

## EFEITO DE UM ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL NAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO FLUÍDO FOLICULAR DE FÊMEAS BOVINAS

VITORIA MARCELA PANIAGO MENDES<sup>1</sup>; VINICIUS POUZADA LEAL<sup>2</sup>;  
FABIANE PEREIRA DE MORAES<sup>3</sup>; SÉRGIO FARÍAS VARGAS JÚNIOR<sup>4</sup>; RAFAEL  
GIANELLA MONDADORI<sup>5</sup>; LÍGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – vitoriamendesp0@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – vinileal.18@gmail.com\*

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabypmoraes@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – sergiofvjunior@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com

<sup>6</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa – ligia.pegoraro@embrapa.br

### 1. INTRODUÇÃO

Sabe-se, que a eficiência reprodutiva é um dos pilares para sustentabilidade e lucratividade na pecuária. Desta forma, estudos sobre o processo ovulatório e suas variáveis tornam-se importantes. A ovulação é desencadeada principalmente por um pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), o qual estimula um evento similar ao processo inflamatório agudo, aumentando a síntese de mediadores inflamatórios intrafolículares, como a Prostaglandina F2α (PGF), e Prostaglandina E2 (PGE) (BERISHA et al., 2019). Esses mediadores atuam em conjunto, induzindo a ruptura folicular, dando início a neovascularização e a luteinização. Em vista disso, a flunixin meglumina (FM), um anti-inflamatório não esterooidal (AINE), mediante o tratamento sistêmico em dose única, reduziu as concentrações de PGF no fluido folicular de vacas tratadas (MORAES et al., 2021), porém não afetou a ocorrência da ovulação (MORAES, 2020).

Como revisado por MATSUDA et al. (2022), a comunicação intercelular dentro do microambiente ovariano é um mecanismo essencial para a maturação do óvulo. Diante disso, vesículas extracelulares (VEs) têm um papel crítico, pois são o veículo de comunicação intercelular (VALADI et al., 2007). Essas VEs contêm micro RNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam a expressão e a função gênica. A presença dessas VEs no fluido folicular já foi descrita em diversas espécies (revisado por SILVEIRA et al. (2018)). Apesar do conhecimento sobre o papel das prostaglandinas e a ação dos AINEs, pouco se sabe sobre a modulação das vesículas extracelulares no fluido folicular por estas drogas, especialmente em relação ao seu conteúdo molecular. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar como o AINE FM, administrado após a indução da ovulação, modula as vesículas extracelulares do fluido folicular em termos de concentração, morfologia e conteúdo, buscando assim entender sua atuação no ambiente folicular.

### 2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPel (CEUA 006185/2023-19). Foram utilizadas 14 fêmeas bovinas cíclicas, não gestantes e não lactantes, submetidas à sincronização do estro e indução de nova onda folicular por meio de um protocolo hormonal de oito dias com progestágeno. Inicialmente, foi implantado um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona

\* Bolsista de Iniciação Científica Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PROCESSO PROA nº 24/2551-0000992-2)

(DIV P4; PRIMER®, Agener União), seguido da aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE; RIC-BE® Agener União) e 241 µg de cloprosteno sódico (PGF; Estron® Agener União). Após oito dias, o DIV P4 foi removido e uma nova dose de PGF foi administrada. Vinte horas depois, os animais receberam 25 µg de lecirelina (análogo de GnRH; Tec Relin® Agener União). Dezessete horas após a aplicação de GnRH, antes do aumento de prostaglandinas como descrito por BRIDGES et al. (2006), os animais foram distribuídos, de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório, em dois grupos: grupo AINE (n=7), que recebeu 2,2 mg/kg de FM (Flumedin®, Jofadel), e o grupo CONT (n=7), que recebeu uma administração intramuscular de solução salina.

Após 24 h da indução da ovulação com GnRH, posterior a higienização da região do períneo e anestesia epidural com lidocaína 2% (Anest®, Syntec) foi realizada a aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal com sonda micro convexa de 6MHz (SonoScape E2V Pro). As amostras de fluido (FF) obtidas foram transferidas para placas de cultivo (Corning®) para busca e remoção dos complexos cumulus-oócito (CCOs). Em seguida, o FF foi acondicionado em microtubos para separação das células da granulosa (CG) e do sobrenadante, e submetidos a centrifugações seriadas, conforme GAD et al. (2023), para o isolamento das VEs e expressão dos miRNAs. O último microtubo do processo contendo fluido folicular sem pellet de células da granulosa foi congelado e armazenado a -80°C. As amostras contendo VEs foram então enviadas ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD-USP) para isolamento, quantificação e análise morfológica das VEs, conforme metodologia de BRIDL et al. (2024).

