



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FRANCIELLY SOUSA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS
EM PLASMA DE CÃES COM DOENÇA VALVAR
MIXOMATOSA MITRAL: ESTUDO EXPLORATÓRIO**

**ILHÉUS, BAHIA
2024**

FRANCIELLY SOUSA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS
EM PLASMA DE CÃES COM DOENÇA VALVAR
MIXOMATOSA MITRAL: ESTUDO EXPLORATÓRIO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Biodiversidade, Clínica e Sanidade Animal

Sub-área da Dissertação: Clínica Médica de Pequenos Animais

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz

Co-orientadora: Prof. Dr. Carla Martins Kaneto

**ILHÉUS, BAHIA
2024**

S237 Santos, Francielly Sousa.
Identificação e caracterização de microRNAs
em plasma de cães com doença valvar mixomatosa
mitral: estudo exploratório / Francielly Sousa Santos.
– Ilhéus, BA: UESC, 2024.
71 f. : il. ; anexos.

Orientador: Alexandre Dias Munhoz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal .

Inclui referências e apêndices.

1. Cães – Doenças. 2. Biomarcadores. 3. Cardiolo-
gia. 4. MicroRNAs. I. Título.

CDD 636.70896

FRANCIELLY SOUSA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS EM PLASMA DE
CÃES COM DOENÇA VALVAR MIXOMATOSA MITRAL: ESTUDO
EXPLORATÓRIO**

DATA: Ilhéus - Bahia, 29/02/2024

Alexandre Dias Munhoz – DSc
UESC/DCAA
(Orientador)

Carla Martins Kaneto – DSc
UESC/DCB
(Co-orientadora)

Roueda Abou Said – DSc
UESC/DCAA

Júlio Israel Fernandes – DSc
UFRRJ/DMCV

**ILHÉUS, BAHIA
2024**

Dedico este trabalho a Deus, a Jesus, a Espiritualidade, ao Universo, a minha família (Francisco, Maria Raimunda e Grazielle) e a todos os seres especiais que tornaram este momento possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Jesus, a Espiritualidade e ao Universo pela oportunidade concedida, pelo suporte oferecido e pelas boas vibrações emanadas, desde a seleção, a aprovação e a todos os momentos de aprendizados e de desafios encontrados ao longo destes dois anos de dedicação a pesquisa. Nada acontece sem a permissão do Pai. Tudo acontece da forma que precisa acontecer para nosso crescimento e evolução.

A meus pais, Francisco e Maria Raimunda, e minha irmã, Grazielle, por todo amor, união, troca e suporte, desde os pequenos detalhes do dia a dia, até os momentos mais cruciais desse processo. Vocês são as maiores bênçãos que o Divino me proporcionou ter, conviver e amar. A vocês eu dedico cada conquista que obtive até aqui, que sempre foi uma conquista “nossa”!

Ao meu orientador, professor Alexandre Munhoz, pela atenção, ensinamentos, aprendizado e incentivos oferecidos ao longo do percurso. Uma gratidão ainda mais especial em poder me proporcionar trabalhar com cardiologia ao seu lado!!! Desejo muito mais dessa troca de experiências, vivências e profissionalismo para nós!

A professora Carla Kaneto pela paciência, ensinamentos, suporte, incentivo, acolhimento que sempre me ofereceu desde o primeiro encontro. Serei sempre grata a Deus por ter colocado você em meu caminho. Desejo um caminho próspero e feliz a ti, sempre!

A querida veterinária Alice Ribeiro pela contribuição, parceria, paciência, conselhos, aprendizados, e por todos os ecocardiogramas feitos com amor, dedicação e empenho, além das indicações de pacientes para este projeto. Você foi uma das peças-chave para a realização da pesquisa. E te conhecer foi um grande privilégio neste mestrado.

As colegas veterinárias Caroline Meira, Lorena Andrade e Camila Andrade pela contribuição e auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa. Cada uma de vocês teve um papel especial e relevante durante todo o processo.

Aos poucos e valiosos amigos queridos que tenho e que me acompanharam em todo o percurso (Gabriel, Tiago, July, Jamille, Marcos, Jade, Suellen, Mércia, Serginho, Mariana, Anderson e Suelson, representando a “tribo”), seja através de palavras de incentivo, um abraço amigo, sugestões de ideias e até mesmo ajudando ativamente durante etapas da própria pesquisa. A vocês, que sempre me mostram a minha real capacidade, sempre acreditam em mim e que não fazem ideia de como eu vou longe com a força que me oferecem: obrigada, mil vezes!

Aos meus colegas da pós-graduação, em particular a Jamille Carvalho, ao José Varjão, a Inês Pereira, a Gabriela Oliveira, a July Lima, a Gisele Dias e a Marina Cartagena, pelos bons momentos de aprendizado, auxílio, troca de energias, ideias, desabafos e risadas. Deus nos proporciona encontros incríveis. E foi ótimo encontrar (e reencontrar) vocês nesta caminhada. O apoio de vocês em todo este tempo certamente foi fundamental para que este momento se tornasse real.

Aos alunos de Iniciação Científica pela colaboração e disponibilidade de sempre!

Aos professores e demais profissionais do Curso de Medicina Veterinária da UESC e do PPGCA-UESC, pelos ensinamentos e colaboração oferecidos.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UESC, como a Maria Silvina, o Givaldo, o Muquita, a Fabiana, a Eliege e o Ivo, por toda a ajuda, disponibilidade, carinho e confiança que vocês sempre me ofereceram.

Aos funcionários e colegas das clínicas veterinárias parceiras que contribuíram para a pesquisa.

A CAPES, pelo suporte para a realização da pesquisa mediante a concessão de bolsa para estudo.

A todos os cães e tutores que se propuseram a participar do projeto, contribuindo de forma valiosa para que esta pesquisa acontecesse.

Aos meus “filhos de quatro patas”, que me acompanham desde muito tempo nesta jornada (meus velhinhos), e não seria diferente neste período de mestrado. O amor, a companhia e a troca de energia de vocês são tudo para mim. Vocês são meus tesouros na Terra! Sou privilegiada por ter cada um dos meus pequenos comigo.

Por fim, a minha gratidão eterna a todos, entre encarnados e desencarnados, que participaram da minha vida neste período de mestrado.

“Fora da caridade (amor) não há salvação.”

Allan Kardec

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS EM PLASMA DE CÃES COM DOENÇA VALVAR MIXOMATOSA MITRAL: ESTUDO EXPLORATÓRIO

RESUMO

Os microRNAs vem surgindo como potenciais biomarcadores promissores para doenças cardiovasculares em humanos e animais. Este estudo experimental, prospectivo e exploratório teve como objetivo analisar a expressão de microRNAs circulantes em cães saudáveis e com a doença valvar mixomatosa mitral (DVMM) nos diferentes estágios, determinar um normalizador endógeno direcionado a análise dos dados expressos e verificar o comportamento da expressão dos microRNAs. Para isso, foram recrutados 35 cães entre animais saudáveis e com a DVMM, os quais foram divididos em quatro grupos, respeitando a classificação ACVIM para a doença: grupo A (n=9); grupo B1 (n=11); grupo B2 (n=5); grupo C (n=10). Os animais foram submetidos a exames diagnósticos (exame clínico, ecocardiograma, eletrocardiograma e radiografia torácica) e amostras de sangue foram colhidas. Dados clínicos (idade, peso, sexo, raça, frequência cardíaca e grau do sopro) foram coletados para análise. As amostras foram extraídas pelo método TRIZOL e o RNA isolado foi utilizado para a síntese de cDNA com kit comercialmente disponível. A expressão dos microRNAs miR-30b, miR-128 e miR-130b foi realizada utilizando o método RT-PCR quantitativa. O cálculo do nível de expressão foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$. Para a determinação do normalizador, os dados de expressão dos microRNAs foram avaliados por um conjunto de ferramentas de bioinformática *online* (*RefFinder*). Após seleção do normalizador, os dados de expressão dos microRNAs restantes foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, com os dados paramétricos analisados pela *one way ANOVA* e o *post test* de *Tukey*, e os dados não paramétricos avaliados pelo *Kruskall-Wallis* e o teste *Student-Newman-Keuls*, através dos programas Prism 5.01 e BioEstat 5.3. Como resultados, 25 amostras viáveis foram utilizadas no experimento, divididas pelos grupos da seguinte forma: grupo A (n=4); grupo B1 (n=9); grupo B2 (n=4); grupo C (n=8). Os dados clínicos apresentados obtiveram resultados condizentes com os encontrados na literatura. O miR-128 foi o microRNA mais estável detectado e foi selecionado como normalizador do estudo. Na análise de expressão dos demais microRNAs, o miR-30b mostrou uma expressão diferencial reduzida em cães do grupo C em comparação aos grupos A e B2. Na análise de expressão do miR-130b houve uma redução gradativa da expressão dos grupos com DVMM (B1, B2 e C), porém sem que houvesse diferença significativa entre grupos. Desta forma, pode-se concluir que o miR-128 pode ser utilizado como normalizador endógeno para análise da expressão de microRNAs circulantes na DVMM. O miR-30b apresentou redução significativa da expressão em pacientes sintomáticos, enquanto o miR-130b demonstrou uma tendência a redução gradual da expressão em cães doentes.

