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Bromfield, J.J., 2019. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 361-384.
- Shimizu, M., Kobayashi, Y., Mizoguchi, T., et al., 2012. Carbon nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. *Adv. Mater.* 24, 2176-2185.
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., et al., 2006. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 3357.
- Suzuki, E.M., Buzzini, P., 2018. Applications of Raman Spectroscopy in forensic Science. I: Principles, comparison to infrared spectroscopy, and instrumentation. *Forensic Sci. Rev.* 30, 111-135.
- Tempini, P.N., Aly, S.S., Karle, B.M., et al., 2018. Multidrug residues and antimicrobial resistance patterns in waste milk from dairy farms in central California. *J. Dairy Sci.* 101, 8110-8122.
- Trigueiro, J.P.C., Silva, G.G., Lavall, R.L., et al., 2007. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM, and SEM methods. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1-10.
- Varkouhi, A.K., Foillard, S., Lammers, T., et al., 2011. SiRNA delivery with functionalized carbon nanotubes. *Int. J. Pharm.* 416, 419-425.
- Yang, W., Thordarson, P., Gooding, J.J., et al., 2007. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*, 18, 412001.
- Yehia, H.N., Draper, R.K., Mikoryak, C., et al., 2007. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J. Nanobiotechnol.* 5:8, 1-17.

## CAPÍTULO II

### Use of carbon nanoparticles and dexamethasone to downregulate inflammatory response in bovine endometrial cells *in vitro*

Philippe Pimenta Nunes<sup>1</sup>, Flávia Gonçalves Pacheco<sup>2</sup>, Camila Eckstein<sup>1</sup>, Juliana Pinto da Silva Mol<sup>1</sup>, Marina de Souza Ladeira<sup>3</sup>; Clascídia Aparecida Furtado<sup>2</sup>, Luiz Orlando Ladeira<sup>4</sup>, Ado Jorio de Vasconcelos<sup>4</sup>, Tatiane Alves da Paixão<sup>5</sup>, Antônio de Pinho Marques Júnior<sup>1</sup>, Ian Martin Sheldon<sup>6</sup>, Renato Lima Santos<sup>1</sup>Álan Maia Borges<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Química de Nanoestruturas de Carbono, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>6</sup>Institute of Life Science, Swansea University Medical School, Swansea University, Singleton Park, Swansea, United Kingdom.

\*E-mail: [alanmborges@hotmail.com](mailto:alanmborges@hotmail.com)

#### ABSTRACT

The goal of this study was to control the LPS-induced inflammatory response in bovine endometrial cells *in vitro*, by downregulating the expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8, using RNAi for MyD88 and CNT as transfection agents, fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> and dexamethasone. Bovine endometrial cells were cultured with LPS and transfected with MWCNT-MyD88 siRNA complex to silence the MyD88 expression and downregulate the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 cytokines. LPS-stimulated endometrial cells were also cultured with 1, 10 and 50 nM of fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> or 0.5, 5 and 50 ng/mL of dexamethasone to control de endometrium expression of pro-inflammatory cytokines aforementioned. MWCNT-MyD88 siRNA complexes were not able to silence the MyD88 expression even downregulate the expression of pro-inflammatory cytokines analyzed ( $P > 0.05$ ). Fullerol at 10 and 50 nM downregulated the expression of IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ), while dexamethasone at 50ng/mL downregulated the expression of IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) and IL-6 ( $P < 0.05$ ) by LPS-stimulated endometrial cells. In conclusion, MWCNT-MyD88 siRNA complexes were not able to downregulate MyD88 expression or pro-inflammatory cytokines expression by LPS-stimulated endometrial cells *in vitro*. However standardized MWCNT do not induced inflammatory response being biocompatible to bovine endometrial cells. Fullerol downregulation of IL-1 $\beta$  and dexamethasone downregulation of IL-1 $\beta$  and IL-6

*in vitro* confirm their potential use as anti-inflammatory agents for control of LPS-induced inflammatory response in bovine endometrium.

*Keywords:* Carbon nanoparticles, siRNA, dexamethasone, inflammation, endometrium, cattle.

## 1. Introduction

Advances in nanobiotechnology allowed the development of wide variety of methods applying nanoparticles in biological systems for biosensing (Aldewachi et al., 2018), diagnostics (Kong et al., 2017), tissue engineering (Zhao et al., 2013; Shadjou et al., 2018), drug delivery (Im et al., 2010; Hussain and Hussain, 2015), gene and cancer therapy (Huang et al., 2006; Ladeira et al., 2010). A promising approach is gene therapy by RNA interference (RNAi) using nanoparticles as transfection agents. RNAi is based on the degradation of the mRNA of a target gene and prevention of translation for the encoded protein by intracellular transfection of small interfering RNA (siRNA), which sequence is complementary to the target gene mRNA sequence (Xin et al., 2017).

Most of the transfection agents used for siRNA delivery are based on liposomal or viral vectors, which have transfection efficiency varying according to the target cell type, reactivity to siRNA, nature, and potential ability of the vectors to induce inflammation or cytotoxicity (Cherukuri et al., 2006; Dubin et al., 2008; Liu et al., 2008). Carbon nanotubes (CNT) are needle shaped nanostructures composed by one or more rolled sheets of carbon atoms covalently bonded in a hexagonal arrangement (Ijima et al., 1991; Yang et al., 2007). Their relatively large surface area and possibility to add functional groups over its surface, make functionalized CNT water-soluble, reactive to biomolecules and biocompatible with various cell types, with low cytotoxicity and immunogenicity (Dubin et al., 2008; Ladeira et al., 2010; Munk et al., 2016). These characteristics make CNT excellent vectors for drug delivery and cell transfection agent to be employed with RNAi protocols.

Bacterial colonization of uterus is a common process in postpartum cows and an efficient inflammatory response must be developed by the endometrium to control the infection and restore normal uterine physiology (Noletto et al., 2017; Sheldon et al., 2019). Intense endometrial inflammatory responses in the postpartum, with toll-like receptors (TLR) stimulation and overexpression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8, can lead to chronic endometritis, impaired fertility, and economic losses in dairy herds (Herath et al., 2009; Sheldon et al., 2009; Fischer et al., 2010; Pascottini and LeBlanc, 2020). This

cytokines overexpression can be downregulated using RNAi to silence gene expression of myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), an essential intracellular transducer of the TLR-dependent signaling pathways (Fitzgerald et al., 2001; Akira et al., 2006; Cronin et al., 2012).

Another carbon-based nanoparticle with a ball-like polyhedral structure and potential application for controlling inflammatory responses is the fullerene C<sub>(60)</sub> (Kroto et al., 1991; Jin et al., 2017). When functionalized, fullerene becomes a water-soluble, biocompatible nanoparticle known as fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(n)</sub>, which has antioxidant (Yang et al., 2014; Schkova et al., 2017; Pei et al., 2019), antimicrobial (Aoshima et al., 2009; Al-Jumali et al., 2017), anti-inflammatory (Roursgaard et al., 2008; Liu et al., 2013; Jin et al., 2017), and antitumor properties (Bernardes et al., 2015). Fullerol anti-inflammatory effect is related to reduction of reactive oxygen species (ROS), downregulation of genes encoding inflammasome proteins and suppressing the synthesis of TNF- $\alpha$ -induced pro-inflammatory cytokines such IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-17 (Liu et al., 2013; Jin et al., 2017). Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties of fullerol can be extremely beneficial to control uterine infection and inflammation in post-partum cows.

The steroid hormone glucocorticoid is known to be a powerful anti-inflammatory agent and possibly can be used as local drug to control the endometrial inflammatory response in cattle with no cytotoxicity effect (Saut et al., 2014; Dong et al., 2018). Glucocorticoids suppress the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8, cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), by inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways and deacetylation of nuclear histones, avoiding transcription of pro-inflammatory genes (Torres et al., 2012; Dong et al., 2018).

The goal of this study was to control the LPS-induced inflammatory response in bovine endometrial cells *in vitro*, by downregulating the expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8, using RNAi for MyD88 and CNT as transfection agents, fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> and dexamethasone.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Ethical statement*



Experimental procedures employed in this study have been previously approved by the Universidade Federal de Minas Gerais Ethical Committee (CEUA-UFMG), under protocol number 409/2018.

## 2.2 Carbon nanotubes

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) produced by chemical vapor decomposition (Kumar and Ando, 2010; Prasek et al., 2011) and diameter ranging from 10 to 25nm were standardized for biological use as methodology described by Nunes et al., (data not published). MWCNT were oxidized with nitric and sulfuric acids (3:1), under microwave acid reflow system (START Synth Microwave Synthesis Labstation, Milestone, USA). Reflow system were submitted to 15 heating cycles of one minute at 550 W, intercalated with 20 seconds of rest, and then neutralized by successive washes in neutral deionized water until overnight air dried at 80°C. Oxidized MWCNT were purified by basic reflux (NaOH 2M; HCl 1M) and final wash with ethanol until vacuum dried at 150°C for three days, as described by Pacheco et al. (2015). Then, MWCNT were diluted in deionized water at 1.0 mg/mL and shortened by sonication with ultrasound processor with tapered horn tip for 60 minutes in cold bath (Vibra-Cell VCX-500, Sonics and Materials Inc., USA). Nanotube's characterization was performed by Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis, transmission electron microscopy, and potentiometric titration (Jorio et al., 2004; Trigueiro et al., 2007; Bokobza and Zhang, 2012; Pacheco et al., 2015). Briefly, MWCNT presented good Raman spectrum with ID/IG ratio of 0,663, homogeneous mass loss between 577 and 645°C with high purity in thermal decomposition analysis, surface carboxylic and phenolic groups concentrations of 1.146 and 1.002mmol/g, and 51.07% and 86.80% of MWCNT fragments under 300 nm and 700 nm, respectively (Nunes et al., data not published). After standardization of MWCNT, the work solution of carbon nanotubes was prepared by dissolving MWCNT in deionized water, at final concentration of 0.3 mg/mL. This solution was autoclaved at 121°C by 15 minutes and stored at room temperature for further use in cell culture.

## 2.3 Endometrial cells primary culture

For primary culture of endometrial cells, six non-pregnant reproductive tracts from post-pubertal crossbreed heifers (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*) at metestrus, without macroscopic signs of inflammation, were obtained at a local slaughterhouse and transported on

ice for further processing in the laboratory. Metestrus was identified according to Ireland et al. (1980). Reproductive tracts were externally washed with ethanol 70% and the uterine horn tip, ipsilateral to the corpus hemorrhagicum, was cut off to insert a Foley catheter with balloon. According with Skarzynski et al. (2000) and Oguejiofor et al. (2015) methodologies with adaptation, the uterine lumen was washed by infusion and recovery of 40 mL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma Aldrich, USA) supplemented with 100 IU/mL of penicillin (GE Healthcare, USA), 100 IU/mL of streptomycin (GE Healthcare, USA), 2.5 µg/mL of amphotericin B (Life Technologies, USA), and 0.1% of bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, USA). After washes, 40 mL of a HBSS solution supplemented with 0.05% collagenase type I (Gibco, USA) and 0.1% BSA was infused. This enzymatic solution was kept within uterus for 40 minutes, recovered into a sterile 50 mL centrifuge tube and incubated for 75 minutes at 37°C, under gentle shaking. The solution was filtered with sterile strainer and washed three times with RPMI-1640 (Sigma Aldrich, USA) culture medium. Medium was supplemented with 100 IU/mL of penicillin, 100 IU/mL of streptomycin, 2.5 µg/mL of amphotericin B, and 0.1% of BSA. Washes were performed under 100 x g centrifugation for 10 minutes. The concentration of viable endometrial cells was assessed by trypan blue staining using a Neubauer chamber. A total of  $6.0 \times 10^5$  endometrial cells/well were seeded at six-well cell culture plates (Sarstedt, Germany) with RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% of heat-inactivated, 0.22 µm filtered, and endotoxin-free fetal bovine serum (FBS – Life Technologies, USA), 100 IU/mL of penicillin, 100 IU/mL of streptomycin, 2.5 µg of amphotericin B and 100 µg/ml of amikacin (Novafarma, Brazil). Culture plates were incubated in humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C. The culture medium was substituted for fresh medium every 48 hours until cultures reached at least 90% confluence.