No software JMP Pro 18 (SAS®), os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste t de Student para a comparação entre os grupos, com um nível de significância de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, com relação ao efeito do AINE FM sobre às VEs do FF, demonstraram que não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os grupos quando comparada a concentração de partículas (AINE:  $28,4 \pm 4,6 \times 10^8$  partículas/ml; CONT:  $22,9 \pm 4,9 \times 10^8$  partículas/ml) e o tamanho das VEs (AINE:  $183,2 \pm 7,2$  nm CONT:  $195,8 \pm 5,2$  nm). Em contraste, a análise do conteúdo molecular das VEs revelou uma modulação distinta no perfil de miRNAs e nas vias por eles reguladas entre os grupos estudados. Dentre os 333 miRNAs em comum, quatro foram menos ( $P < 0,05$ ) expressos nas VEEs do grupo AINE: bta-miR-584, bta-miR-369-5p, bta-miR-218 e bta-miR-411c-5p. Esse miRNAs afetam significativamente ( $P < 0,05$ ) sete vias fisiológicas que são: Regulação do citoesqueleto de actina, adesão focal, orientação do axônio, interação MEC-receptor, endocitose, degradação de lisina e ferroptose.

Os achados ressaltam o papel dinâmico e regulatório das VEs na comunicação intercelular, evidenciando que mesmo com a ausência de variações significativas no tamanho e quantidade, há uma regulação molecular nessas estruturas (MELO-BÁEZ et al., 2023). Portanto, embora o AINE FM não tenha afetado a ocorrência da ovulação, quando administrado na mesma dose e via deste estudo (MORAES, 2020), e não tenha alterado a concentração e morfologia das VEs no fluido folicular, influenciou o perfil de miRNAs nas VEs, que por sua vez, alteram a regulação de vias celulares importantes para o processo ovulatório. Considerando que os miRNAs atuam regulando a expressão gênica ao se ligarem a mRNAs, promovendo sua

degradação ou inibindo sua tradução, a menor expressão de miRNAs observada no grupo AINE sugere que as vias metabólicas descritas estão mais ativas nesses folículos.

Fisiologicamente essas vias são críticas para diversos eventos, incluindo o processo ovulatório. O citoesqueleto de actina, a adesão focal e a interação MEC-receptor são fundamentais para as mudanças de forma e migração das células e portanto, podem estar envolvidos nesse aspecto nas células da granulosa e da teca, e para a ruptura folicular durante a ovulação (OGIWARA et al, 2023). A orientação do axônio (mesmo em um contexto não neural) e a endocitose estão ligadas a eventos essenciais para o desenvolvimento folicular, formação do corpo lúteo, como a angiogênese (KLAGSBRUN; EICHMANN, 2005) e captação de macromoléculas necessárias (SMYTHE; WARREN, 1991). A degradação de lisina, por sua vez, está ligada ao metabolismo energético (LEANDRO; HOUTEN, 2020), e a ferroptose é um mecanismo de morte celular (DIXON et al. 2012) que pode contribuir para a ruptura folicular e remodelação tecidual pós-ovulação.

Com base nesses achados e de estudos anteriores, observou-se que embora ocorra redução na concentração de PGF intrafolicular após tratamento sistêmico com o AINE FM a ovulação ainda acontece, isso sugere que outras vias ou mecanismos estão sendo usados para compensar a deficiência de prostaglandina e que a estimulação dessas vias poderia ser parte da resposta compensatória ou adaptativa em resposta ao tratamento. Novos estudos devem avaliar como esse AINE atua modulando a expressão gênica nas células da granulosa, especialmente de genes envolvidos na ovulação, e se essa administração altera a concentração de PGE no fluido folicular, buscando dessa forma entender de fato sua atuação.