Palavras-chave: biomarcador; cardiologia; microRNA; normalizador; valvulopatia.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MICRORNAS IN PLASMA OF DOGS WITH MYXOMATOUS MITRAL VALVE DISEASE: AN EXPLORATORY STUDY

ABSTRACT

MicroRNAs have emerged as promising potential biomarkers for cardiovascular diseases in humans and animals. This experimental, prospective, and exploratory study aimed to analyze the expression of circulating microRNAs in healthy dogs and those with mitral myxomatous valve disease (MMVD) at different stages, to determine an endogenous normalizer aimed to analyze the data expressed and to verify the behavior of microRNA expression. To this end, 35 dogs were recruited, including healthy animals and those with MMVD. The subjects were divided into four groups according to the ACVIM classification for the disease: group A (n=9), group B1 (n=11), group B2 (n=5), and group C (n=10). Diagnostic tests were performed on the animals, including a clinical examination, echocardiogram, electrocardiogram, and chest X-ray. Blood samples were also collected. Clinical data (age, weight, gender, breed, heart rate, and degree of murmur) was collected for analysis. Samples were extracted using the TRIZOL method and the isolated RNA was used for cDNA synthesis using a commercially available kit. The expression of the microRNAs miR-30b, miR-128, and miR-130b was carried out using the quantitative RT-PCR method. The expression level was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method. To identify the normalizer, the microRNA expression data was evaluated using a set of online bioinformatics tools (RefFinder). After selecting the normalizer, the remaining microRNA expression data was submitted to the Shapiro-Wilk normality test, with parametric data analyzed by one-way ANOVA and Tukey's posttest, and non-parametric data evaluated by Kruskal-Wallis and the Student-Newman-Keuls test, using the Prism 5.01 and BioEstat 5.3 programs. Consequently, 25 viable samples were utilized in the experiment, which were divided into the following groups: Group A (n=4), Group B1 (n=9), Group B2 (n=4), and Group C (n=8). The clinical data presented were consistent with those found in the literature. The miR-128 was the most stable microRNA detected and was selected as the study's normalizer. In the expression analysis of the other microRNAs, miR-30b showed reduced differential expression in dogs in group C compared to groups A and B2. In the analysis of miR-130b expression, there was a gradual reduction in expression in the groups with MMVD (B1, B2, and C), although there was no significant difference among the groups. Therefore, it can be concluded that miR-128 can be used as an endogenous normalizer for analyzing the expression of circulating microRNAs in MMVD. The miR-30b demonstrated a significant reduction in expression in symptomatic patients, while miR-130b exhibited a tendency towards a gradual reduction of expression in sick dogs.

Keywords: biomarker; cardiology; microRNA; normalizer; valvulopathy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Biogênese dos microRNAs, representando a via canônica e não canônica.
Fonte: Adaptado de (O'BRIEN *et al.*, 2018)..... 26
- Figura 2** – Níveis de estabilidade do miR-30b, miR-128 e miR-130b avaliados em amostras do grupo A (n=4) e dos grupos B1 (n=9), B2 (n=4) e C (n=8) a partir de quatro ferramentas de algoritmo: a) *BestKeeper*; b) Delta CT (limiar de ciclagem); c) *Genorm*; d) *NormFinder*. No gráfico e) observa-se a análise global feita pela plataforma *RefFinder*, baseada na junção das informações decorrentes dos quatro algoritmos utilizados. Fonte: elaboração própria..... 45
- Figura 3** – Expressão relativa do cfa-miR-30b em amostras de plasma de cães sem e com DVMM..... 46
- Figura 4** – Expressão relativa do cfa-miR-130b em amostras de plasma de cães sem e com DVMM..... 47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sistema de estadiamento e recomendações de diagnóstico e tratamento para a Doença Valvar Mixomatosa Mitral.....	22
Quadro 2 – Resumo dos principais microRNAs expressos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aspectos clínicos dos cães incluídos no estudo de acordo com os grupos.....	43
Tabela 2 – Valor de estabilidade dos microRNAs miR-30b, miR-128 e miR-130b.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACVIM	<i>American College of Veterinary Internal Medicine</i>
AE/Ao	Relação átrio esquerdo/aorta
AGO	Argonauta
CKCS	Cavalier King Charles Spaniel
CMD	Cardiomiopatia Dilatada
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
CT	Limiar de ciclo
cTnI	Troponina cardíaca I
DAC	Doença Arterial Coronariana
DIVeDN	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado
DVMM	Doença Valvar Mixomatosa Mitral
EP	Estenose Pulmonar
GW182	Glicina-triptofano de 182 kDA
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
ICCD	Insuficiência Cardíaca Congestiva Direita
ICCE	Insuficiência Cardíaca Congestiva Esquerda
IM	Infarto do Miocárdio
M-VLAS	<i>Modified Vertebral Left Atrial Size</i>
miRISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RN
mRNA	RNA mensageiro
NGS	Sequenciamento de próxima geração
NT-proBNP	N-terminal pró-peptídeo natriurético tipo-B
PA	Pressão Arterial
PDA	Persistência do Ducto Arterioso
PDE3A	Fosfodiesterase 3A
RM	Regurgitação Mitral
RLAD	<i>Radiographic Left Atrial Dimension</i>
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa de transcrição reversa em tempo real
TFD	Taxa de falsa descoberta
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
VHS	<i>Vertebral Heart Size</i>
VLAS	<i>Vertebral Left Atrial Size</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO GERAL	17
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.....	18
4.1.1 Epidemiologia, fisiopatogenia, clínica e história natural da doença.....	18
4.1.2 Estadiamento, diagnóstico e tratamento da DVMM.....	20
4.2 Os microRNAs.....	25
4.2.1 Aspectos gerais dos microRNAs.....	25
4.2.1.1 Síntese, biogênese e mecanismo de regulação.....	25
4.2.1.2 Função, biologia e aplicação clínica.....	27
4.2.1.3 Detecção de microRNAs e previsão de gene-alvo.....	29
4.2.2 Uso do microRNAs como potenciais biomarcadores para doenças cardíacas.....	29
4.2.2.1 Principais microRNAs envolvidos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.....	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Tipo do estudo e solicitação de Consentimento Livre e Esclarecido.....	38
5.2 Seleção dos animais e coleta de material.....	38
5.3 Extração e quantificação do RNA.....	39
5.4 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	40
5.5 Determinação de um normalizador endógeno.....	41
5.6 Análise RT-PCR quantitativa (RT-qPCR).....	41
5.7 Análise estatística.....	42
6 RESULTADOS	43
6.1 Características clínicas gerais dos animais.....	43
6.2 Identificação do normalizador endógeno.....	43
6.3 Expressão do miR-30b em cães com DVMM.....	46
6.4 Expressão do miR-130b em cães com DVMM.....	46
7 DISCUSSÃO	48
8 CONCLUSÃO	53
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	63
ANEXO	66

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares correspondem em até 10% da casuística clínica de cães. Dentro deste percentual, a Doença Valvar Mixomatosa Mitral (DVMM) é conhecida como a doença cardiovascular adquirida mais comum em cães, chegando a representar até 75% das cardiopatias diagnosticadas na espécie (KEENE *et al.*, 2019), e pode alcançar valores próximos a 100% em pacientes idosos e de raças pequenas (BORGARELLI e BUCHANAN, 2012). Ela é considerada como importante causa de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e morte cardíaca em cães (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; MARKBY *et al.*, 2017). Um monitoramento constante e programado é fundamental para o manejo da doença em todos os seus estágios (GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017).

A descoberta do primeiro microRNA (miRNA) foi considerada um marco na área da biologia molecular (CHANG; MENDELL, 2007; O'BRIEN *et al.*, 2018; WAHID *et al.*, 2010). Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes de fita simples que atuam como reguladores negativos da expressão gênica a nível pós-transcricional (LI *et al.*, 2015). A transcrição de uma série de genes pode ser influenciada pelos microRNAs, os quais são considerados como reguladores fundamentais em uma gama de condições fisiológicas e patológicas (HULANICKA *et al.*, 2014). Estudos na área de expressão gênica demonstraram um papel importante destas moléculas na fisiologia cardíaca e em doenças cardiovasculares (COLPAERT; CALORE, 2019).

Biomarcadores são indicadores biológicos que são quantificados com o intuito de verificar processos biológicos, patológicos ou de resposta aos tratamentos, oferecendo informações sobre a condição do indivíduo (KAMAL; SHARIDAN, 2020). Na última década, tem sido observado um impulso crescente para a formulação de novos marcadores genéticos e genômicos para doenças cardiovasculares (HULANICKA *et al.*, 2014).

Nesse cenário, os microRNAs vêm surgindo como potenciais biomarcadores promissores para diagnóstico e/ou prognóstico de diversas doenças cardiovasculares em humanos e modelos animais (COLPAERT; CALORE, 2019; GURHA, 2016; HULANICKA *et al.*, 2014; RO *et al.*, 2021a; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017). Em cães, os estudos realizados apontam para alteração da expressão de microRNAs em quadros de DVCM (BAGARDI *et al.*, 2022; GUILARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018; LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021;2021a; YANG *et al.*, 2017;2018), Cardiomiopatia Dilatada (STEUDEMANN *et al.*, 2013), ICC (CHEN *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018), Fibrilação

atrial (ZHANG *et al.*, 2015), condições que cursem com hipertrofia concêntrica e excêntrica (RO *et al.*, 2021a), dirofilariose (BRAMAN *et al.*, 2018; TRITTEN *et al.*, 2014) e cardiotoxicidade induzida por doxorubicina (BEAUMIER *et al.*, 2020).