#### *2.4 Endometrial cells phenotyping by immunocytochemistry*

Immunocytochemistry was performed to phenotype cell populations in culture. Endometrial cells at 90% cell confluence were washed with PBS and fixed within the six well plates, using cold methanol (-20°C) and air dried for 5 minutes. Cells were incubated for 1 hour with block solution composed by 5% skim powder milk in PBS. Epithelial and stromal cells were identified by specific primary antibodies for cytokeratin and vimentin, respectively. Primary antibodies used was AE1/AE3 pan-Cytokeratin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA), raised in IgG<sub>1k</sub> mice to detect cytokeratin in mouse, rat, human, bovine, and rabbit epithelial cells, and RV202 vimentin monoclonal antibody (Santa Cruz

Biotechnology, USA), raised in IgG<sub>1k</sub> mice to detect vimentin in mouse, rat, human and bovine mesenchymal cells. Primary antibodies were diluted in PBS at 1:100 and incubated overnight at 4°C. Secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) was incubated for 45 minutes and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (K8023, Dako, USA) was used to reveal the immunolabelling. Negative control was performed with PBS replacing primary antibodies. Cells were counter-stained with hematoxylin. Between steps, the endometrial cells were always washed twice with PBS. The immunocytochemistry was analyzed using an inverted light microscope (DMIL LED, Leica, Germany).

### *2.5 Small interfering RNA (siRNA) complexes*

The siRNA targeting bovine MyD88 was designed and synthesized by Dharmacon siDESIGN Center (GE Healthcare Dharmacon Inc., USA) and its duplex sense (ACGAAUACCUGCAAAGCAAUU) and antisense (UUGC UUUGCAGGUAUUCGUUU) sequences were based on NCBI (Ref Seq NM 001014382.2) and Cronin et al. (2012).

Endometrial cells were transfected with standardized MWCNT or lipofectamine (RNAiMAX Reagent, Invitrogen, USA) in association with MyD88 siRNA. MWCNT-siRNA duplex complexes were formed by adding 50 pmol of custom ON-TARGETplus MyD88 siRNA (GE Healthcare Dharmacon Inc., USA) to 167 µL of MWCNT 0.3 mg/mL solution and 333 µL of Opti-MEN I Reduced Serum Media (Gibco, USA), without antibiotics, in a sterile RNase/DNase free microtube (Axygen, USA) protected from light. Microtube was submitted to ultrasound bath sonication for 30 minutes, at room temperature, for better dispersion of complexes.

Lipofectamine-siRNA duplex complexes were formed by adding 50 pmol of custom ON-TARGETplus MyD88 siRNA to 492,5 µL of Opti-MEN I Reduced Serum Media, without antibiotics, and 7.5 µL of RNAiMAX Reagent in a sterile microtube and submitted to sonication for 30 minutes at room temperature. For silencing controls, 50 pmol of ON-TARGETplus non-targeting pool siRNA (GE Healthcare Dharmacon Inc., USA) was used. Endometrial cells at 90% of confluence, were cultured with 500 µL of MWCNT-siRNA or lipofectamine-siRNA solution added of 1.5 mL of RPMI-1640 culture medium supplemented with FBS and antibiotics (Ladeira et al., 2010; Croning et al., 2012). The final concentration in the culture medium for targeting and non-targeting siRNA was 25 pmol/mL (25 nM), 25 µg/mL for MWCNT and 3.75 µL/mL for lipofectamine RNAiMAX Reagent.

## 2.6 Endometrial cell culture treatments

### 2.6.1 MWCNT and lipofectamine as potential endometrial inflammation agents

To investigate the transfection agents as endometrial inflammatory response inducers, endometrial cells were treated as following: i) control culture medium; ii) medium with 1.0 µg/mL ultrapure LPS from *E. coli* 0111:B4 (Invivogen, USA); iii) medium containing MWCNT 25 µg/mL; and iv) medium containing 3.75 µL/mL lipofectamine RNAiMAX Reagent. Each treatment was performed for 24 hours, using cells isolated from at least six independent animals and they were replicated at least twice. At the end of experiment, cells were processed for RNA extraction and real time quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to assess the MyD88, IL-1β, IL-6 and CXCL8 transcription.

### 2.6.2 MyD88 gene silencing

To investigate MyD88 siRNA silencing efficiency and MWCNT efficiency as a transfection agent compared to standardized lipofectamine vector, endometrial cells were treated as following: i) control culture medium; ii) medium supplemented with 1.0 µg/mL LPS; iii) MWCNT-MyD88 siRNA complexes; iv) MWCNT-non-targeting siRNA complexes; v) lipofectamine-MyD88 siRNA complexes; and vi) lipofectamine-non-targeting siRNA complexes. Treatments including MWCNT or lipofectamine were conducted in duplicates for stimulation with 1.0 µg/mL LPS and treatment self-control. For cells stimulated with LPS, it was added to culture medium at 18 hours post-transfection and stimulation lasts for 6 hours, with a total experiment period of 24 hours. Each treatment was performed using cells isolated from at least five independent animals and were conducted in duplicates.

### 2.6.3 Fullerol as anti-inflammatory nanoparticle for endometrial cells

Fullerol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> was used to investigate its potential anti-inflammatory effect on bovine endometrial cells stimulated with LPS. Endometrial cells were treated as following: i) control culture medium; ii) medium supplemented with 1.0 µg/mL LPS; iii) medium supplemented with fullerol 1 nM; iv) medium supplemented with fullerol 10 nM; or v) medium supplemented with fullerol 50 nM. For all treatments except control, LPS was added to culture

medium at 18 hours post fullerol supplementation and LPS stimulation persisted for 6 hours, in a total experiment period of 24 hours. Each treatment was performed using cells isolated from at least six independent animals and were conducted in duplicates.

#### *2.6.4 Dexamethasone as local anti-inflammatory drug for endometrial cells*

To investigate the potential application of dexamethasone as local anti-inflammatory drug for the inflamed endometrium, 2 mg/mL dexamethasone approved for veterinary use (Azium, MSD, Brazil) was employed. Endometrial cells were treated with control culture medium, medium supplemented with 1.0 µg/mL LPS or medium supplemented with 10-fold serial dilutions of dexamethasone (0.5, 5.0 or 50.0 ng/mL), accordingly with Saut et al. (2014) and Dong et al. (2018) studies. For all treatments except control, the LPS was added to culture medium at 18 hours after supplementation with dexamethasone and LPS stimulation persisted for 6 hours, in a total experiment period of 24 hours. Each treatment was performed using cells isolated from at least five independent animals and were conducted in duplicates.

#### *2.7 RNA extraction and real time RT-qPCR*

Endometrial cells were washed with PBS (Gibco, USA) and RNA extracted using TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA) according to the manufacturer's protocol, and quantified in spectrophotometer (SmartSpec Plus, BioRad, USA). The RNA (1 µg) was treated with DNase (1 U/µL - DNase I Amplification Grade, Sigma Aldrich, USA) followed by conversion to cDNA, using Oligo d(T) provided by reverse transcription kit (TaqMan Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, USA). The DNase treatment and cDNA confection were performed according to manufacturer's protocols using a thermocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA). Primers were designed with Primer-BLAST tool from target genes mRNA sequences obtained at NCBI/GenBank (Table 1). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as housekeeping gene and RT-qPCR was performed using StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Each 25 µL reaction was prepared using 1.0 µL of forward and reverse primers (10 µM), 2.5 µL of cDNA, 12.5 µL of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) and 8.0 µL of DEPC-treated water. Thermal cycling parameters used to amplify the transcriptions were: 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and one minute at 60°C. For melting curve, the parameters were: 15 seconds at 95°C, one minute at 60°C with rising of 0.3°C to reaches 95°C, standing for 1 minute

at this temperature for each sample. Transcription data were analyzed according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) and transcription levels were established as the number of copies of the target gene in comparison to the number of copies of GAPDH.

Table 1. Forward (F) and reverse (R) nucleotide sequences, amplicon length in base pair (bp), melting temperature and NCBI reference sequence (RefSeq) for primers used in this study: MyD88, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8 and GAPDH.

Gene	Nucleotide sequence	Amplicon length (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	NCBI (RefSeq)
MyD88	F – TCATTGAGAAGAGGTGCCGTC	211	60.3	NM_001014382.2
	R – GTGCAGGGGTTGGTGTAGTC			
IL-1 $\beta$	F – TCCTCCGACGAGTTTCTGTGTG	76	61.8	NM_174093.1
	R – GGGATTTTTGCTCTCTGTCCTGG			
IL-6	F – ACGAAAGAGAGCTCCATCTGC	71	60.2	NM_173923.2
	R – AATGGAGTGAAGGCGCTTGT			
CXCL8	F – CTCTGTGTGAAGCTGCAGTTCTGTC	90	62.4	NM_173925.2
	R – ATTTGGGGTGGAAAGGTGTGG			
GAPDH	F – GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG	129	61.4	NM_001034034.2
	R – GCTGACAATCTTGAGGGTGTG			

## 2.8 Statistical analysis

Data were analyzed for normal distribution of probability and identification of outliers. Parametric data was submitted to ANOVA with post-hoc analyses using Dunnett's multiple comparisons test, to compare delta cycle threshold (Ct) values from treatments with control, and Bonferroni's multiple comparisons test, to compare delta Ct values between treatments. Non-parametric data was submitted to Friedman's test with post hoc analyses using Dunn's multiple comparisons test, to compare delta Ct values between more than two treatments, and Wilcoxon's test between two treatments. Prism 7 (GraphPad Software, USA) was used for statistical analyses, with differences considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Endometrial cells phenotyping

Immunocytochemistry performed directly on six-well plates was efficient to phenotype primary endometrial cells (Figure 1). The primary endometrial cells obtained by uterine wash were composed by a mix of epithelial and stromal cells, which took 14 days to reach 90% cell confluence. At this confluence, the proportion of epithelial to stromal cells in the mixed endometrial cell culture were about 4:1.

### 3.2 MWCNT and lipofectamine as potential endometrial inflammation agents

Transcription levels for MyD88, IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 had no significant variation as mixed endometrial cells were cultured with MWCNT or lipofectamine, in comparison to control group (Figure 2). However, except for MyD88, the transcription levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 of endometrial cells stimulated with LPS had significant increase when compared to control, MWCNT or lipofectamine (Figure 2a-d).

### 3.3 MyD88 gene silencing

Endometrial cells submitted to MyD88 silencing with MWCNT or lipofectamine as transfection agent had no significant variation on the transcription levels for MyD88, IL-1 $\beta$ , IL-6, and CXCL8 when compared to control or non-targeting siRNA (Figure 3a-h). When endometrial cells were stimulated with LPS, the transcription levels for MyD88 (Figure 3a, e) had no variation ( $P>0.05$ ), while for cytokines, an increased was observed but with no significant differences between treatments, except for IL-1 $\beta$  (Figure 3f), which had lower transcription level ( $P<0.05$ ) when endometrial cells were transfected with lipofectamine-MyD88 siRNA.

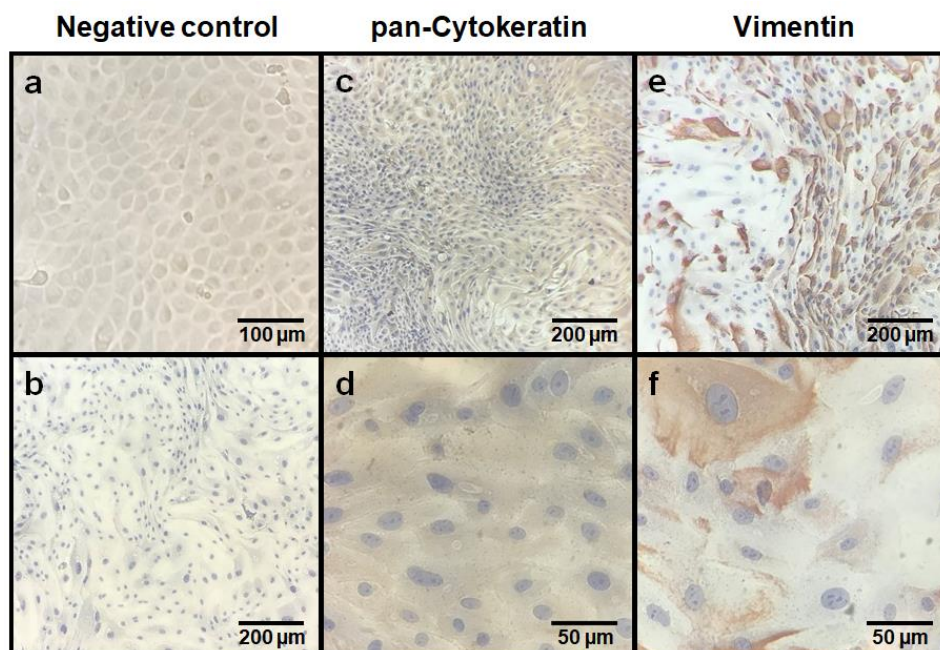


Figure 1 Immunocytochemistry of primary mixed endometrial cells cultured in six-well plate. a) Endometrial cells at 90% confluence and observed at inverted light microscope. b) Immunocytochemistry negative control endometrial cells stained with hematoxylin. c,d) Endometrial cells immunolabeled with AE1/AE3 pan-Cytokeratin antibody and counter-stained with hematoxylin. e,f) Endometrial cells immunolabeled with RV202 vimentin antibody and counter-stained with hematoxylin.