#### 4. CONCLUSÃO

Em vista do exposto, conclui-se que o uso do anti-inflamatório, após indução da ovulação não afetou a concentração e tamanho das VEs do fluido folicular, porém influenciou a expressão dos miRNAs: bta-miR-584, bta-miR-369-5p, bta-miR-218 e bta-miR-411c-5p, presentes nas vesículas extracelulares. Nesse sentido, esses miRNAs estão relacionados a vias fisiológicas importantes, que foram ativadas significativamente, indicando uma modulação do AINE no ambiente folicular próximo ao processo ovulatório.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERISHA, B.; RODLER, D.; SCHAMS, D.; SINOWATZ, F.; PFAFFL, M.W. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 467, 2019.
- BRIDGES, P. J.; KOMAR, C. M.; FORTUNE, J. E. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F<sub>2α</sub> in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4713–4722, 2006.
- BRIDI, A.; SANGALLI, J.R.; NOCITI, R.P.; DOS SANTOS, A.C.; ALVES, L.; BASTOS, N.M.; FERRONATO, G.A.; ROSA, P.M.D.S.; FIORENZA, M.F.; PUGLIESI, G.; MEIRELLES, F.V.; CHIARITTI, M.R.; DA SILVEIRA, J.C.; PERECIN, F. Small extracellular vesicles derived from the crosstalk between early embryos and the endometrium potentially mediate corpus luteum function. **Biol Reprod.** v.112, p.54-69, 2025.

- DIXON, S.J.; LEMBERG, K.M.; LAMPRECHT, M.R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E.M.; GLEASON, C.E.; PATEL, D.N.; BAUER, A.J.; CANTLEY, A.M.; YANG, W.S.; MORRISON III, B.; STOCKWELL, B.R. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell.* v.149, p.1060-1072, 2012.
- GAD, A.; JOYCE, K.; MENJIVAR, N. G.; HEREDIA, D.; ROJAS, C.S.; TESFAYE, D.; GONELLA-DIAZA, A. Extracellular vesicle-microRNAs mediated response of bovine ovaries to seasonal environmental changes. *Journal of Ovarian Research*, v. 16, p. 101, 2023.
- KLAGSBRUN, M.; EICHMANN, A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. v. 16, n. 4-5, p. 535-548, 2005.
- LEANDRO, J.; HOUTEN, S.M. The lysine degradation pathway: Subcellular compartmentalization and enzyme deficiencies. *Mol Genet Metab*. 2020.
- MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, v. 58, p. 44-50, 2012.
- MELO-BÁEZ, B.; MELLISHO, E. A.; WONG, Y. S.; CABEZAS, J.; CAAMAÑO, D.; AGUILERA, C.; RIADI, G.; CASTRO, F. O.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L. Bovine embryos release extracellular vesicles with differential miRNA signature during the compaction and blastulation stages. *Reproductive Biology*, v. 23, n. 1, 2023.
- MORAES, F. P. **Estrógeno e prostaglandina F2 alfa no controle de funções reprodutivas em fêmeas bovinas**. 2020. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Curso de Pós-graduação em Fisiologia Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- MORAES, F. P.; D'AVILA, C. A.; OLIVEIRA, F. C.; CASTRO, N. A.; VIEIRA, A. D.; SCHNEIDER, A.; PFEIFER, L. F. M.; PEGORARO, L. M. C.; FERREIRA, R.; FERST, J. G.; ROVANI, M. T.; CORREA, M. N.; GONÇALVES, P. B. D.; LUCIA, T. Jr.; GASPERIN, B. G. Prostaglandin F<sub>2α</sub> regulation and function during ovulation and luteinization in cows. *Theriogenology*, v. 171, p. 30-37, 2021.
- OGIWARA, K.; FUJIMORI, C.; TAKAHASHI, T. The PGE2/Ptger4b pathway regulates ovulation by inducing intracellular actin cytoskeleton rearrangement via the Rho/Rock pathway in the granulosa cells of periovulatory follicles in the teleost medaka. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 560, 2023.
- SILVEIRA, J. C.; ÁVILA, A. C. F. C. M.; GARRETT, H. L.; BRUEMMER, J. E.; WINGER, Q. A.; BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. *Journal of Endocrinology*, v. 236, n. 1, p. R15-R27, 2018.
- SMYTHE, E.; WARREN, G. The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur J Biochem*. v. 202, p. 689-699, 1991.
- VALADI H.; EKSROM K.; BOSSIOS A.; SJOSTRAND M.; LEE, J. J.; LOTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 9, 654-659, 2007.