Para a DVMM, evidências apontam que os microRNAs miR-30b (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014) e o miR-130b (RO *et al.*, 2021; 2021a) apresentam uma maior propensão para se tornarem biomarcadores potenciais. No entanto, os estudos apresentaram resultados distintos (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014, RO *et al.*, 2021;2021a), e em dois dos estudos, os autores avaliaram os animais em um único grupo B (HULANICKA *et al.*, 2014; RO *et al.*, 2021a), não sendo possível estabelecer quais as verdadeiras expressões existentes entre as amostras de cães estágio B1 e B2 separadamente.

Com base no exposto, ainda existem diversas lacunas no estudo dos microRNAs na DVMM, o que impacta diretamente na sua aplicação clínica como biomarcadores. Desta maneira, investigações adicionais, com objetivo de tentar entender alguns processos ainda não verificados, podem auxiliar na seleção de microRNAs confiáveis para a doença em seus diferentes estágios.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de microRNAs circulantes de cães sem e com Doença Valvar Mixomatosa Mitral

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar um microRNA normalizador endógeno para análise de expressão da doença;
- Analisar o comportamento da expressão dos microRNAs nos diferentes grupos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Doença Valvar Mixomatosa Mitral

4.1.1 Epidemiologia, fisiopatogenia, clínica e história natural da doença

A doença valvar mixomatosa mitral (DVMM), também chamada endocardiose de mitral, doença mixomatosa da válvula mitral, doença valvular degenerativa crônica, dentre outras denominações, é a doença cardiovascular adquirida que mais acomete os cães, sendo importante causa de insuficiência cardíaca e morte cardíaca nestes animais (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; MARKBY *et al.*, 2017). A valva atrioventricular esquerda ou mitral é a válvula mais acometida, porém, a doença pode afetar a válvula atrioventricular direita ou tricúspide em conjunto, ou isoladamente (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012).

A sua ocorrência está atrelada a raça e a idade, afetando principalmente cães de pequeno porte (com peso inferior a 20kg) e idosos (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; MATTIN *et al.*, 2015; OYAMA *et al.*, 2020). Entre as raças predispostas, tem-se o Cavalier King Charles Spaniel (CCKS) e o Daschund como principais acometidos, além de Poodles, Shih-tzus, Pinschers, Yorkshires Terrier, Chihuahuas, Beagles, Cocker Spaniels, entre outros (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; MATTIN *et al.*, 2015). Cães machos tem maior risco de desenvolver a doença, sobretudo em idade mais jovem, quando comparado às fêmeas (BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; MATTIN *et al.*, 2015).

O entendimento da etiologia e mecanismos envolvidos no desenvolvimento, progressão e gravidade da DVMM ainda permanece inconclusivo e sob investigação (GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; LEWIS *et al.*, 2011; MADSEN *et al.*, 2011). Uma condição hereditária foi relatada, sugerindo uma herança poligênica, principalmente em raças com alta predisposição para o desenvolvimento da doença, como os CCKSs e Daschunds (LEWIS *et al.*, 2011; MADSEN *et al.*, 2011; MENCIOTTI; BORGARELLI, 2017; O'BRIEN; BEIJERINK; WADE, 2021). Estudos na área da biologia molecular (incluindo genes e RNAs não codificantes – mRNAs e microRNAs –) tem ganhado amplitude recentemente, com vistas a obter mais informações acerca de genes e vias essenciais envolvidas na patogenia da DVCM (O'BRIEN; BEIJERINK; WADE, 2021).

Em sua fisiopatogenia, são observadas lesões degenerativas crônicas e progressivas (degeneração mixomatosa) que afetam os folhetos valvulares, podendo se estender as cordas

tendíneas. As lesões se iniciam como pequenos nódulos em sua borda livre, que crescem e coalescem, gerando encurtamento e espaçamento dos folhetos em fase avançada (FOX, 2012; MARKBY *et al.*, 2017). Isso acontece em decorrência da destruição e desregulação das fibras de colágeno e elastina, e expansão da camada esponjosa das válvulas (por ação proteolítica – colagenases, elastases e metaloproteinasas –, ativação de células intersticiais valvulares em fenótipo miofibroblástico e aumento na síntese de glicosaminoglicanos e proteoglicanos), além da participação de eventos moleculares (inflamatórios, metabólicos, bioquímicos e neuro-hormonais, como a via de sinalização da serotonina e do fator de crescimento transformador beta – TGF- β –) (LACERDA *et al.*, 2012; MARKBY *et al.*, 2017; MENCIAOTTI; BORGARELLI, 2017; OYAMA *et al.*, 2020).

Como resultado desta sequência de eventos, ocorre prejuízo à função biomecânica da válvula, com conseqüente prolapso valvular durante a sístole e falha na coaptação de seus folhetos, desencadeando na regurgitação mitral (RM). Com o avançar da doença, alterações estruturais decorrentes do aumento de volume e pressão no átrio esquerdo começam a surgir, com aumento no trabalho cardíaco, dilatação anular e piora da regurgitação. Finalmente, ocorre o remodelamento atrial e ventricular esquerdos (hipertrofia excêntrica), que culmina com disfunção ventricular e, eventualmente, pode evoluir para o quadro de insuficiência cardíaca congestiva esquerda (ICCE) (GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; KEENE *et al.*, 2019; LACERDA *et al.*, 2012; MADSEN *et al.*, 2011; MENCIAOTTI; BORGARELLI, 2017; OYAMA *et al.*, 2020).

Clinicamente, a DVMM pode se apresentar de duas formas: a fase pré-clínica, em que os cães apresentam a doença de forma assintomática, representando a maioria dos animais que possuem a doença; e a fase clínica, quando entram em ICCE e apresentam sinais clínicos (iminentes ou incidentes). Os sinais clínicos observados estão atrelados à condição congestiva e de edema pulmonar gerado pelo quadro de insuficiência cardíaca. Inicialmente, pode ser observada intolerância ao exercício, aumento da frequência respiratória em repouso e tosse nos animais, que pode evoluir para desconforto respiratório importante, taquipneia, síncope e letargia. Sinais decorrentes de insuficiência cardíaca congestiva direita (ICCD), como distensão abdominal por ascite e/ou hepatomegalia e esplenomegalia, sinais gastrointestinais (vômito, diarreia e anorexia) e dificuldade respiratória por derrame pleural, também podem ser observados em quadros mais graves (LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; WARE; BONAGURA, 2022).

Um sopro holossistólico apical esquerdo é evidenciado durante a auscultação cardíaca, em decorrência da RM, sendo fortemente sugestivo da doença (BORGARELLI;

HAGGSTROM, 2010; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; WARE; BONAGURA, 2022). A sua intensidade está correlacionada com a progressão da doença, podendo ser graduado em seis níveis de acordo com a escala de Levine modificada para sopros sistólicos, ou agrupada em quatro níveis de intensidade para a DVCM (suave, moderado, alto e murmúrio pungente) (LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023). Em animais assintomáticos, este é o primeiro aspecto a ser observado (WARE; BONAGURA, 2022). A presença do sopro associada ao histórico de sinais clínicos (KEENE *et al.*, 2019), e a demais alterações de exame físico (como aumento da frequência cardíaca e respiratória, dispneia, presença de ruídos respiratórios adventícios descontínuos finos, arritmias entre outros) (WARE; BONAGURA, 2022), pode contribuir para suspeita clínica em animais sintomáticos, além de ser relacionado a um prognóstico ruim (KEENE *et al.*, 2019; MENCIAOTTI; BORGARELLI, 2017).

A DVMM é caracterizada por possuir um período longo pré-clínico, geralmente com progressão lenta em animais de pequeno porte, podendo durar anos até o início dos sinais clínicos da doença (BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017). A progressão da doença é variável. É provável que a maioria dos cães venha a óbito por outras razões, sem evoluir para insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010). Entretanto, cães que desenvolvem a ICC podem evoluir rapidamente para o óbito (FOX, 2012).

4.1.2 Estadiamento, diagnóstico e tratamento da DVCM

O *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) publicou, em 2009, a primeira diretriz voltada ao diagnóstico e tratamento da DVMM em cães, por meio de declarações de consenso entre diversos autores e especialistas. Essa diretriz foi baseada no esquema de classificação para doenças cardíacas e insuficiência cardíaca em humanos do *American College of Cardiology/American Heart Association* (2001), e trouxe uma nova proposta para a classificação da DVMM com o intuito de relacionar a gravidade das alterações morfológicas e dos sinais clínicos, com o tratamento adequado para seus respectivos estágios (ATKINS *et al.*, 2009).

O estudo EPIC ganhou atenção especial na última década, sendo considerado o maior estudo da cardiologia veterinária existente (BOSWOOD *et al.*, 2016). Boswood *et al.* (2016) obtiveram resultados promissores ao demonstrar que pacientes que fizeram uso do fármaco pimobendan no estágio B2 da DVMM, apresentaram um prolongamento na fase pré-clínica da

doença, com um retardo no início dos sinais de ICC ou morte cardíaca e/ou eutanásia, em um período de até 15 meses, quando comparado ao grupo placebo. Suas evidências robustas levaram a atualização da diretriz ACVIM (Quadro 1), com estabelecimento de parâmetros específicos para a determinação de pacientes no estágio B2, de acordo com os critérios de inclusão do referido estudo (BOSWOOD *et al.*, 2016; KEENE *et al.*, 2019).