### *3.4 Fullerol as anti-inflammatory nanoparticle for endometrial cells*

Endometrial cells stimulated only with LPS had increased levels of IL-1 $\beta$  ( $P<0.01$ ) when compared to control (Figure 4a, c). Endometrial cells cultured with fullerol at 10 nM and 50 nM had lower transcription levels for IL-1 $\beta$  ( $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively) when stimulated with LPS (Figure 4a), while no significant variation on transcription levels for IL-6 and CXCL-8 was observed for all three fullerol treatments (Figure 4b, c).

### *3.5 Dexamethasone as local anti-inflammatory drug for endometrial cells*

Endometrial cells stimulated with LPS and cultured with different concentrations of dexamethasone had significantly increased transcription levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 when compared to negative control (Figure 5). Although, only at concentration of 50 ng/mL dexamethasone, LPS-stimulated endometrial cells had lower levels of IL-1 $\beta$  ( $P<0.05$ ) and IL-6 ( $P<0.05$ ) when compared to only LPS-stimulated endometrial cells (Figure 5a, b). Between dexamethasone treatments, only the 50 ng/mL treatment had lower level for IL-6 ( $P<0.05$ ) than 0.5 ng/mL treatment (Figure 5b). For all other cytokines and treatments there were no significant differences.



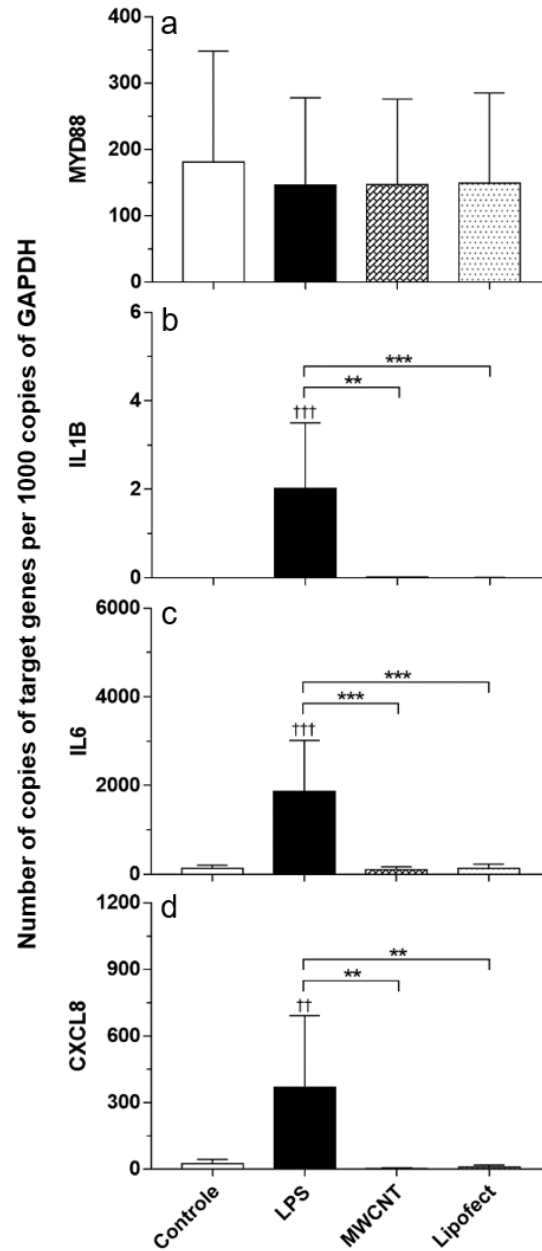


Figure 2. Transcription levels of MyD88 (a), IL-1 $\beta$  (b), IL-6 (c) and CXCL8 (d) (mean  $\pm$  S. E. M.) in primary endometrial cell cultured with control medium (white bars), LPS (black bars), MWCNT (checked bars) or commercial lipofectamine (dotted bars). Data were analyzed by ANOVA, using Dunnett's multiple comparisons test to compare delta Ct values of treatments with control ( $\dagger$ ) and Bonferroni's multiple comparisons test to compare delta Ct values between treatments (\*). (n=6). Significance level at  $\dagger\dagger$ .\*\* $P$ <0.01,  $\dagger\dagger\dagger$ .\*\*\* $P$ <0.001.

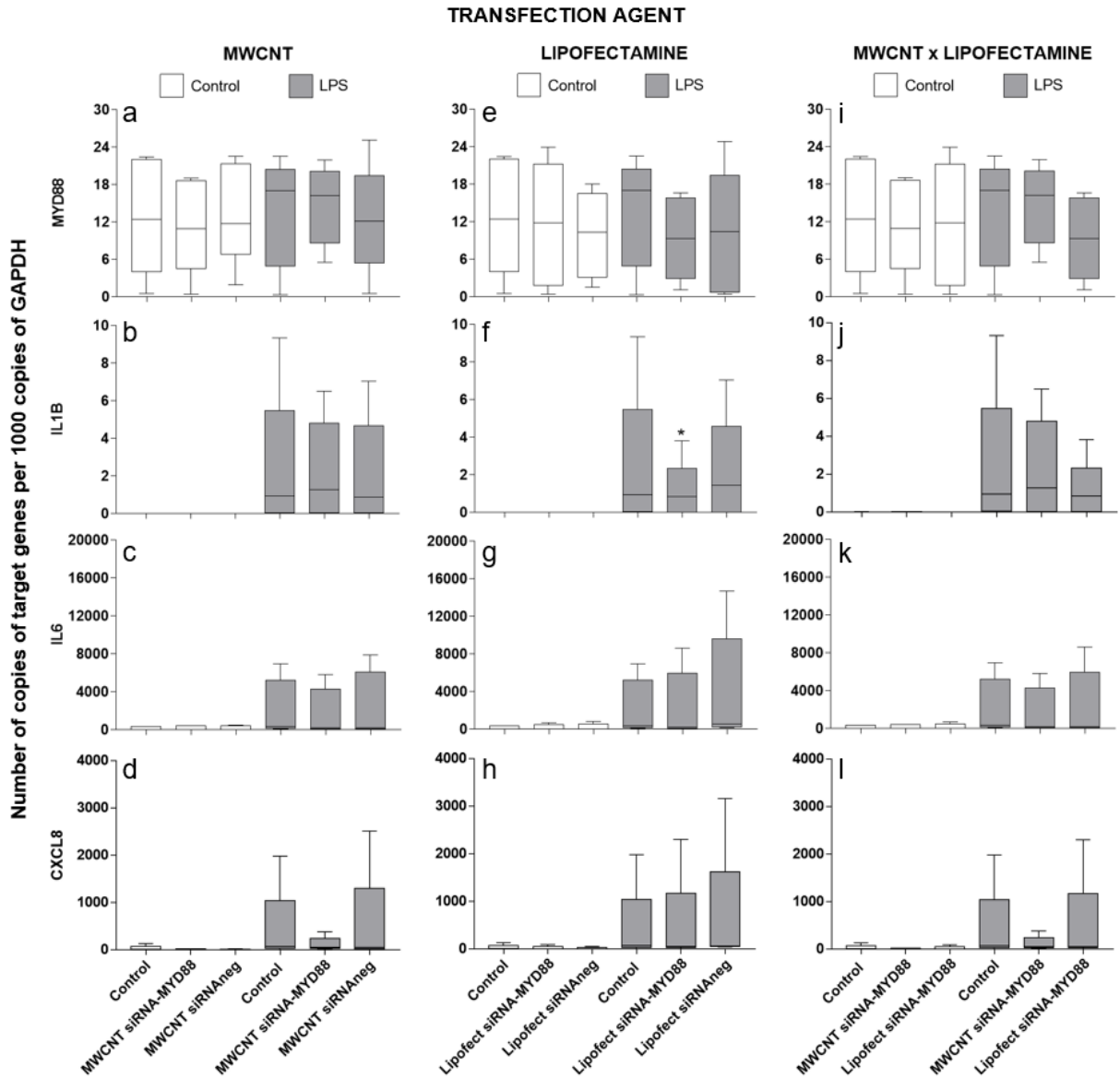


Figure 3. Transcription levels of MyD88 (a), IL-1 $\beta$  (b), IL-6 (c) and CXCL8 (d) (median with minimum and maximum values) in primary endometrial cell cultured with control medium (white bars) or LPS (gray bars). Endometrial cells were transfected with siRNA targeting MyD88 gene or siRNA non-targeting control (siRNAneg), using MWCNT (a-d) or commercial lipofectamine (e-h) as transfection agents. Transcription levels were also compared between siRNA vectors (i-l). Data were analyzed by Friedman’s test, using Dunn’s multiple comparisons test to compare delta Ct values of treatments with control (\*) and Wilcoxon’s test to compare delta Ct values between siRNA treatments (†). (n=5). Significance level at \*  $P < 0.05$ .

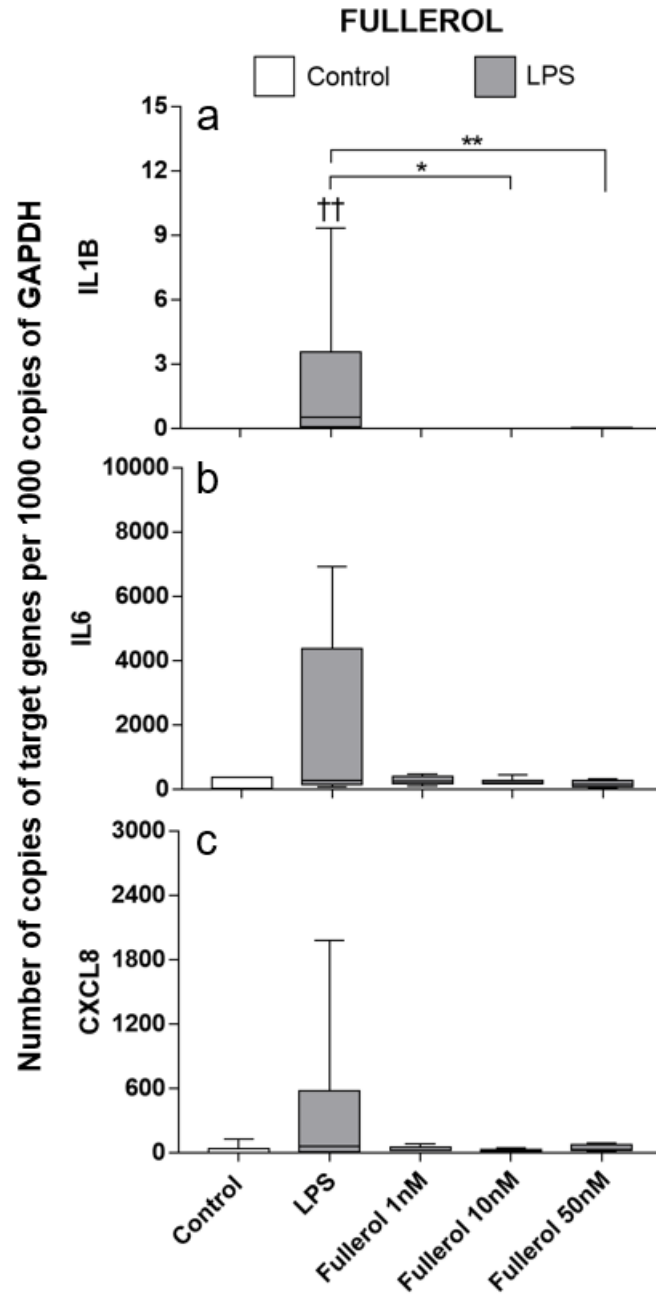


Figure 4. Transcription levels of IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b) and CXCL8 (c) (median with minimum and maximum values) in primary endometrial cell cultured with different concentrations of fullerol (1 nM, 10 nM and 50 nM) and stimulated with LPS (gray bars). For negative and positive cytokine expression control, endometrial cells were cultured with control medium (white bars) and medium supplemented with only LPS (LPS gray bar), respectively. Data were analyzed by Friedman's test, using Dunn's multiple comparisons test to compare delta Ct values of fullerol treatments between each other and with negative ( $\dagger$ ) and positive (\*) cytokine expression controls. (n=6). Significance level at \*  $P < 0.05$ ,  $\dagger\dagger$ :\*\*  $P < 0.01$ .