Uma atualização do documento foi elaborada em 2019, com alterações significativas, particularmente com ênfase em parâmetros diagnósticos e terapêuticos de pacientes do estágio B. Um resumo do esquema de estadiamento, diagnóstico e tratamento é apresentado no Quadro 1.

De acordo com as recomendações do consenso, os animais pertencentes ao estágio A são cães saudáveis de raças predispostas ao desenvolvimento da DVMM. Os animais do estágio B1 e B2 são cães pertencentes a fase pré-clínica da doença, em que cães do estágio B1 possuem sopro sistólico e podem ou não ter remodelamento atrial e ventricular discretos, e animais do estágio B2 possuem sopro sistólico e um grau de remodelamento atrioventricular condizente com os critérios de inclusão do estudo EPIC. Animais do estágio C e D pertencem a fase clínica da doença, com sinais de ICC iminente ou incipiente (KEENE *et al.*, 2019).

A ecocardiografia transtorácica é considerada o exame padrão-ouro para o diagnóstico definitivo da DVMM. Este exame possibilita avaliar as alterações estruturais nos folhetos valvulares e a gravidade da regurgitação mitral, verificar a gravidade do remodelamento cardíaco, avaliar a presença de disfunção ventricular e estimar a pressão existente no interior das câmaras cardíacas (BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; MENCIOTTI; BORGARELLI, 2017; WARE; BONAGURA, 2022).

A relação átrio esquerdo/aorta (AE/Ao) e o diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado pelo peso corporal (DIVEdN) são exemplos de medidas cruciais (LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; MENCIOTTI; BORGARELLI, 2017; WARE; BONAGURA, 2022), sendo essenciais para a identificação de pacientes B2 (KEENE *et al.*, 2019). Apesar da relevância da ecocardiografia, lesões iniciais da DVMM podem passar despercebidas caso o exame não seja realizado por um ecocardiografista experiente, e medidas diagnósticas adicionais são sugeridos para esta fase da doença (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022).

Quadro 1 – Sistema de estadiamento e recomendações de diagnóstico e tratamento para a Doença Valvar Mixomatosa Mitral

ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO	DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO
A	Cães com alto risco de desenvolvimento da doença (raças predispostas) e não apresentam sopro.	Ecocardiograma em CCKS Revisão e auscultação anual em veterinário	Sem indicação de tratamento
B1	Cães com sopro, assintomáticos e sem ou com grau leve de remodelamento.	Ecocardiograma, radiografia torácica e aferição da PA	Sem indicação de tratamento
B2	Cães com sopro, assintomáticos e grau significativo de remodelamento (critérios EPIC).	Sopro cardíaco: $\geq 3/6$; Ecocardiograma: Relação AE/Ao: $\geq 1,6$; DIVEdN: $\geq 1,7$; Radiografia torácica: VHS: $>10,5$; VLAS: ≥ 3 . Aferição da PA	Medicamentoso: Pimobendan; IECA ¹
C	Cães com sopro, remodelamento e com sinais clínicos de insuficiência cardíaca. Pode-se observar pacientes em <u>quadros agudos emergenciais</u> (requer tratamento agudo, hospitalização e internação) ou em <u>quadros crônicos</u> (recebem atendimento ambulatorial)	Histórico, anamnese, exame clínico, ecocardiograma, radiografia torácica, aferição da PA, ECG, exames laboratoriais* e concentrações séricas de NTproBNP.	Quadros agudos: furosemida, pimobendan, IECA, suporte de O ₂ . - Falha do tratamento: dobutamina, redutores de pós-carga; - Outros: manejo do paciente. Quadros crônicos: furosemida ou torasemida (substituição), IECA, pimobendan, espironolactona. - Outros: antiarrítmicos, antitussígenos e broncodilatadores.
D	Cães em estágio terminal, refratários ao tratamento convencional padrão. O paciente necessita de tratamento avançado ou específico. Pode-se observar pacientes em <u>quadros agudos emergenciais</u> ou em <u>quadros crônicos</u> .	Histórico, anamnese, exame clínico, ecocardiograma, radiografia torácica, aferição da PA, ECG, exames laboratoriais* e concentrações séricas de NTproBNP.	Quadros agudos: furosemida ou torasemida (substituição), pimobendan, IECA, suporte de O ₂ . - Falha do tratamento: dobutamina, redutores de pós-carga; - Outros: sildenafil, antiarrítmicos, broncodilatadores, manejo do paciente. Quadros crônicos: furosemida ou torasemida (substituição), IECA, pimobendan, espironolactona. - Outros: hidralazina, sildenafil, antiarrítmicos, redutores de pós-carga, antitussígenos e broncodilatadores.

Fonte: Adaptado de KEENE *et al.*, 2019.

Abreviaturas: CKCS: Cavalier King Charles Spaniel; PA: Pressão arterial; AE/Ao: Átrio esquerdo/Aorta; DIVEdN: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado; VHS: Vertebral Heart Size; VLAS: Vertebral Left Atrial Size; IECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina; ECG: eletrocardiograma; NT-proBNP: N-terminal pró-peptídeo natriurético tipo-B; O₂: Oxigênio.

*Hemograma, bioquímicos (uréia, creatinina, proteínas totais e eletrólitos) e urinálise.

¹é sugerido por metade dos painelistas em exame inicial ou diante aumento acentuado do átrio esquerdo em exames seriados. Segundo o consenso, os ensaios clínicos que utilizam o IECA nesta fase apontam resultados mistos.

Paralelamente, a radiografia torácica é o exame que auxilia na identificação de alterações hemodinâmicas resultantes da doença (ao avaliar o aumento das câmaras cardíacas e detectar sinais de congestão e edema pulmonar), ajuda no acompanhamento de animais assintomáticos, podendo estabelecer um parâmetro basal para o paciente, assim como pode contribuir para o diagnóstico de outras alterações traqueobrônquicas (BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; WARE; BONAGURA, 2022). Neste último ponto, vale ressaltar que os aspectos radiográficos observados nos estágios avançados da DVCM podem se assemelhar com doenças respiratórias crônicas e a interpretação dos resultados deve ser realizada em conjunto com outros achados (LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023).

Medidas do *Vertebral Heart Size* (VHS) para avaliar o tamanho global do coração (BUCHANAN; BÜCHELER, 1995), do *Vertebral Left Atrial Size* (VLAS) (MALCOLM *et al.*, 2018), do *Modified Vertebral Left Atrial Size* (M-VLAS) (LAM; GAVAGHAN; MEYERS, 2021), e do *Radiographic Left Atrial Dimension* (RLAD) (SÁNCHEZ SALGUERO *et al.*, 2018) para avaliar aumento do átrio esquerdo, foram estabelecidas e são estudadas, sendo as duas primeiras as mais utilizadas na rotina. Valores de corte para estabelecer medidas de VLAS para o estágio B2 da doença também foram estudados recentemente (MIKAWA *et al.*, 2020).

Demais exames complementares que podem ser recomendados para pacientes com DVMM incluem eletrocardiograma, aferição da pressão arterial, exames laboratoriais e biomarcadores circulantes (BOSWOOD *et al.*, 2018; KEENE *et al.*, 2019; LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; WARE; BONAGURA, 2022).

Os biomarcadores circulantes costumam ser indicados como análise complementar para o diagnóstico da doença, sendo o N-terminal pró-peptídeo natriurético tipo-B (NT-pro-BNP) e a Troponina cardíaca I (cTnI) os mais estudados (BAISAN *et al.*, 2016). Atualmente, a possibilidade do uso de microRNAs como biomarcadores vem ganhando destaque nas pesquisas (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018; LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021a).

O NT-proBNP é uma molécula produzida no tecido cardíaco atrial e ventricular e é liberada na circulação quando ocorre um aumento no estiramento e estresse ao miocárdio (BAISAN *et al.*, 2016; HORI *et al.*, 2020; OYAMA *et al.*, 2013). Níveis aumentados na circulação foram associados a um agravamento na DVMM e aumento do risco de desenvolvimento de ICC (BAISAN *et al.*, 2016; HORI *et al.*, 2020; OYAMA *et al.*, 2013; WESSELOWSKI *et al.*, 2023). Este é o biomarcador mais utilizado na rotina, sendo recomendado pelo consenso ACVIM (KEENE *et al.*, 2019). Uma de suas principais indicações é o seu uso

para diferenciar doenças cardíacas de alterações traqueobrônquicas em cães com sinais respiratórios (BAISAN *et al.*, 2016; OYAMA *et al.*, 2013).

A cTnI é uma proteína que é liberada na circulação em quadros de lesão miocárdica (BAISAN *et al.*, 2016; HORI *et al.*, 2020). Sua elevação na corrente sanguínea é proporcional ao dano tecidual gerado ao coração (BAISAN *et al.*, 2016), e um incremento de sua concentração foi correlacionado a um aumento na progressão e gravidade da DVMM em seus diferentes estágios, ainda que outro marcador (peptídeo natriurético atrial) tenha se mostrado melhor em identificar cães assintomáticos (HORI *et al.*, 2020).