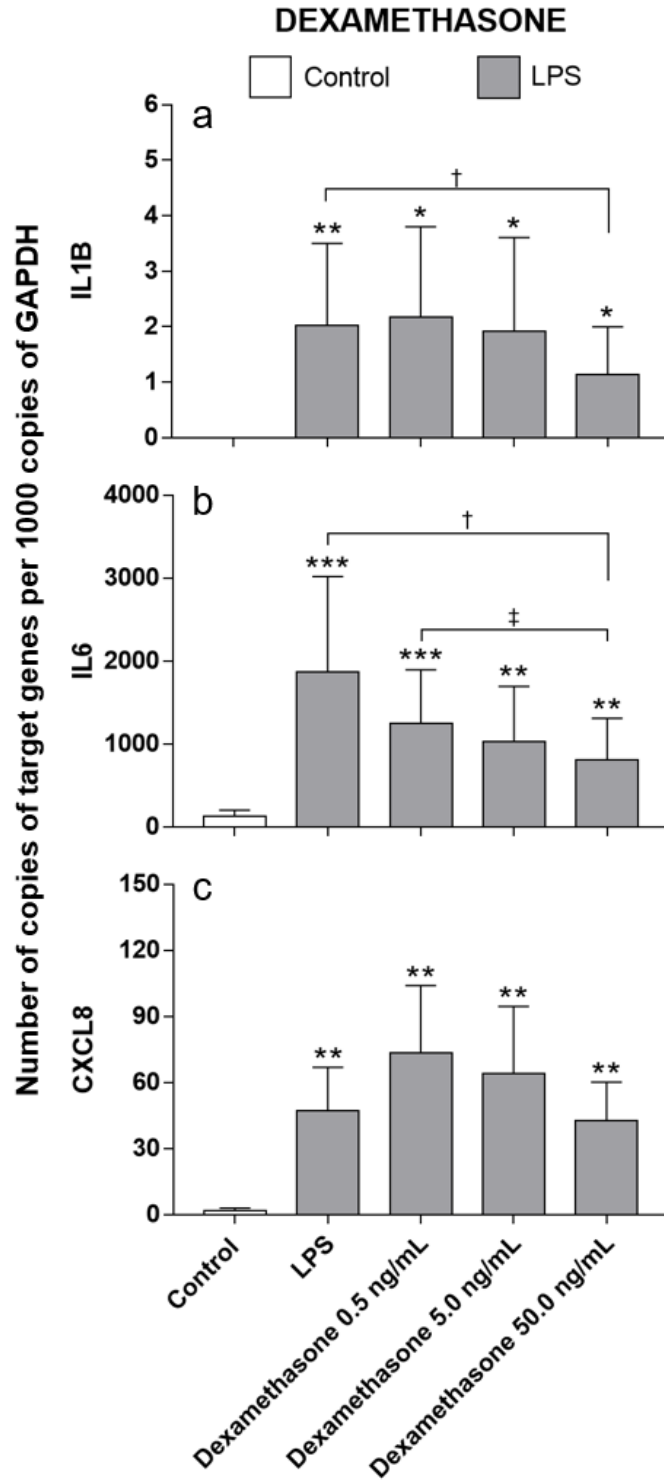


Figure 5. Transcription levels of IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b) and CXCL8 (c) (mean  $\pm$  S. E. M.) in primary endometrial cell cultured with 10-fold serial dilutions of dexamethasone (0.5 ng/mL, 5.0 ng/mL, and 50.0 ng/mL) and stimulated with LPS (gray bars). For negative and positive cytokine expression control, endometrial cells were cultured with control medium (white bars) and medium supplemented with only LPS (LPS gray bar), respectively. Data were analyzed by ANOVA, using Dunnett's multiple comparisons test to compare delta Ct values of treatments with negative (\*) and positive (†) cytokine expression controls, and Bonferroni's multiple comparisons test to compare delta Ct values between dexamethasone treatments (‡). (n=5). Significance level at †, ‡ \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### 4. Discussion

The use of nanotechnology in biological systems has been increasing over the recent past years and various nanostructures and methodologies were developed and applied in many different areas of science. To our knowledge, this is the first study employing carbon nanostructures as molecular anti-inflammatory systems, aiming to control the LPS-induced inflammatory response in an *in vitro* model of mixed bovine endometrial cells culture. Also, this study tested dexamethasone approved for veterinary use, as potential local anti-inflammatory drug to control LPS-induced inflammatory response in mixed bovine endometrial cells culture.

The bovine endometrium is composed of a variety of cell types which contribute to the inflammatory response of uterus, with the epithelial cells as the first line of defense, followed by stromal cells (Herath et al., 2006, Healy et al., 2015). Based on cell-to-cell interactions between endometrial epithelial and stromal cells, necessary for an optimal inflammatory response (Swangchan-Uthai et al., 2012), a mixed endometrial primary cell culture model was employed to conduct this study. Endometrial cells were obtained using an adapted methodology of intrauterine infusion and recovery of 0.05% collagenase-I solution by catheter (Skarzynski et al., 2000). This is an easy and non-expansive methodology which allows gathering considerable number of endometrial cells without isolate populations.

Directly immunocytochemistry over plate using specific primary antibodies anti-pan-cytokeratin and anti-vimentin was performed to phenotype and confirm the growing of epithelial and stromal cells in culture. Cytokeratin and vimentin are intermediate filaments present in the cytoskeleton of epithelial and mesenchymal cells, respectively (Pérez-Martínez et al., 2001, Swangchan-Uthai et al., 2012). In mixed primary endometrial cell culture, both cells were identified and still present in the culture for 14 days, when confluent cells were submitted to treatments, with no reduction in cells viability and grow rate. In addition, performing the immunocytochemistry directly over cell culture plate, according to the antibody's manufacturers' instructions, and analysis under inverted light microscope had presented no technique or evaluation disadvantage, and was less time-consuming.

The endometrial inflammation is elicited by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) by pattern recognition receptors (PRR) on endometrial cells. Except for TLR3, TLR recognition of their respective PAMP triggers an intracellular downstream signaling pathways with activation of MyD88, an essential molecule for signaling transduction of PAMP-stimulated TLR (Fitzgerald et al., 2001; Cronin et al., 2012; Yunhe et al., 2013; Sheldon et al., 2014). This signal transduction results in activation of NF- $\kappa$ B and AP-

1 transcription factors which act in gene promotor regions of DNA encoding cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6), chemokines (CXCL5, CXCL8, CCL2 and CCL5), antimicrobial peptides and acute phase proteins (Cronin et al., 2012; Yunhe et al., 2013). Infertile cows present higher mRNA expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8, and higher leukocytes infiltration in the endometrium (Herath et al., 2009; Fischer et al., 2010). To control the mRNA overexpression of pro-inflammatory cytokines, a gene therapy focuses on silencing the MyD88 mRNA was employed in mixed endometrial cells culture stimulated with LPS. Prior to gene silencing, the transfection agents MWCNT and lipofectamine were evaluated as possible endometrial inflammation inducers. This study demonstrated that both vectors were not able to upregulate the gene expression of adaptor MyD88 or cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and CXCL8 of endometrial cells. Their inclusion on culture medium was compared to LPS-stimulated endometrial cells. The LPS is a well-establish PAMP recognized by TLR4 and used for inflammatory stimulation on several uterine innate immunity studies in cattle (Davies et al., 2008; Swangchan-Uthai et al., 2012; Borges et al., 2012; Saut et al., 2014; Oguejiofor et al., 2015; Healy et al., 2015; Turner et al., 2016; Koh et al., 2018; Nunes et al., 2021).

Corroborating with those studies, LPS stimulation of mixed endometrial cells upregulated gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and CXCL8. In addition, LPS-stimulated endometrial cells had no variation in MyD88 transcription levels when compared to control, suggesting the LPS stimulus does not influence in the MyD88 expression. Similar result was also observed by Cronin et al. (2012) in study evaluating the TLR4 and MyD88-dependent signaling mechanisms of the innate immunity system by transfection of bovine endometrial epithelial and stromal cells with lipofectamine-TLR4 and MyD88 siRNA. Although, Yunhe et al. (2013) observed that endometrial cells stimulated with LPS increased the expression of MyD88 and other TLR4 downstream signaling molecules. The absence of higher transcription levels for pro-inflammatory cytokines by endometrial cells co-cultured with MWCNT or lipofectamine ensures that these vectors can be used as *in vitro* delivery system in bovine endometrial cells, with no induction of inflammatory response at similar concentrations used in this study.

This study hypothesized that MyD88 silencing will downregulated the gene expression of pro-inflammatory cytokines in bovine endometrial cells stimulated with LPS. However, the MWCNT-MyD88 siRNA duplex complexes were not able to downregulate MyD88 expression in control or LPS-stimulated mixed endometrial cells, and the same result was observed for the control transfection agent lipofectamine. These results do not agree with those observed by Cronin et al. (2012), which used the same commercial lipofectamine vector and MyD88 siRNA

duplex sequences. In their study, the lipofectamine-MyD88 siRNA duplex complexes were able to downregulate MyD88 expression even in epithelial as in stromal endometrial cells. Furthermore, the adaptor molecule silencing was able to downregulate the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 cytokines in both endometrial cell populations.

In our study, as the MyD88 silencing was not effective, the downregulation of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 was also ineffective, except for IL-1 $\beta$  expression in mixed endometrial cells transfected with lipofectamine. The MyD88 gene silencing was carried out for 24 hours and the LPS stimulation for six hours. Some studies proceed the transcriptional analysis between 24 to 48 hours post transfection (Zhang et al., 2006; Ladeira et al., 2010; Varkouhi et al., 2011; Cronin et al., 2012), while few proceeded analyses up to 24 hours (Liu et al., 2007). Higher time allows gene silencing occurrence and the variations in transcription levels can be detected by RT-qPCR. After LPS stimulation of TLR4 on endometrial cells, the MyD88 expression does not increase (Cronin et al, 2012), while IL-1 $\beta$  expression increases within short time until peaks at 6 hours post-stimulation (Swangchan-Uthai et al., 2012). IL-1 $\beta$  is one of the firsts cytokines secreted by endometrial cells in response to LPS stimulation and is responsible for initiating and amplifying the inflammatory response (Galvão et al., 2011; Swangchan-Uthai et al., 2012; Oguejiofor et al., 2015). Therefore, MyD88 silencing in mixed endometrial cells using lipofectamine or MWCNT as transfection agents was unable to present significant variations in MyD88 expression in a short time experiment. However, it was able to downregulate sudden increase in IL-1 $\beta$  expression due to LPS stimulation of endometrial cells when these were transfected with lipofectamine. These results emphasized that gene silencing experiments to control the inflammatory response in uterus, by transfection of siRNA, requires a more prolonged time to be performed.

Another possibility for no silencing of MyD88 expression by RNAi with MWCNT or lipofectamine-siRNA complexes is a low siRNA concentration used for mixed endometrial cells. The concentration of 25 pmol/mL (25 nM) employed in this study for MyD88 siRNA was similar to those used by Cronin et al. (2012). However, studies using functionalized CNT as transfection agent and siRNA targeting different genes and cells lines, employed concentrations of 50 to 100 nM siRNA with higher silencing efficiency (Liu et al., 2007; Ladeira et al., 2010). Despite the experimental designs of each one of the previous studies, the low concentration of siRNA may have been a limiting factor for the non-silencing of MyD88 gene.