Entre estes testes, o NT-proBNP é considerado relativamente acessível e menos dispendioso do que outros métodos diagnósticos, incluindo o ecocardiograma convencional. Depende do envio de amostras de plasma sob condições específicas até um laboratório de referência, e a liberação do resultado não é disponibilizada no mesmo dia (O'SHAUGHNESSY *et al.*, 2022). Já a cTnI atualmente não é utilizada como exame diagnóstico de rotina (WARE; BONAGURA, 2022).

Embora sejam observados benefícios no uso de tais biomarcadores, o fato de serem influenciados por doenças sistêmicas concomitantes, de não serem específicos para uma determinada doença cardíaca, de sofrerem variação em diferentes raças (NT-proBNP), de apresentarem instabilidade a temperatura ambiente e a condições repetidas de congelamento e descongelamento (NT-proBNP), ou de apresentarem condições particularidades na manipulação, acondicionamento e envio das amostras até o processamento laboratorial (BAISAN *et al.*, 2016; HORI *et al.*, 2020; OYAMA *et al.*, 2013; WESSELOWSKI *et al.*, 2023), tornam o seu uso limitado como medida diagnóstica única.

Com relação a abordagem terapêutica para a DVMM (Quadro 1), as medidas estabelecidas são voltadas a promover um retardo na progressão da doença em estágio assintomático e/ou sintomático, melhorando a hemodinâmica e oxigenação tecidual, e garantindo, assim, uma qualidade de vida e melhor sobrevida aos pacientes (KEENE *et al.*, 2019). Como já mencionado, o ensaio clínico EPIC mostrou o benefício do uso do pimobendan em cães no estágio B2 da doença, com retardo de até 60% no tempo de pertencimento na fase pré-clínica até alcançar o desfecho primário (iniciar ICC ou vir a óbito/eutanásia por doença cardíaca) (BOSWOOD *et al.*, 2016). Nos animais sintomáticos, a terapia é dividida em caráter emergencial (necessitando de internamento, acompanhamento e estabilização do paciente) e ambulatorial (em que os animais podem ser tratados em casa e acompanhados por profissionais veterinários em consultas regulares) (KEENE *et al.*, 2019).

4.2 Os microRNAs

4.2.1 Aspectos gerais dos microRNAs

4.2.1.1 Síntese, biogênese e mecanismo de regulação

Em 1993, o primeiro microRNA (*lin-4*) foi identificado a partir da análise genética de *Caenorhabditis elegans*, pelos grupos de pesquisadores Ambros e Ruykun. Seus estudos demonstraram que este microRNA controlava o tempo de desenvolvimento larval do nematoide, ao regular negativamente a expressão do gene *lin-14*, revelando a função reguladora destas moléculas (FEINBAUM; AMBROS; LEE, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993).

Mais tarde, um segundo microRNA foi identificado, *let-7*, o qual também participa no desenvolvimento do *C. elegans*, com ação regulatória negativa sobre genes-alvo, além de ser um miRNA conservado entre diferentes espécies incluindo vertebrados, organismos marinhos e artrópodes (PASQUINELLI *et al.*, 2000). Deste então, milhares de microRNAs foram detectados a partir de métodos de clonagem e RNA fracionado por tamanho, e, com os avanços genéticos nas áreas de sequenciamento de alto rendimento e análise de previsão e bioinformática, as pesquisas foram se aperfeiçoando, sobretudo na identificação de possíveis genes-alvo e suas funções em plantas e animais (CHANG; MENDELL, 2007; WAHID *et al.*, 2010).

Os microRNAs são nanomoléculas não codificantes endógenos de fita simples, contendo aproximadamente 22 nucleotídeos, que tem a função de silenciar ou regular negativamente a expressão gênica a nível pós-transcricional, através da degradação do RNA mensageiro alvo (por clivagem) ou impedimento de sua tradução (ao serem reprimidos translacionalmente) (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022; REDIS *et al.*, 2012; WAHID *et al.*, 2010). Existem alguns microRNAs que podem regular positivamente a expressão gênica ativando a tradução de genes, porém atuam em condições estritamente particulares (O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022; REDIS *et al.*, 2012).

A sua síntese começa a partir de um transcrito inicial primordial (pri-miRNA) em formato de grampo, gerado pela RNA polimerase II/III, o qual pode ser expresso de forma independente de um gene (miRNA intergênico) ou provenientes de íntrons ou éxons de genes codificantes (miRNA intragênico). O processamento destes pri-miRNAs em miRNAs maduros (biogênese) pode ocorrer por duas vias: canônica e não canônica (Figura 1) (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022).

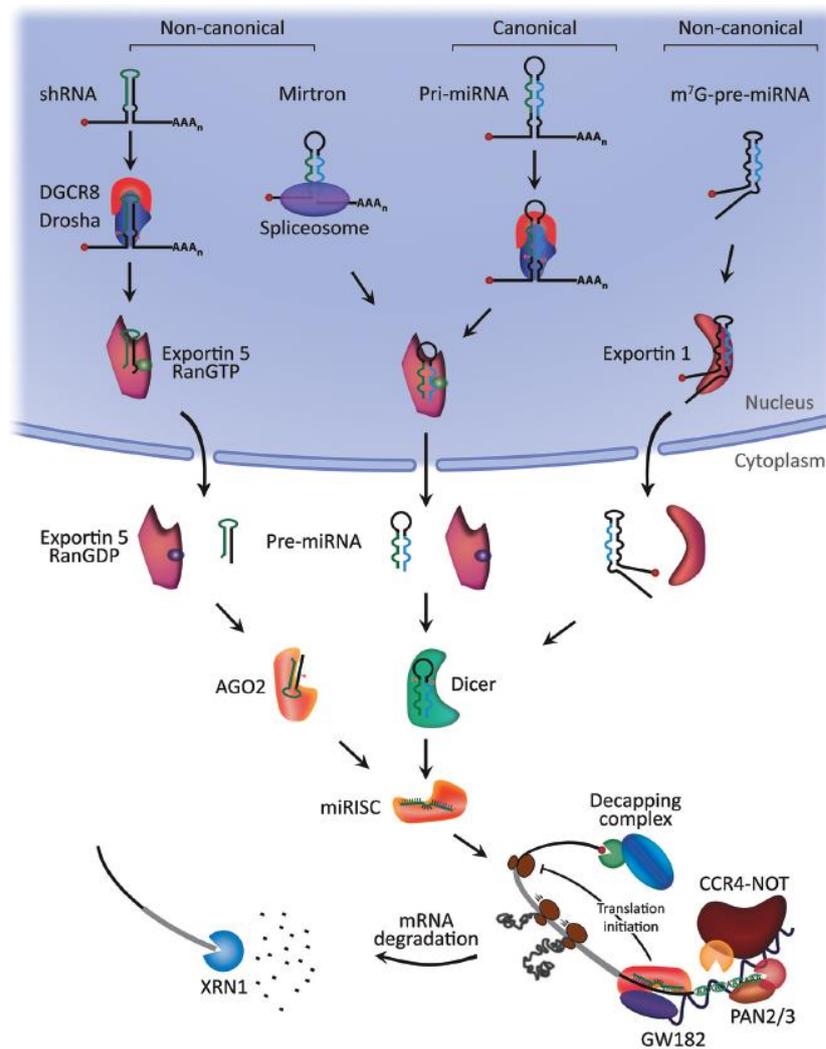


Figura 1 – Biogênese dos miRNAs, representando a via canônica e não canônica. Fonte: Adaptado de (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Na via canônica, o pri-miRNA é processado em um precursor de miRNA (pré-miRNA) pelo complexo multiprocessador contendo uma enzima ribonuclease III (Drosha), que cliva a estrutura em sua base. Em seguida, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela ação do complexo Exportina 5/RanGDP e processados por uma segunda enzima ribonuclease III, Dicer, formando um miRNA duplex maduro ao remover o seu loop terminal. Uma das fitas do miRNA duplex é conservada formando o miRNA maduro, e a segunda fita (fita passageira) é clivada e removida pela maquinaria celular. Por fim, a fita biologicamente ativa, se associa a proteína Argonata (AGO), que se liga a um conjunto de proteínas efetoras (glicina-triptofano de 182 kDA – GW182 e complexos poli(A)-deadenilases PAN2/3 e CCR4-NOT), gerando o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (miRISC) (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022).

Na via não canônica, os microRNAs podem ser gerados de forma independente do complexo multiprocessador ou independente de Dicer. No primeiro caso, os pré-miRNAs formados se assemelham ao substrato da Dicer, tendo como exemplos os *mirtrons* (que são provenientes de íntrons do mRNA advindos do *splicing*) e o 7-metilguanosina (que são transcritos diretamente em pré-miRNAs pela RNA polimerase II). Na forma independente de Dicer, os miRNAs são formados pelo complexo multiprocessador a partir de transcritos de RNA em grampo curto (shRNA) e maturados pela Argonauta 2 (AGO2). Independentemente da via, ambas geram um miRISC funcional (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010; O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022).