Nanoparticle fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> has scientifically proven characteristics as antioxidant (Yang et al., 2014; Pei et al., 2019) and anti-inflammatory agent (Liu et al., 2013; Jin et al.,

2017) in *in vitro* murine, mice and human cells culture models. Fullerol can receive or donate electrons to reactive oxygen species (ROS) or catalyze reaction between superoxide anion and water to produce stable hydrogen peroxide (Djosdjevic et al., 2006; Kato et al., 2009; Ueno et al., 2014). The ROS can induce inflammatory response by eliciting the secretion of pro-inflammatory cytokines as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , or by disrupting plasmatic membrane of cells, releasing damage-associated molecular patterns (DAMP), which also induce pro-inflammatory cytokines synthesis (Healy et al., 2014). Studies using *in vitro* and *in vivo* murine models of low back pain syndrome and osteoarthritis had demonstrated the fullerol can suppress the inflammatory response by reducing ROS production, mitogen-associated protein kinases (MAPK) downstream signaling pathway activation and TNF- $\alpha$  synthesis (Liu et al., 2013; Yudoh et al., 2009; Xiao et al., 2018). In addition, fullerol reduced the TNF- $\alpha$ -induced production of pattern recognition receptor NLRP3, caspase-1 and pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-17 (Yudoh et al., 2009; Jin et al., 2017). In the present study, use of 10 nM and 50 nM fullerol in culture medium of mixed endometrial cells stimulated with LPS downregulated the transcription of IL-1 $\beta$ . Under LPS stimulation, bovine endometrial cells secrete TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8 and variety of others inflammatory modulators (Swangchan-Uthai et al., 2012; Oguejiofor et al., 2015). The synthesis of active IL-1 $\beta$  by the bovine inflamed endometrium is dependent on the activation of NLRP3 inflammasome and caspase-4, which is also extremely associated with sterile inflammation (Kelly et al., 2019). The lower transcription for IL-1 $\beta$  in LPS-stimulated bovine endometrial cells is probably due to the lower activation of MAPK signaling pathway and production of TNF- $\alpha$  and nitric oxide, which are related to IL-1 $\beta$  synthesis (Galvão et al., 2011; Swangchan-Uthai et al., 2012; Oguejiofor et al., 2015; Xiao et al., 2018). In addition, the downregulation of NLRP3 caused by fullerol will impact on production of IL-1 $\beta$ , because NLRP3 is an important part of the inflammasome complex, which turns pro-IL-1 $\beta$  in the active form that will be secrete by endometrial cells (Davis et al., 2011; Kelly et al., 2019).

Dexamethasone is a synthetic steroidal glucocorticoid and acts as a potent anti-inflammatory drug (Torres et al., 2012; Dong et al., 2018). The glucocorticoid modulates the gene expression by different mechanisms. A complex formed by glucocorticoid, glucocorticoid receptor (GR), DNA and co-activators molecules, acts promoting histones deacetylation or acetylation, reducing the transcription of pro-inflammatory cytokines, or inducing transcription of anti-inflammatory cytokines, respectively (Torres et al., 2012). Another anti-inflammatory mechanism of glucocorticoids is the bonding of glucocorticoid-GR complex to transcriptional factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in the cell cytoplasm, avoiding their translocation to nucleus and



transcription of pro-inflammatory cytokines (Reichardt et al., 2001; Dong et al., 2018). In the present study, mixed endometrial cells cultured with 50 ng/mL of dexamethasone had their IL-1 $\beta$  and IL-6 expression downregulated when stimulated with LPS. This *in vitro* result emphasizes the potential application of dexamethasone registered for veterinary use as local anti-inflammatory drug to control endometrial inflammation in cattle.

#### 4.1 Conclusions

In conclusion, MWCNT-MyD88 siRNA duplex complexes were not able to downregulate the MyD88 gene expression and control the transcription of pro-inflammatory cytokines of mixed endometrial cells stimulated with LPS. However, the standardized MWCNT presented good biocompatibility as they do not induce inflammatory response in bovine endometrial cells. Otherwise, fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> has a potential anti-inflammatory effect over LPS-induced inflammatory response of bovine endometrial cells, by downregulating the gene expression of pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . In similar way, dexamethasone can control the LPS-induced inflammatory response of bovine endometrial cells *in vitro* by downregulating the gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. This indicates a potential application of dexamethasone registered for veterinary use as local anti-inflammatory drug to control endometrial inflammation in cattle.

#### Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil; Grant number APQ – 01591-14). PPN, MSL, CAF, LOL, AJV, TAP, APMJ, RLS and AMB have fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). CE and JPSM have fellowships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). FGP works as researcher in MG Graphene Project – CDTN/UFMG/CODEMGE (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Universidade Federal de Minas Gerais/Companhia de Desenvolvimento Econômico de Minas Gerais). RKFGO works as technician at CTNano - UFMG (Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno). IMS works as Professor in Reproductive Immunobiology, Biomedical Sciences, at Institute of Life Science, Swansea University.

## Competing Interests

The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this work.

## References

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124, 783-801.
- Aldewachi, H., Chalati, T., Woodroffe, M.N., et al., 2018. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*. 10, 18-33.
- Al-Jumali, A., Alancherry, S., Bazaka, K., et al., 2017. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials*. 10, 1-26.
- Aoshima, H., Kokubo, K., Shirakawa, S., et al., 2009. Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol Sci*. 14, 2, 69-72.
- Bernardes, P.T.T., Rezende, B.M., Resende, C.B., et al., 2015. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. *PLoS ONE*, 10, 4, 1-16.
- Bokobza, L., Zhang, J., 2012. Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. *eXPRESS Polym. Lett*. 6, 7, 601-608.
- Borges, A.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.
- Cherukuri, P., Gannon, C.J., Leeuw, T.K., et al., 2006. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 18882-18886.
- Cronin, J.G., Turner, M.L., Goetze, L., et al., 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, 1-9.
- Davies, D., Meade, K.G., Herath, S., et al., 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 6, 53, 1-12.
- Davis, B.K., Wen, H., Ting, J.P.-Y., 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol*. 29, 707-735.
- Djordjevic, A., Srdjenovic, B., Seke, M., et al., 2015. Review of synthesis and antioxidant potential of fullerene nanoparticles. *J. Nanomater*. 567073, 1-15.
- Dong, J., Qu, Y., Li, J., et al., 2018. Cortisol inhibits NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in LPS activated bovine endometrial epithelial cells. *Int. Immunopharmacol*. 56, 71-77.

- Dubin, R.A., Callegari, G.C., Kohn, J., et al., 2008. Carbon nanotube fibers are compatible with mammalian cells and neurons. *IEEE Trans. Nanobioscience.* 7, 1, 11-14.
- Fischer, C., Drillich, M. Odau, S., 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 818-829.
- Fitzgerald, K.A., Paisson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., et al., 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* 413, 78-83.
- Galvão, K.N., Santos, N.R., Galvão, J.S., et al., 2011. Association between endometrites and endometrial cytokine expression. In postpartum Holstein cows. *Theriogenology.* 76, 290-299.
- Healy, L.L., Cronin, J.G., Sheldon, I.M., 2014. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci. Rep.* 4, 1-9.
- Healy, L.L., Cronin, J.G., Sheldon, I.M., 2015. Polarized epithelial cells secrete interleukin 6 apically in the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 92, 6, 1-12.
- Herath, S., Fischer, D.P., Werling, D., et al., 2006. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology.* 147, 1, 562-570.
- Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., et al., 2009. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 1-13.
- Huang, X., El-Sayed, I., Qian, W., et al., 2006. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2115-2120.
- Hussain, K., Hussain, T. 2015. Gold nanoparticles: a boon to drug delivery system. *South Indian J. Biol. Sci.* 1, 3, 127-133.
- Ijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* 354, 56-58.
- Im, J.S., Bai, B.C., Lee, Y.S. 2010. The effect of carbon nanotubes on drug delivery in an electro-sensitive transdermal drug delivery system. *Biomaterials.* 31, 1414-1419.
- Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B., 1980. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy. Sci.* 63, 155-160.
- Jin, L., Ding, M., Oklopcic, A., et al., 2017. Nanoparticle fullerol alleviates radiculopathy via NLRP3 inflammasome and neuropeptides. *Nanomedicine.* 13, 6, 2049-2059.
- Jorio, A., Saito, R., Dresselhaus, G., et al., 2004. Determination of nanotubes properties by Raman spectroscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 362, 2311-2336.
- Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., et al., 2009. Highly hydroxylated or  $\gamma$ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: the antioxidant ability assessed by electron spin

- resonance method and  $\beta$ -carotene bleaching assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 5293-5296.
- Kelly, P., Meade, K.G., O'farrelly, C., 2019. Non-canonical inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production by primary endometrial epithelial and stromal fibroblast cells ins NLRP3 and Caspase-4 Dependent. *Front. Immunol.* 10, 102, 1-17.
- Koh, Y.Q., Mitchell, M.D., Almughlilq, F.B., et al., 2018. Regulation of inflammatory mediator expression in bovine endometrial cells: effects of lipopolysaccharide, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. *Physiol. Rep.* 6, 9, 1-13.
- Kong, F.Y., Zhang, J.W., Li, R.F., et al., 2017. Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. *Molecules.* 22, 1445-1457.
- Kroto, H.W., Allaf, A.W., Balm, S.P., 1991. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Chem. Rev.* 91, 1213-1235.
- Kumar, M., Ando, Y., 2010. Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: a review on growth mechanism and mass production. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 3739-3758.
- Ladeira, M.S., Andrade, V.A., Gomes, E.R.M., et al., 2010. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology.* 21, 1-12.
- Liu, Z., Winters, M., Holodniy, M., et al., 2007. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon nanotube transporters. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 2023-2027.
- Liu, Z., Davis, C., Cai, W., et al., 2008. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 1410-1415.
- Liu, Q., Jin, L., Mahon, B.H., et al., 2013. A novel treatment of neuroinflammation against low back pain by soluble fullerol nanoparticles. *Spine.* 38, 17, 1443-1451.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods.* 25, 402-408.
- Munk, M., Camargo, L.S.A., Quintão, C.C.R., et al., 2016. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. *Nanomedicine.* 12, 1151-1159.
- Noletto, P.G., Saut, J.P.E., Sheldon, I.M., 2017. Short communication: Glutamine modulates inflammatory responses to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. *J. Dairy. Sci.* 100, 3, 2207-2212.
- Nunes, P.P., Martins, T.M., Leite, A.C., et al., 2021. Production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and CXCL8 by endometrium of crossbred heifers stimulated with various pathogen-associated molecular patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 228, 106736, 1-10.
- Nunes, P.P., Almeida, M.R., Pacheco, F.G., et al. Data not published. Detection of carbon nanoparticle in bovine fresh milk through Fourier Transform-Raman spectroscopy.

- Oguejiofor, C.F., Cheng, Z., Abudureyimu, A., et al., 2015. Global transcriptomic profiling of bovine endometrial immune response in vitro. I. Effect of lipopolysaccharide on innate immunity. *Biol. Reprod.* 93, 4, 1-13.
- Pacheco, F.G., Cotta, A.A.C., Gorgulho, H.F., et al., 2015. Comparative temporal analysis of multiwalled carbon nanotube oxidation reactions: evaluating chemical modifications on true nanotube surface. *Appl. Surf. Sci.* 357, 1015-1023.
- Pascottini, O.B., LeBlanc, S.J., 2020. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology*. 150, 193-200.
- Pei, Y., Cui, F., Du, X., et al., 2019. Antioxidative nanofullerol inhibits macrophage activation and development of osteoarthritis in rats. *Int. J. Nanomedicine*. 14, 4145-4155.
- Pérez-Martínez, C., García-Fernández, R.A., Escudero, A., et al., 2001. Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract. *J. Comp. Path.* 124, 70-78.
- Prasek, J., Drbohlavova, J., Chomoucka, J., et al., 2011. Methods for carbon nanotubes synthesis – review. *J. Mat. Chem.* 21, 1872-1884.
- Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Göttlicher, M., et al., 2001. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 20, 24, 7168-7173.
- Roursgaard, M., Poulsen, S.S., Keply, C.L., et al., 2008. Polyhydroxylated C<sub>60</sub> fullerene (fullerol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 386-388.
- Sachkova, A.S., Kovel, E.S., Churilov, G.N., et al., 2017. On mechanism of antioxidant effect of fullerenols. *Biochem. Biophys. Rep.* 9, 1-8.
- Saut. J.P.E., Healey, G.D., Borges, A.M., et al., 2014. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reproduction*. 148, 593-606.
- Shadjou, N., Hasanzadeh, M., Khalilzadeh, B. 2018. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. *Bioengineered*. 9, 1, 38-47.
- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., et al., 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81, 1025-1032.
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Healey, G.D., et al., 2014. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. 148, 41-51.
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Bromfield, J.J., 2019. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 361-384.

- Skarzynski, D.J., Miyamoto, Y., Okuda, K., 2000. Production of prostaglandin F<sub>2α</sub> by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol. Reprod.* 62, 1116-1120.
- Swangchan-Uthai, T., Lavender, C.R.M., Cheng, Z., et al., 2012. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol. Reprod.* 87, 6, 1-13.
- Torres, R.C., Insuela, D.B.R., Carvalho, V.F., 2012. Mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória dos glicocorticoides. *Corpus et Scientia.* 8, 2, 36-51.
- Trigueiro, J.P.C., Silva, G.G., Lavall, R.L., et al., 2007. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM, and SEM methods. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1-10.
- Turner, M.L., Cronin, J.G., Noletto, P.G., et al., 2016. Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy Metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. *PLoS ONE.* 11, 3, 1-20.
- Ueno, H., Yakamura, S., Arastoo, R.S., et al., 2014. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullereneols using β-carotene bleaching assay. *J. Nanomater.* 802596, 1-7.
- Varkouhi, A.K., Foillard, S., Lammers, T., et al., 2011. SiRNA delivery with functionalized carbon nanotubes. *Int. J. Pharm.* 416, 419-425.
- Xiao, L., Hong, K., Roberson, C., et al., 2018. Hydroxylated fullerene: a stellar nanomedicine to treat lumbar radiculopathy via antagonizing TNF-α-induced ion channel activation, calcium signaling, and neuropeptide production. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 1, 266-277.
- Xin, Y., Huang, M., Guo, W.W., et al., 2017. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol. Cancer.* 16, 134-142.
- Yang, W., Thordarson, P., Gooding, J.J., et al., 2007. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology.* 18, 1-12.
- Yang, X., Jin, L., Yao, L., et al., 2014. Antioxidative nanofullerol prevents intervertebral disk degeneration. *Int. J. Nanomedicine.* 9, 2419-2430.
- Yudoh, K., Karasawa, R., Masuko, K., et al., 2009. Water-soluble fullerene (C<sub>60</sub>) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. *Int. J. Nanomedicine.* 4, 233-239.
- Yunhe, F., Bo, L., Xiaosheng, F., et al., 2013. Lipopolysaccharide increases toll-like receptor 4 and downstream toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 20-27.
- Zhang, Z., Yang, X., Zhang, Y., et al., 2006. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppress tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 12, 16, 4933-4939.

Zhao, C., Tan, A., Pastorin, G., et al., 2013. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* 31, 654-668.

### CAPÍTULO III

#### ***In vivo* murine model of lipopolysaccharide-induced endometritis to assess local anti-inflammatory effect of fullerol**

Philippe Pimenta Nunes<sup>1</sup>, Monique Ferreira Silva<sup>1</sup>, Thaynara Parente de Carvalho<sup>1</sup>, Marina de Souza Ladeira<sup>2</sup>; Luiz Orlando Ladeira<sup>3</sup>, Renato Lima Santos<sup>1</sup>, Álan Maia Borges <sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\*E-mail: alanmborges@hotmail.com

#### **Abstract**

Hydroxylated fullerenes are carbon-based nanoparticles which have anti-inflammatory properties, and potential application in controlling endometritis in mammals. The goal of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> using an *in vivo* murine model of LPS-induced endometritis. Forty mice were randomly divided in four groups, submitted to superovulation protocol to estrous cycle synchronization, and treated by intravaginal infusion of PBS + PBS (control group), fullerol 50 nM + PBS (fullerol group), PBS + LPS 1.0 mg/mL (LPS group), or fullerol 50 nM + LPS 1.0 mg/mL (fullerol + LPS group). Mice were euthanized 24 hours post-LPS infusion and genital tract, composed by vagina, cervix, uterus and ovaries, were submitted to histological processing and stained with hematoxylin-eosin. Histological sections were blind evaluated and classified into scores according to inflammation histopathological changes. Mild to intense inflammation were observed in histological sections of vagina and mild to moderate in cervix and uterus, but with no significant differences in inflammation scores between experimental treatments. In conclusion, the *in vivo* murine model of endometritis via intravaginal infusion of LPS post-superovulation protocol was not effective to induce endometrial inflammation, avoiding the assessment of local anti-inflammatory effect of fullerol.

**Keywords:** Carbon, nanoparticle, endometrium, inflammation, mice.



## 1. Introduction

Advances in nanotechnology allowed the discovery and application of various nanostructures in many different fields of knowledge (Ladeira et al., 2010; Hussain and Hussain, 2015; Kong et al., 2017; Shadjou et al., 2018). One of these nanostructures, the fullerene  $C_{(60)}$ , is a molecule composed of carbon atoms covalently bounded to each other, in a tridimensional hollow ball-like polyhedral structure (Kroto et al., 1991). The addition of functional groups, especially hydroxyls (OH), over the fullerene surface results in a water soluble nanostructure called fullerol  $C_{(60)}OH_{(n)}$ . Fullerol has specific characteristics that allow its application in various biological systems. In *in vitro* studies using experimental models with human or mice cell lines, fullerol has demonstrated antioxidant (Injac et al., 2009; Yang et al., 2014; Pei et al., 2019), anti-inflammatory (Roursgaard et al., 2008; Liu et al., 2013; Jin et al., 2017), antimicrobial (Aoshima et al., 2009; Al-jumali et al., 2017) and antitumor functions (Bernardes et al., 2015). Based on this, fullerol is a nanostructure with potential application in controlling the acute and chronic uterine inflammatory process in mammals, especially post-partum cows.

After delivery, bacterial colonization of the uterus is an extremely common process in cow. However, the development of uterine infection is consequence of metabolic and immunological disturbances of the host, associated with bacterial load and pathogenicity (Sheldon and Dobson, 2004). The endometrial innate immunity plays an important role as the first line of defense of the uterus (Herath et al., 2006). Endometrial cells recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMP) by pattern recognition receptors (PRR) (Davies et al., 2008). This recognition triggers intracellular signaling pathways that results in production of pro-inflammatory cytokines. These cytokines are responsible for the inflammatory process of the endometrium, which aims to resolve the infection and repair damaged tissue (Sheldon et al., 2014; Dadarwal et al., 2017). Damaged tissues also release damage-associated molecular patterns (DAMP) which can also stimulate PRR and trigger inflammatory response in the endometrium. This DAMP release can be associated with uterine infection or chronic inflammation of the uterus in the absence of pathogens, which is called sterile inflammation (Chen and Nuñez, 2010, Healy et al., 2014).

Failure in the mechanisms that controls the uterine innate immunity can result in insufficient or strong inflammatory responses. Both can interfere in reproductive physiology by predisposing the occurrence of chronic endometritis and infertility (Sheldon et al., 2019; Pascotini and LeBlanc, 2020). Infertile cows present higher expression of pro-inflammatory

cytokines and leukocyte infiltration in the endometrium (Herath et al., 2009; Fischer et al., 2010). The inflamed endometrium is a hostile environment to sperm and embryo and consists in one of the major causes of early embryonic loss in cattle (Souza et al., 2014; Velazquez et al., 2019).

The goal of this study is to use an *in vivo* murine model of lipopolysaccharide-induced endometritis and genital tract inflammation to evaluate, via histopathology, the anti-inflammatory effect of fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub>.

## 2. Material and methods

### 2.1 Animals and drugs

The experimental procedures described in this study were approved by the Federal University of Minas Gerais Ethical Committee (CEUA-UFMG 121/2020). Forty female BALB/c mice (8 to 9 weeks; weight 31 to 36 g) were donated by National Agricultural Laboratory (LANAGRO-MG, Pedro Leopoldo, Brazil). Mice were randomly divided into four groups containing ten mice each: control group, LPS group, fullerol group, and fullerol + LPS group. They were housed in plastic cages (430 x 270 x 190 mm) bedded with wood shavings, in a managed environment (24 ± 1 °C) with light control (12 h light / 12 h dark). *Ad libitum* standard pellet food and clean filtered water were given during the experimental period. The wood shaving beds were changed every 72 hours or less when it was necessary.

Powder fullerol C<sub>(60)</sub>OH<sub>(24)</sub> was diluted in sterile PBS (Gibco, USA) for a final concentration of 50 nM work solution. This concentration was chosen based on previous works applying fullerol as an antioxidant for *in vitro* production of bovine embryos (Prata et al., data not published) and fullerol as *in vitro* anti-inflammatory agent to control LPS-induced inflammatory response of bovine endometrial cells (Nunes et al., data not published). An ultrapure *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (LPS, Sigma Aldrich, USA) diluted in PBS at 1.0 µg/mL was used for *in vivo* induction of female genital tract inflammation in mice.

### 2.2 Experimental design

Mice were submitted to rat adapted vaginal cytology using sterile PBS solution to evaluate the estrous cycle phases (Marcondes et al., 2002). This procedure was performed to confirm that all mice achieved puberty and sexual maturity before the experiment. All animals

were submitted to hormonal protocol to induce and synchronize estrus (Park et al., 2015). The protocol was composed by: 0d-17h, intraperitoneal injection of 10 IU equine chorionic gonadotropin (eCG – Novormon<sup>®</sup>, Zoetis, USA); 2d-17h, intraperitoneal injection of 10 IU human chorionic gonadotropin (hCG – Vetecor<sup>®</sup> 5000 U.I., Hertape Calier, Brazil).

Also, at 2d-17h, mice from control and LPS groups received 20  $\mu$ L sterile PBS (Gibco, USA), while mice from fullerol groups received 20  $\mu$ L 50 nM fullerol solution, by intravaginal infusion with micropipette and sterile tip. At 3d-6h, control and fullerol group received 20  $\mu$ L sterile PBS (Gibco, USA), while LPS and fullerol+LPS groups received 20  $\mu$ L 1.0 mg/mL LPS by intravaginal infusion. Twenty-four hours post LPS infusion, 4d-6h, mice of all groups were euthanized with intraperitoneal injection of 30 mg/kg xylazine (Syntec<sup>®</sup>, Brazil) and 300 mg/kg ketamine (Syntec<sup>®</sup>, Brazil) overdose. Immediately after euthanizing, mice were dissected and genital tract, comprehending vagina, cervix, uterus, and ovary, were collected in histological processing cassettes. The material was fixed in 10% neutral buffered formalin solution for 24 hours. Then organs were dehydrated using a graded series of ethanol, embedded in paraffin, cut into 4  $\mu$ m sections and stained with hematoxylin and eosin. Histological sections were blind evaluated and classified by score as none (0), discrete (1), moderate (2) or intense (3) inflammation, according to histopathological changes and leukocyte infiltration (Table 1).

Table 1. Inflammation score used to classify histological sections of female genital tract from mice, according to the observed inflammation characteristics.

<b>(0) none</b>	Intact epithelium with no significant histological alterations and minimal neutrophilic infiltration.
<b>(1) mild</b>	Mild, multifocal, or diffuse neutrophilic infiltration in the subepithelial connective tissue; discrete exocytosis of neutrophils.
<b>(2) moderate</b>	Moderate neutrophilic infiltration in the subepithelial connective tissue; moderate neutrophils exocytosis; intraepithelial micro abscesses formation; and discrete morphological signs of apoptosis.
<b>(3) intense</b>	Intense neutrophilic infiltration in the subepithelial connective tissue; intense neutrophils exocytosis; intraepithelial micro abscesses formation; neutrophilic exudate accumulation in the lumen, and moderate to intense morphological signs of apoptosis

### 2.3 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, USA). Data were submitted to Kruskal-Wallis test with post hoc analysis performed using Dunn's multiple comparisons test to compare treatments scores medians. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Histopathological evaluation and classification of vagina, cervix and uterus of mice are presented in figures 1, 2 and 3, respectively. Inflammatory histological changes were observed ranging from none to intense in vagina and none to moderate in cervix and uterus, but no significant differences were observed among experimental treatments. No significant histopathological alterations were observed in the ovary's sections of all groups. The score and dispersion analysis are presented in Figure 4. No significant differences were observed between treatments ( $P>0.05$ ).