O miRISC é responsável pela interação do microRNA com o mRNA alvo (microRNA:mRNA) por meio de sequências nucleotídicas complementares. No geral, a interação microRNA:mRNA se dá através da região 3' não traduzida (UTR) do mRNA, que pode desencadear na deadenilação, decapagem e degradação desta molécula (quando ocorre complementaridade total entre os nucleotídeos do miRNA com o mRNA) ou na repressão translacional da sua tradução (quando ocorre complementaridade parcial entre os nucleotídeos do mRNA e da região de semente do microRNA – sequência do 2º ao 8º nucleotídeo a partir da extremidade 5' – associado a um pareamento adicional na extremidade 3' que garante estabilidade e precisão na interação) (O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022; WAHID *et al.*, 2010).

A interação microRNA:mRNA é algo complexo e depende de diversos fatores além dos mencionados acima, como a posição subcelular do microRNA, nível de mRNAs, alvos disponíveis e compatibilidade da interação. Normalmente, em animais, a forma mais comum de interação microRNA:mRNA é através da região de semente. E, em alguns casos, pode ocorrer uma interação do miRNA com outras regiões, como na extremidade 5'UTR do mRNA e por meio de sequência de codificação (levando ao silenciamento da expressão gênica) ou através de promotores de gene (ativando a transcrição) (O'BRIEN *et al.*, 2018; RANI; SENGAR, 2022).

4.2.1.2 Função, biologia e aplicação clínica

Os microRNAs são importantes reguladores que atuam em diversos processos fisiológicos, com funções críticas sobre vias celulares (como crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose), metabolismo e manutenção da homeostase tecidual, assim como exercem função reguladora sobre a resposta imune, resposta ao estresse e carcinogênese (GEBERT; MACRAE, 2019; HUANG, 2017; REDIS *et al.*, 2012; SCHULTE; KARAKAS;

ZELLER, 2017; WANG; CHEN; SEN, 2016). Também atuam como sinalizadores celulares, favorecendo a comunicação célula-célula (GEBERT; MACRAE, 2019; RANI; SENGAR, 2022).

Eles são expressos de forma específica em diferentes tecidos e tipos celulares e uma desregulação da sua expressão pode culminar em diversos processos patológicos (GEBERT; MACRAE, 2019; HUANG, 2017; REDIS *et al.*, 2012; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017; WANG; CHEN; SEN, 2016). Níveis desregulados de microRNAs foram relatados em numerosos estudos envolvendo o câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, doenças musculoesqueléticas, hepáticas e renais, diabetes, infecções virais e parasitárias, dentre outras afecções (HUANG, 2017; WANG; CHEN; SEN, 2016).

Com relação aos microRNAs circulantes, eles podem ser detectados em vários fluidos corporais como sangue, plasma, soro, urina, saliva, leite, líquido cístico, suco pancreático ou escarro (HUANG, 2017; KAMAL; SHAHIDAN, 2020; REDIS *et al.*, 2012; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017). A sua secreção pode ocorrer por vazamento celular passivo, ou de forma ativa por meio de vesículas derivadas de membranas celulares (como exossomos, micropartículas, vesículas de desprendimento e corpos apoptóticos) ou por associação proteína-miRNA (como lipoproteína de alta densidade [HDL], proteína Argonauta e nucleofosmida) (KAMAL; SHAHIDAN, 2020; RANI; SENGAR, 2022; REDIS *et al.*, 2012).

Estas moléculas tendem a ser bastante estáveis (HUANG, 2017; KAMAL; SHAHIDAN, 2020; REDIS *et al.*, 2012), principalmente devido a sua resistência a ação de ribonucleases, que pode ser decorrente: do seu acondicionamento em vesículas; do dobramento em formato de grampo, que leva a proteção das bases nucleotídicas; do tamanho da molécula; e/ou da sua ligação a proteína-microRNA. Isso possibilita que os microRNAs permaneçam por longos períodos presentes nos fluidos corporais (KAMAL; SHAHIDAN, 2020). Além disso, alguns estudos têm identificado uma resistência dos microRNAs a variadas condições de manuseio, como altos níveis de estresse, temperaturas elevadas, extremos de pH, ciclos sequenciados de congelamento e descongelamento, ebulição e longos períodos de armazenamento (KAMAL; SHAHIDAN, 2020; REDIS *et al.*, 2012).

Condições como sua estabilidade, o fato de serem encontrados amplamente em tecidos e fluidos biológicos, e de terem expressão tecidual específica em condições fisiológicas e patológicas, são aspectos que chamam a atenção para a utilização dos microRNAs como possíveis biomarcadores diagnósticos e/ou prognósticos não invasivos e alvos terapêuticos para uma série de doenças em humanos e animais (HUANG, 2017; KAMAL; SHAHIDAN, 2020; LI *et al.*, 2015; RANI; SENGAR, 2022; REDIS *et al.*, 2012; SCHULTE; KARAKAS;

ZELLER, 2017; WANG; CHEN; SEN, 2016). A facilidade de acesso aos microRNAs circulantes pode auxiliar no estabelecimento de novos marcadores que venham a ocupar espaços ainda não preenchidos pelos biomarcadores já existentes, com maior sensibilidade e especificidade (KAMAL; SHAHIDAN, 2020).

4.2.1.3 Detecção de microRNAs e previsão de gene-alvo

Diversas técnicas tem sido utilizadas para detectar e quantificar os níveis de microRNAs maduros nas amostras analisadas, como o ensaio de reação em cadeia da polimerase quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR), análise de *Northern blots*, hibridização *in situ*, *microarray* de microRNA, sequenciamento de próxima geração (NGS), ensaios de proteção de RNase e ensaio baseado em nanotecnologia (FORERO *et al.*, 2019; HUANG, 2017; REIS-FERREIRA *et al.*, 2022; SEMPERE; AZMI; MOORE, 2021; WANG; CHEN; SEN, 2016).

Dentre estes métodos, o ensaio de RT-qPCR é a técnica amplamente utilizada, com diferentes tipos de abordagens e kits comerciais disponíveis (FORERO *et al.*, 2019). Ela surgiu como um método de alta sensibilidade para identificar a expressão de microRNAs, através de uma pequena fração de material de partida (SEMPERE; AZMI; MOORE, 2021). Além disso, esta técnica superou aspectos relacionados ao tamanho curto dos microRNAs, ao fornecer uma sequência estendida em um primer capaz de permitir a transcrição reversa da sequência do microRNA compatível ao seu tamanho, com uso de uma sonda TaqMan® específica para cada microRNA estudado (FORERO *et al.*, 2019; SEMPERE; AZMI; MOORE, 2021). É considerada uma técnica padrão-ouro para detecção de microRNAs circulantes (REIS-FERREIRA *et al.*, 2022).

Além da detecção dos microRNAs, é importante também determinar qual sua função sobre os processos biológicos ou patológicos aos quais regulam. É evidente que a função biológica dos microRNAs está atrelada aos mRNAs que eles modulam. Logo, para entender a sua função, é preciso identificar seus alvos de regulação bem como identificar a interação existente entre eles. Uma das melhores formas de se chegar a este objetivo é através de predições computacionais de genes-alvo associadas a validação experimental das interações entre microRNA-mRNA alvo (CHANG; MENDELL, 2007; RIOLO *et al.*, 2021).

4.2.2 Uso do microRNAs como potenciais biomarcadores para doenças cardíacas

Estudos na área de expressão gênica tem demonstrado o importante papel dos microRNAs na regulação de processos biológicos relacionados ao desenvolvimento,

manutenção e função cardíaca. Também foi observado que a expressão anormal de microRNAs está atrelada a diversos distúrbios cardiovasculares (GURHA, 2016; HUANG, 2017; SHEHADEH; HARE, 2013; WANG; CHEN; SEN, 2016). Com isso, a aplicabilidade dos microRNAs como biomarcador diagnóstico, de acompanhamento de tratamento e prognóstico de doenças cardiovasculares tem sido extensivamente estudada (COLPAERT; CALORE, 2019; GURHA, 2016; REIS-FERREIRA *et al.*, 2022; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017; ZHAO, 2018).

Em humanos, foram relatados níveis alterados na expressão dos microRNAs em quadros de hipertrofia cardíaca, fibrose cardíaca, isquemia miocárdica, angiogênese, apoptose, contratilidade e regeneração cardíaca, e metabolismo lipídico, bem como em condições específicas como o infarto do miocárdio (IM), arritmias (fibrilação atrial), aterosclerose, doença arterial coronariana (DAC), cardiomiopatias, estenose aórtica e ICC, tanto a nível tecidual quanto circulante (COLPAERT; CALORE, 2019; GURHA, 2016; HUANG, 2017; WANG; CHEN; SEN, 2016; ZHAO, 2018). Alguns exemplos de microRNAs circulantes identificados e bastante estudados como possíveis marcadores são o miR-1, miR-208a e o miR-499, em quadros de ICC e IM (COLPAERT; CALORE, 2019; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017; ZHAO, 2018).

Em animais, além dos estudos que utilizam camundongos ou ratos como modelo experimental em investigações de condições cardiovasculares que comumente afetam os humanos (COLPAERT; CALORE, 2019; GURHA, 2016; SCHULTE; KARAKAS; ZELLER, 2017; ZHAO, 2018), também são encontrados estudos direcionados a cães (CHEN *et al.*, 2014; HULANICKA *et al.*, 2014; REIS-FERREIRA *et al.*, 2022; RO *et al.*, 2021; STEUDEMANN *et al.*, 2013) e gatos (JOSHUA *et al.*, 2023; WEBER *et al.*, 2015).