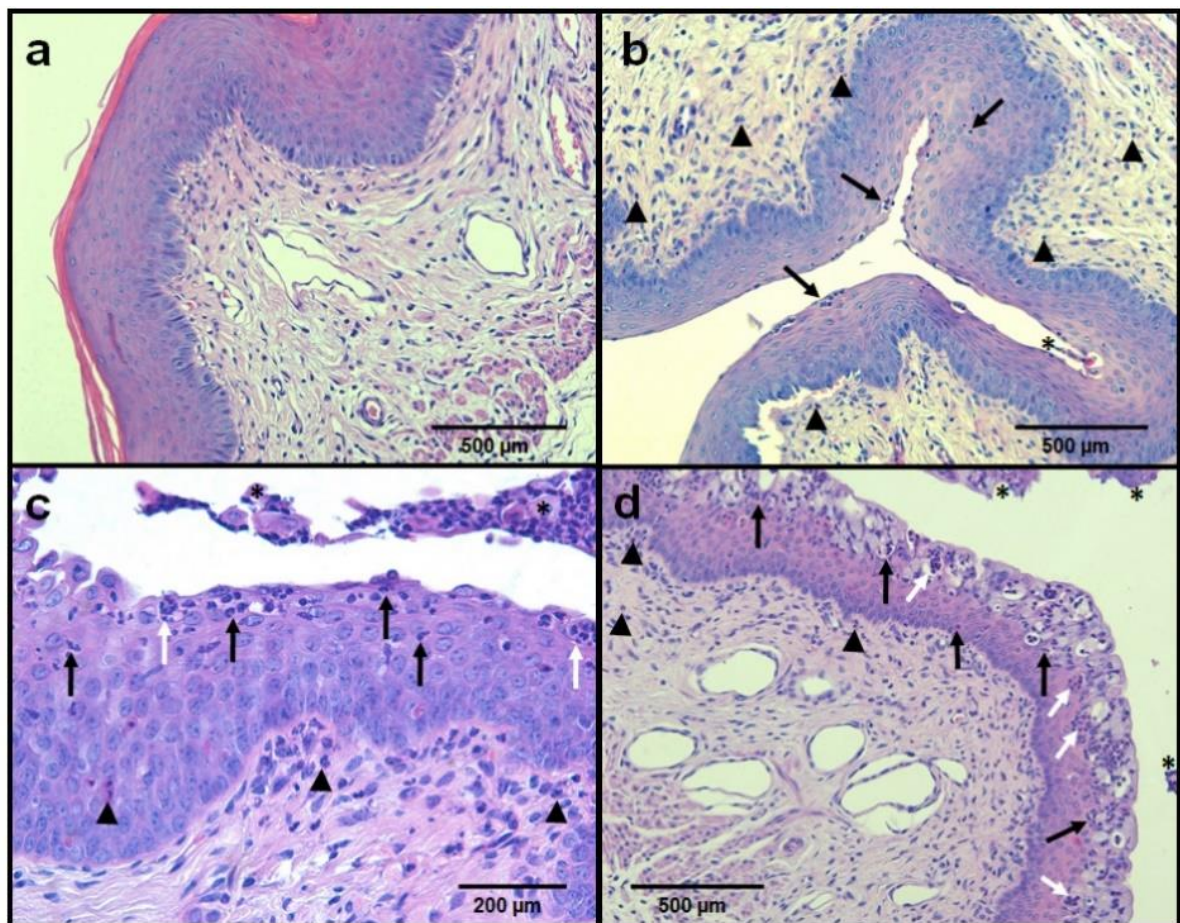


Figure 1. Microscopic evaluation of histological sections of vagina, from different experimental groups, stained by Hematoxylin and eosin. a) Vagina at score 0, with intact epithelium and no histological alterations. b) Vagina at score 1, with discrete and multifocal neutrophilic infiltrate in the subepithelial connective tissue (arrow heads), discrete to moderate, multifocal infiltrate in the epithelium (arrows), occasional exocytosis of neutrophils (\*), and loss of keratin layer. c) Vagina at score 2, with moderate and diffuse neutrophilic infiltrate in the subepithelial layer (arrow heads), moderate and diffuse infiltrate in the epithelium (arrows), occasional intraepithelial micro abscesses formation (white arrow), intense exocytosis of neutrophils with moderate accumulation in the vaginal lumen (\*). d) Vagina at score 3, with discrete and diffuse neutrophilic infiltrate in the subepithelial connective tissue (arrow heads), intense and diffuse neutrophilic infiltrate in the epithelium (arrow) with multiple micro abscesses formation (white arrows), and intense exocytosis and accumulation of neutrophils in the vaginal lumen (\*).

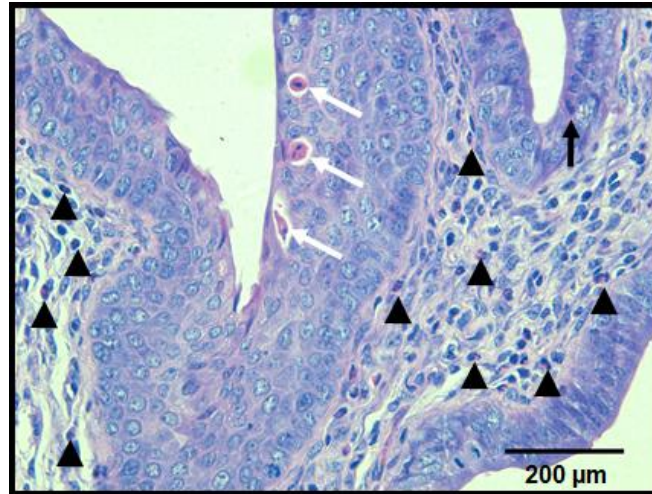


Figure 2. Microscopic evaluation of histological section of vagina-cervix transition stained with hematoxylin and eosin. Cervix at score 2, with moderate and diffuse neutrophilic infiltrate in the subepithelial connective tissue (arrow heads) and minimal number of neutrophils in the epithelium of cervix (black arrows). In the vagina portion of the section, few micro abscesses in a focal area of the epithelium (white arrows) and discrete to moderate neutrophilic infiltrate in the subepithelial layer (arrow heads).

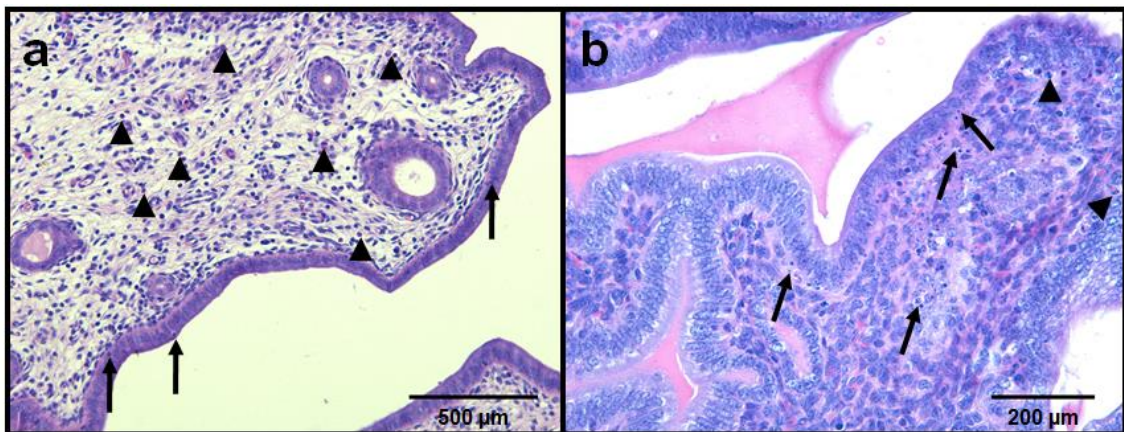


Figure 3. Microscopic evaluation of histological sections of uterus stained with hematoxylin and eosin. a) Uterus at score 1 with discrete to moderate and diffuse neutrophilic infiltrate in the subepithelial connective tissue (arrow heads), and discrete, multifocal neutrophils in the epithelium (arrows). b) Uterus at score 1 with minimum neutrophilic infiltration in the endometrium (arrow heads) and morphological evidence of endometrial cells apoptosis (arrows).

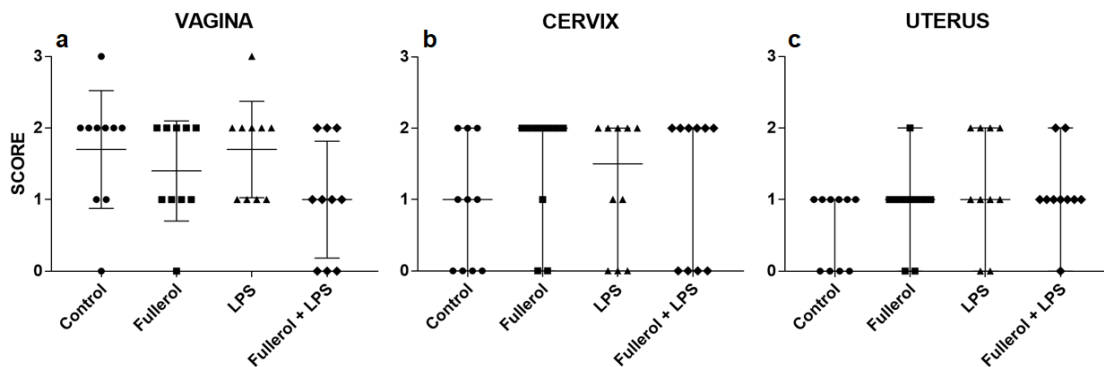


Figure 4. Scatter plot of inflammation score of vagina (a), cervix (b) and uterus (c) from animals treated with PBS (control group – dots), fullerol 50 nM (fullerol group – squares), 1.0 mg/mL LPS (LPS group – triangles) and fullerol 50 nM and 1.0 mg/mL LPS (fullerol + LPS group – diamond). Data were analyzed by Kruskal-Wallis test with post hoc analysis using Dunn’s multiple comparisons test to compare inflammation score medians between groups. (n=10). No significant differences ( $P>0.05$ ).

#### 4. Discussion

The fullerol  $C_{(60)}OH_{(24)}$  is a carbon-based nanoparticle with interesting anti-inflammatory effect over *in vitro* and *in vivo* murine models of inflammation. To our knowledge, this is the first study employing hydroxylated fullerol to assess its potential anti-inflammatory effect over an *in vivo* murine model of LPS-induced endometritis. However, intravaginal infusion of 1.0  $\mu\text{g/mL}$  of LPS post superovulation hormonal protocol was not able to induce such model.

LPS is a toll-like receptor 4 (TLR4) ligand acting on endometrial epithelial and stromal cells of mammals (Brechia et al., 2012; Oguejiofor et al., 2015; Xiao et al., 2018; Wang et al., 2019), triggering a local inflammatory response. TLR4 stimulation by LPS in mice endometrial cells triggers an intracellular downstream signaling pathway, via NF- $\kappa$ B activation, which results in transcription and synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 (Li et al., 2015; Wu et al., 2016; Wang et al., 2019). In similar way in cattle, TLR4 stimulation by LPS triggers a MyD88-dependent pathway, with activation of NF- $\kappa$ B and mitogen activated protein kinase (MAPK), and a MyD88-independent pathway, with activation of interferon regulatory factor 3 (IRF3). These two pathways lead to the synthesis of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, and type I interferons (INF-I), respectively (Yunhe et al., 2013; Oguejiofor et al., 2015). In both species, LPS-induced pro-inflammatory cytokine are synthesized with the objective to attract and activate immune cells, especially phagocytes, to the site of infection, eliminate the pathogen threat and repair eventually tissue damages (Dadarwal et al., 2017; Sheldon et al., 2019).

In *in vivo* experiments with mice, intrauterine infusion of LPS resulted in endometrium damage with histopathological changes of hyperemia, hemorrhages, polymorphonuclear infiltration and shedding of epithelial cells (Li et al., 2015; Wu et al., 2016; Hu et al., 2018; Wang et al., 2019). In experiments of mice endometritis induced by intravaginal infusion of LPS, histopathological changes as edema, extensive inflammatory cell infiltration and endometrial architecture loss with shedding of epithelial cells was also observed (Guo et al., 2019; Li et al., 2019). In the present study, the intravaginal infusion of 1.0 mg/mL of LPS was not able to induce markedly and significant histopathological changes of inflammation in mice endometrium of all experimental groups. Markedly inflammatory changes, but with no significant differences between experimental groups, were observed in vagina and cervix histological sections. Moderate neutrophilic infiltration of vagina submucosa with eventual exocytosis of neutrophils and micro abscesses formation in the epithelial layer, associated with

moderate intraluminal accumulation of neutrophils were observed. These inflammatory changes are compatible with those resulted from LPS stimulation in mice endometrium (Guo et al., 2019; Li et al., 2019). However, in the present study, control group also presented those histopathological inflammatory changes. One possible explanation is a mechanically induced inflammation of the vagina during experimental manipulation of animals, rather than LPS inflammatory stimulation.

The experimental premise of opened cervix was desired to proceed with intravaginal infusion of fullerol  $C_{(60)}OH_{(24)}$  and LPS. An open cervix will allow the intravaginal infusion to access the uterine lumen. This characteristic of the female genital tract is observed in recent post-partum or at estrus, especially in cows (Sheldon and Dobson, 2004; Azawi, 2008). To standardize and perform all the experimental treatments around estrus phase of estrous cycle, an adapted superovulation hormonal protocol (Park et al., 2015), based in administration of eCG and hCG, was employed to synchronize estrous cycle and ovulation in mice. The eCG acts as follicle stimulating hormone (FSH), inducing the recruitment and development of ovary follicles, while the hCG acts as luteinizing hormone, promoting the final development of follicles and inducing ovulation (Martins et al., 2008). Therefore, fullerol was infused inside vagina after hCG administration, corresponding to the beginning of estrus phase or six hours previously to induced ovulation, while LPS was infused 12 hours post-hCG administration, which corresponded to the end of estrus phase or six hours post-induced ovulation. Despite the careful experimental conduction, the intravaginal infusion of LPS post superovulation protocol were not efficient to induce a murine model of endometritis and to assess the anti-inflammatory effect of fullerol.

The anti-inflammatory property of fullerol is associated with the reduction of reactive oxygen species (ROS) in the extracellular compartment of mice dorsal root ganglion neurons (Liu et al., 2013) and by the downregulation of NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  transcripts in the same cell line stimulated with TNF- $\alpha$  (Jin et al., 2017). In rat model of osteoarthritis, fullerol is associated with suppression of ROS and TNF- $\alpha$ -induced productions of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-17 (Yudoh et al., 2009). Unfortunately, the LPS-induced endometritis model failed to assess, via histopathological evaluation, the local anti-inflammatory effect of fullerol  $C_{(60)}OH_{(24)}$  over endometrium or female genital tract in mice.

#### 4.1 Conclusion

In conclusion, the superovulation hormonal protocol followed by intravaginal infusion of LPS were not suitable for induction of endometritis or female genital tract inflammation in mice, compromising the study about anti-inflammatory properties of fullerol nanoparticle. Further research should be conducted to develop an easy and non-expensive *in vivo* methodology to induce endometritis in mice to assess the potential local anti-inflammatory effect of fullerol over endometrium cells.

#### Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG-CVZ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil, Grant number CVZ - APQ-01591-14). PPN, MFS, TPC, MSL, LOL, and RLS have fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil).

#### Competing Interests

The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this work.

#### References

- Al-Jumali, A., Alancherry, S., Bazaka, K., et al., 2017. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials*. 10, 1-26.
- Aoshima, H., Kokubo, K., Shirakawa, S., et al., 2009. Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol Sci*. 14, 2, 69-72.
- Azawi, O.I., 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 105, 187-208.
- Bernardes, P.T.T., Rezende, B.M., Resende, C.B., et al., 2015. Nanocomposite treatment reduces disease and lethality in a murine model of acute graft-versus-host disease and preserves anti-tumor effects. *PLoS ONE*, 10, 4, 1-16.
- Borges, A.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.
- Brecchia, G., Menchetti, L., Cardinali, R., et al., 2014. Effects of a bacterial lipopolysaccharide on the reproductive functions of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci*. 147, 128-134.



- Bromfield, J.J., Santos, J.E.P., Block, J., et al., 2015.
- Chen, G.Y., Nuñez, G., 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 12, 826-837.
- Dadarwal, D., Palmer, C., Griebel, P., 2017. Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. *Theriogenology.* 104, 62-71.
- Davies, D., Meade, K.G., Herath, S., et al., 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 53, 1-12.
- Fischer, C., Drillich, M. Odau, S., 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 818-829.
- Guo, J., Wang, Y., Jiang, P., et al., 2019. Sodium butyrate alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice through inhibiting inflammatory response. *Microb. Pathog.* 137, 103792.
- Healy, L.L., Cronin, J.G., Sheldon, I.M., 2014. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci. Rep.* 4, 7060.
- Herath, S., Fischer, D.P., Werling, D., et al., 2006. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology.* 147, 1, 562-570.
- Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., et al., 2009a. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 1-13.
- Hu, X., Li, D., Wang, J., et al., 2018. Melatonin inhibits endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced endometritis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 64, 101-109.
- Hussain, K., Hussain, T. 2015. Gold nanoparticles: a boon to drug delivery system. *South Indian J. Biol. Sci.* 1, 3, 127-133.
- Injac, R., Radic, N., Govedarica, B., et al., 2009. Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> through inhibition of oxidative stress. *Pharmacol. Rep.* 61, 335-342.
- Jin, L., Ding, M., Oklopčić, A., et al., 2017. Nanoparticle fullerol alleviates radiculopathy via NLRP3 inflammasome and neuropeptides. *Nanomedicine.* 13, 6, 2049-2059.
- Koh, Y.Q., Mitchell, M.D., Almuğhlliq, F.B., et al., 2018. Regulation of inflammatory mediator expression in bovine endometrial cells: effects of lipopolysaccharide, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. *Physiol. Rep.* 6, 9, 1-13.
- Kong, F.Y., Zhang, J.W., Li, R.F., et al., 2017. Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. *Molecules.* 22, 1445-1457.

- Kroto, H.W., Allaf, A.W., Balm, S.P., 1991. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene. *Chem. Rev.* 91, 1213-1235.
- Ladeira, M.S., Andrade, V.A., Gomes, E.R.M., et al., 2010. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology.* 21, 1-12.
- Li, W., Fu, K., Lv, X., et al., 2015. Lactoferrin suppresses lipopolysaccharide-induced endometritis in mice via down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* 28, 695-699.
- Li, R., Maimai, T., Yao, H., et al., 2019. Protective effects of polydatin on LPS-induced endometritis in mice. *Microb. Pathog.* 137, 103720.
- Liu, Q., Jin, L., Mahon, B.H., et al., 2013. A novel treatment of neuroinflammation against low back pain by soluble fullerol nanoparticles. *Spine.* 38, 17, 1443-1451.
- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62, 4A, 609-614.
- Martins, F.S., Silva, J.R.V., Rodrigues, A.P.R., et al., 2008. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Ver. Bras. Reprod. Anim.* 32, 1, 36-49.
- Oguejiofor, C.F., Cheng, Z., Abudureyimu, A., et al., 2015. Global transcriptomic profiling of bovine endometrial immune response in vitro. I. Effect of lipopolysaccharide on innate immunity. *Biol. Reprod.* 93, 4, 1-13.
- Park, S-J., Kim, T-S., Kim, J-M., et al., 2015. Repeated superovulation via PMSG/hCG administration induces 2-Cys peroxiredoxins expression and overoxidation in the reproductive tracts of female Mice. *Mol. Cells.* 38, 12, 1071-1078.
- Pascottini, O.B., LeBlanc, S.J., 2020. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology.* 150, 193-200.
- Pei, Y., Cui, F., Du, X., et al., 2019. Antioxidative nanofullerol inhibits macrophage activation and development of osteoarthritis in rats. *Int. J. Nanomedicine.* 14, 4145-4155.
- Roursgaard, M., Poulsen, S.S., Keply, C.L., et al., 2008. Polyhydroxylated C<sub>60</sub> fullerene (fullerol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 386-388.
- Shadjou, N., Hasanzadeh, M., Khalilzadeh, B. 2018. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. *Bioengineered.* 9, 1, 38-47.
- Sheldon, I.M., Dobson, H., 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 295-306.
- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Healey, G.D., et al., 2014. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. 148, 41-51.

- Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Bromfield, J.J., 2019. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 361-384.
- Souza, A.H., Narciso, C.D., Batista, E.O.S., et al., 2014. Effect of uterine environment on embryo production and fertility in cows. *Anim. Reprod.* 11, 3, 159-167.
- Velázquez, M.M.L., Peralta, M.B., Angeli, E., et al., 2019. Immune status during postpartum, peri-implantation and early pregnancy in cattle: an updated view. *Anim. Reprod. Sci.* 206, 1-10.
- Wang, F., Chen, S., Deng, L., et al., 2019. Protective effects of astragaloside IV against LPS-induced endometritis in mice through inhibition activation of the NF- $\kappa$ B, p38 and JNK signaling pathways. *Molecules.* 24, 373.
- Wu, H., Zhao, G., Jiang, K., et al., 2016. Engeletin alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice inhibiting TLR4-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J. Agric. Food Chem.* 64, 6171-6178.
- Xiao, H-B., Sui, G-G., Lu, X-Y., et al., 2018. Elevated levels of ADMA are associated with lower DDAH2 and Higher PRMT1 in LPS-induced endometritis rats. *Inflammation.* 41, 1.
- Yang, X., Jin, L., Yao, L., et al., 2014. Antioxidative nanofullerol prevents intervertebral disk degeneration. *Int. J. Nanomedicine.* 9, 2419-2430.
- Yudoh, K., Karasawa, R., Masuko, K., et al., 2009. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. *Int. J. Nanomedicine.* 4, 233-239.
- Yunhe, F., Bo, L., Xiaosheng, F., et al., 2013. Lipopolysaccharide increases toll-like receptor 4 and downstream toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 20-27.
- Zhang, H., Wu, Z., Yang, Y., et al., 2019. Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling. *J. Zhejiang Univ-Sci. B. (Biomed & Biotechnol).* 20, 10, 816-827.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Modulação in vitro da resposta imune inata em células epiteliais do endométrio bovino por meio de RNA de interferência para a molécula MyD88 utilizando nanotubo de carbono como agente de transfecção.", protocolo do CEUA: 409/2018 sob a responsabilidade de Alan Maia Borges que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/02/2019.

Vigência da Autorização	25/02/2019 a 24/02/2024
Finalidade	Pesquisa

## Considerações posteriores:

26/02/2019	Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2024 Prezados pesquisadores, informamos que o presente protocolo está APROVADO pela CEUA. Porém, devido à natureza do material utilizado na pesquisa (órgãos obtidos em abatedouro comercial credenciado) e a não experimentação efetiva em animais vivos no protocolo proposto, o número de animais aprovados foi lançado como n=0 animais/grupo. A CEUA recomenda que, para os protocolos a serem submetidos posteriormente, os pesquisadores selecionem no item 3.2 (espécie) a opção "outros" e especifiquem os órgãos a serem coletados.
25/02/2019	Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 25/02/2019. Validade: 25/02/2019 à 24/02/2023 Prezados pesquisadores, informamos que o presente protocolo está APROVADO pela CEUA. Porém, devido à natureza do material utilizado na pesquisa (órgãos obtidos em abatedouro comercial credenciado) e a não experimentação efetiva em animais vivos no protocolo proposto, o número de animais aprovados foi lançado como n=0 animais/grupo. A CEUA recomenda que, para os protocolos a serem submetidos posteriormente, os pesquisadores selecionem no item 3.2 (espécie) a opção "outros" e especifiquem os órgãos a serem coletados.

Belo Horizonte, 30/01/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceuaf](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceuaf)

## ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Ação anti-inflamatória e antioxidante de fulerol (C60) em modelo in vivo de endometrite induzida por LPS em camundongos.", protocolo do CEUA: 121/2020 sob a responsabilidade de Alan Maia Borges que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 06/07/2020.

Vigência da Autorização	06/07/2020 a 05/07/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	10
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	LANAGRO-Pedro Leopoldo
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	10
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	LANAGRO-Pedro Leopoldo
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	10
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	LANAGRO-Pedro Leopoldo
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	10
Peso/Idade	35g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	LANAGRO-Pedro Leopoldo

## Considerações posteriores:

06/07/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 06/07/2020. Validade: 06/07/2020 à 05/07/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 30/01/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)