Em cães, observamos trabalhos direcionados a enfermidades cardiovasculares induzidas ou naturalmente adquiridas, avaliando o perfil de expressão e alteração nos níveis de microRNAs teciduais ou circulantes, e identificação e qualificação de microRNAs (CHEN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; REIS-FERREIRA *et al.*, 2022; RO *et al.*, 2021a; STEUDEMANN *et al.*, 2013). Foram observadas alterações na expressão de microRNAs em quadros de ICC (CHEN *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018), doença valvar mixomatosa mitral (DVMM) (BAGARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018; LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021a,b), cardiomiopatia dilatada (CMD) (STEUDEMANN *et al.*, 2013), arritmias (Fibrilação atrial) (ZHANG *et al.*, 2015), condições que levam a hipertrofia concêntrica e excêntrica (como Estenose pulmonar e Persistência do ducto arterioso) (RO *et al.*, 2021a), dirofilariose (BRAMAN *et al.*, 2018; TRITTEN *et al.*, 2014) e cardiotoxicidade induzida por

doxorubicina (BEAUMIER *et al.*, 2020). Também foi relatado por Vacchi-Suzzi *et al.* (2013) o perfil de expressão de microRNAs em diferentes fragmentos de tecido cardíaco saudável de cães, macacos e ratos, com o objetivo de produzir um atlas transcriptômico do coração (VACCHI-SUZZI *et al.*, 2013).

Já em gatos, foram observados estudos voltados a avaliação do perfil de expressão de microRNAs em musculatura cardíaca esquerda (JOSHUA *et al.*, 2023) e soro (WEBER *et al.*, 2015) de animais com cardiomiopatia hipertrófica (CMH).

4.2.2.1 Principais microRNAs envolvidos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães

Os estudos abrangendo os microRNAs na DVMM em cães começaram a surgir por volta de uma década. De lá para cá, dentre os trabalhos encontrados, a maior parte avalia microRNAs circulantes (soro e plasma) (BAGARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018; LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021; 2021a), e apenas um relata sobre microRNAs em cultura de células intersticiais valvares (VIC) de válvulas mitral doentes (YANG *et al.*, 2018).

As abordagens destas pesquisas são diversas e voltadas para análise do perfil de expressão destas biomoléculas (LI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018), avaliação da expressão de microRNAs previamente selecionados de estudos com humanos ou camundongos e ratos (HULANICKA *et al.*, 2014), avaliação da expressão de microRNAs previamente selecionados de estudos com DVCM em cães (BAGARDI *et al.*, 2022), identificação dos microRNAs diferencialmente expressos (HULANICKA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018), previsão de possíveis genes-alvo (JUNG; BOHAN, 2018; LI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2017), e comparações com dados clínicos (RO *et al.*, 2021a) e ecocardiográficos (GHILARDI *et al.*, 2022; RO *et al.*, 2021a). Um resumo destes estudos e da expressão dos microRNAs se encontra disponível no quadro 2.

Quadro 2 – Resumo dos principais microRNAs expressos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.

(continua)

Referências	N amostral*	Abordagem da pesquisa	Tipo de amostra	Método de detecção	microRNAs diferencialmente expressos	Conclusões
Hulanicka <i>et al.</i> (2014)	23 (A=8; B=8; C=7)	Avaliação da expressão de microRNAs previamente selecionados de estudos com humanos ou camundongos e ratos	Plasma	RT-qPCR	miR-30b (↓) miR-133b (↓[C]; ↑[B])	- miR-30b pode ser um potencial biomarcador de insuficiência cardíaca ACVIM estágio B em Daschunds - miR-133b pode ser um potencial biomarcador de ACVIM estágio C
Li <i>et al.</i> (2015)	18 (A=6; B1+B2=6; C+D=6)	Perfil de expressão de microRNAs Previsão de possíveis genes-alvo	Soro	RT-qPCR	(↑): miR-103, miR-98, let-7b e let-7c (↓): miR-302d, miR-380, miR-874, miR-582, miR-490, miR-329b e miR-487b	- Aumento da expressão de microRNAs conforme a gravidade da doença - Possibilidade de uso dos microRNAs como biomarcadores e podem fornecer informações sobre vias regulatórias genéticas da doença
Jung e Bohan (2018)	17 (A=9; C=8)	Perfil de expressão de microRNAs	Plasma	NGS e RT-qPCR ¹	(↑): miR-133, miR-1, let-7e, miR-125a (↓) ² : miR-30c, miR-128, miR-142 e miR-423	- Sugeriram que o padrão de expressão dos microRNAs eram únicos - Possibilidade de uso dos microRNAs como biomarcadores

Quadro 2 – Resumo dos principais microRNAs expressos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.

(continuação)						
Ro <i>et al.</i> (2021)	15 (controle=5; DVMM ACVIM C+D=5; EP=5)	Identificação de microRNAs diferencialmente expressos	Soro	<i>Microarrays</i>	DMVM: (↑): miR-130b (↓): miR-375, miR-425, miR-30d, miR-30c, miR- 151, let-7b, miR-19b, let- 7g EP: (↑): miR-346 (↓): miR-30c, let-7b, miR-505	- Possibilidade de uso dos microRNAs como biomarcadores para hipertrofia cardíaca excêntrica (DVMM) e concêntrica (EP)
Ro <i>et al.</i> (2021a)	82 (controle= 10; DMVM=35; PDA=21; EP=7) DVMM (B1+B2=8; C=22; D=5)	Avaliação da expressão de microRNAs previamente selecionados de estudos com DVMM em cães (RO <i>et al.</i> , 2021) Comparações com dados clínicos e ecocardiográficos	Soro	RT-qPCR	DMVM, PDA e EP: (↑): miR-130b, let-7b, miR-30c, miR-30d, miR- 19b, miR-425, let-7g, miR-151, e miR-505 DVMM: (↑): miR-130b (B1+B2) DMVM e PDA (hipertrofia excêntrica) (↑): miR-375; miR 346 EP (hipertrofia excêntrica) (↓): miR-375; miR 346	- Possibilidade de uso dos microRNAs como biomarcadores e alvos terapêuticos para diversas doenças - O miR-130b foi considerado um promissor biomarcador precoce para a DVMM em cães estágio B

Quadro 2 – Resumo dos principais microRNAs expressos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.

						(continuação)
Bagardi <i>et al.</i> (2022)	44 (A=11; B1=33)	Avaliação da expressão de microRNAs previamente selecionados de estudos com DVCM em cães (HULANICKA <i>et al.</i> , 2024)	Plasma	RT-qPCR	(↑): miR-30b	- A expressão do miR-30b foi significativamente maior em CKCS estágio B1 da DVMM em comparação a CKCS estágio A - A expressão do miR-30b foi significativamente maior em CKCS estágio B1 da DVMM em diferentes faixas etárias, em comparação a CKCS estágio A
		Comparação com dados clínicos				
Ghilardi <i>et al.</i> (2022)	35 (A=7; B1=19; B2=6; C=3)	Avaliação da expressão de microRNAs previamente selecionados de estudos com DVCM em cães (HULANICKA <i>et al.</i> , 2024; BAGARDI <i>et al.</i> , 2022)	Plasma	RT-qPCR	miR-30b	- Aumento nos níveis de miR-30b foram associados a formas mais leves da DVMM - É esperado que CKCS que apresentem níveis elevados de miR-30b na primeira avaliação cardiológica, apresentem menor variação em ecocardiograma realizados em diferentes tempos (T0 e T1)
		Comparações com dados ecocardiográficos				

Quadro 2 – Resumo dos principais microRNAs expressos na Doença Valvar Mixomatosa Mitral em cães.

						(conclusão)
Yang <i>et al.</i> (2017)	ex-miRNAs=27 (controle idosos=6; controle jovens=7; com DVMM assintomático=7; com DVMM sintomático=7 microRNAs=26 (controle=8; com DVMM assintomático=8; com DVMM sintomático=11)	Perfil de expressão de ex-miRNAs e microRNAs	Plasma	RT-qPCR	Avançar da idade: (↑): ex-miR-181c e ex- miR-599 (↓): ex-miR-9 e ex-miR- 495 Assintomáticos: (↑): ex-miR-9 (↓): ex-miR-599 Sintomáticos: (↑): ex-miR-181c e ex- miR-495	- Alterações na expressão de ex-miRNAs foram observadas em cães com o avançar da idade, quando desenvolvem DVMM assintomática e quando evoluem para ICC - MicroRNAs circulantes não apresentaram diferença significativa em taxa de falsa descoberta <15% - Alterações na expressão de ex-miRNAs parecem ser mais representativos do estado da doença do que os microRNAs circulantes livres
Yang <i>et al.</i> (2018)	-	Perfil de expressão de microRNAs	Células intersticiais valvulares de válvulas mitrais de cães sem e com a DVMM	RT-qPCR e NGS	(↓): let-7c, miR-17, miR- 20a, miR-30d	- A redução dos microRNAs let-7c, miR-17 e miR-20a podem favorecer a diferenciação miofibroblástica e a senescência celular e a redução do miR-30d pode promover apoptose celular

Abreviaturas: CKCS: Cavalier King Charles Spaniel; DVMM: Doença valvar mixomatosa mitral; EP: Estenose pulmonar; ex-miRNAs: microRNAs exossomais; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; NGS: Sequenciamento de próxima geração; RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

*N amostral total (N amostral dividido por grupos)

¹a RT-qPCR foi utilizada para validação e confirmação da expressão pela NGS

²houve uma expressão reduzida de 88 microRNAs, sendo estes quatro selecionados pelos autores a partir de resultados de análise de ontologia gênica e análise de bioinformática, associados a informações adquiridas de estudos prévios.

Dentre os microRNAs identificados nestes estudos, o miR-30b e o miR-130b apresentaram resultados de expressão que os potencializam como possíveis biomarcadores para a DVMM (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; RO *et al.*, 2021a).

Hulanicka *et al.* (2014) analisaram a expressão de nove miRNAs descritos como envolvidos em enfermidades cardiovasculares humanas, no plasma de Daschunds com DVMM. Como resultado, eles observaram uma expressão significativamente reduzida do miR-30b entre cães do estágio B (incluindo estágios ACVIM B1 e B2 em um único grupo) em comparação com o grupo controle (estágio A), e do miR-133b em cães do estágio C vs. o grupo controle. Seus achados mostraram que a expressão de microRNAs pode variar entre os estágios da doença e que estas moléculas poderiam servir como potenciais marcadores para a DVMM para os referidos estágios (HULANICKA *et al.*, 2014).

Bagardi *et al.* (2022) apresentaram resultados promissores com relação ao miR-30b como potencial biomarcador precoce para DVMM. Ao estudar a expressão de três microRNAs (miR-1, miR-30b e o miR-128) no plasma de Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) com DVCM estágio B1, eles observaram aumento significativo na expressão do miR-30b em comparação aos cães ACVIM estágio A, em diferentes faixas etárias, com uma precisão diagnóstica de discriminar entre indivíduos estágio B1 e saudáveis (BAGARDI *et al.*, 2022). Análises em animais estágio B2 não foram realizadas por estes autores.

Ghilardi *et al.* (2022) deram continuidade as pesquisas, comparando a expressão do miR-30b em diferentes estágios da DVMM em CKCS com parâmetros ecocardiográficos. Como resultado, eles observaram que o aumento na expressão do miR-30b correspondeu a um menor valor de diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo normalizado para peso corporal, volumes diastólico final e sistólico final indexados para peso corporal e relação átrio esquerdo/raiz aórtica. Desta forma, o aumento na expressão deste microRNA foi correlacionado a formas leves e estáveis da DVMM (GHILARDI *et al.*, 2022). Comparações clínicas não foram realizadas neste estudo, incluindo os diferentes estágios.

Em 2021, dois trabalhos do mesmo grupo de pesquisadores foram publicados, com vistas a apresentar um perfil de expressão de microRNAs circulantes em soro de cães com hipertrofia concêntrica e excêntrica e, um segundo, para identificar microRNAs circulantes diferencialmente expressos e caracterizá-los como potenciais biomarcadores para várias doenças cardíacas caninas (RO *et al.*, 2021; 2021a). No primeiro trabalho, animais com DVMM foram selecionados para compor o grupo de hipertrofia excêntrica, e os autores observaram o aumento na expressão do miR-130b e a redução na expressão dos microRNAs miR-375, miR-425, miR-30d, miR-30c, miR151, let-7b, miR-19b e let-7g, em cães estágio C/D da doença (RO

et al., 2021b). No estudo seguinte, estes 11 microRNAs foram analisados em várias doenças cardíacas, incluindo a DVMM, sendo encontrado nesta última um aumento da expressão do miR-30b no estágio B da doença, porém, sem diferença significativa na expressão deste microRNA nos estágios C e D (apesar de também serem regulados positivamente) (RO *et al.*, 2021a).

Ainda neste segundo estudo, foram feitas comparações entre o miR-130b e aspectos clínicos, ecocardiográficos e dos níveis de NT-proBNP, e uma análise ROC para avaliar a sua utilização como biomarcador para esta e outras doenças cardíacas. Uma correlação negativa leve do miR-130b com a idade foi identificada, e uma forte correlação positiva foi detectada ($r > 0,7$) com a frequência cardíaca, NT-proBNP e relação AE/Ao. Na análise ROC, tanto o miR-130b quanto o NT-pro-BNP foram incluídos, e, para as enfermidades DVMM, persistência do ducto arterioso (PDA) e estenose pulmonar (EP), o microRNA apresentou ótima área sob a curva ($AUC > 0,7$), sendo mais preciso do que o NT-pro-BNP para diferenciar cães saudáveis de cães com DVMM estágio B, PDA e EP. Diante destes achados, o miR-130b foi relatado como potencial biomarcador diagnóstico precoce para o estágio B da DVMM, sendo necessários mais estudos, feitos de forma controlada, para entender os achados de tal estudo, compreender o papel deste microRNA sobre a DVMM, e entender como esta biomolécula se comporta em pacientes estágio B1 e B2 separadamente (RO *et al.*, 2021a).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo do estudo e solicitação de Consentimento Livre e Esclarecido

Este foi um estudo experimental, prospectivo e exploratório, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (CEUA-UESC), com número de protocolo: nº33/2022.

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi entregue aos tutores durante a seleção dos animais, contendo informações sobre a natureza do estudo e solicitando a autorização para participação, coleta de material biológico e acesso a exames complementares disponíveis (APÊNDICE A).

5.2 Seleção dos animais e coleta de material

Para o experimento, foram utilizados 35 cães, entre animais saudáveis e diagnosticados com a Doença Valvular Crônica de Mitral (DVCN), atendidos no Hospital Veterinário da UESC (HOSPVET-UESC) e em clínicas veterinárias das cidades de Ilhéus e Itabuna, no período de agosto à dezembro de 2023. Estes animais foram selecionados a partir de uma revisão prévia de prontuários de cães atendidos nos locais referidos com suspeita ou diagnóstico da doença. Uma abordagem feita diretamente aos discentes da UESC também foi realizada, contemplando mais dez animais selecionados para o estudo.

Os animais passaram por exame clínico cardiológico e foram submetidos a realização dos seguintes exames complementares: ecocardiograma, radiografia torácica e eletrocardiograma. Para os cães que já possuíam estes exames disponíveis realizados em um prazo de até seis meses, foi solicitado ao tutor a autorização para acesso. O prazo estabelecido foi determinado de acordo com instruções do grupo CEG (*Cardiac education group*), formado por uma equipe de cardiologistas veterinários certificados que oferecem recomendações para avaliação e tratamento de diversas doenças cardíacas em cães e gatos (CEG, 2016). Além disso, a história natural da doença também foi considerada, sobretudo com relação ao amplo período de permanência dos cães (em anos) na fase assintomática (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012), o que justifica uma maior confiabilidade no uso de exames dentro do prazo estabelecido. Os dados clínicos (idade, sexo, raça, peso, frequência cardíaca e grau do sopro) foram coletados.

Tanto o histórico prévio de suspeita e/ou diagnóstico para a doença, como a presença de exames diagnósticos que confirmassem a doença foram utilizados para inclusão dos animais no estudo, estando estes em tratamento ou não. Todavia, os animais que apresentaram outros distúrbios cardiovasculares (congenitos ou adquiridos) que não a DVCN, ou que tiveram

suspeita e/ou diagnóstico de doenças sistêmicas que cursem com alteração estrutural e/ou funcional do coração (ex.: hiperadrenocorticismo, hipotireoidismo ou neoplasias) foram excluídos do estudo.

Os cães foram divididos em quatro grupos, de acordo com a classificação ACVIM para a DVCM (KEENE *et al.*, 2019), distribuídos da seguinte forma: grupo A – cães de pequeno porte saudáveis - grupo controle (n = 9); grupo B1 - animais com DVCM assintomáticos, com presença de sopro/alteração valvular, sem remodelamento ou com remodelamento cardíaco leve (n = 11); grupo B2 - animais com DVCM assintomáticos, com presença de sopro/alteração valvular e com remodelamento cardíaco que atenda aos critérios do estudo EPIC (n = 5); grupo C - animais com DVCM sintomáticos, com presença de sopro/alteração valvular e com remodelamento moderado a grave (n = 10).

Amostras de sangue foram então coletadas por punção venosa jugular ou cefálica, sendo colhidos até 5mL do material biológico, o qual foi dividido em duas frações: uma contendo 4mL e a segunda com 1mL, sendo ambas adicionadas a tubos com anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA).

Os tubos contendo 4mL de sangue foram imediatamente acondicionados em gelo e as amostras foram centrifugadas a 1.400rpm por 10 minutos à 4°C, para a separação do plasma. Após este processo, o plasma foi isolado e acondicionado em microtubos de 1,5mL estéreis, e armazenado em ultrafreezer à -80°C até o isolamento do RNA. Já os tubos contendo 1mL de sangue foram utilizados para realização de hemograma, como parte da avaliação geral do paciente.

5.3 Extração e quantificação do RNA

O isolamento do RNA foi iniciado utilizando o método do TRIZOL, no qual um volume de 300µL de plasma de cada amostra foi adicionado a um microtubo estéril previamente preparado com 600µL TRIzol™ Reagent (*Life technologies, USA – Molecular Research Center Inc.*), respeitando uma proporção de 1:3, de acordo a recomendação do fabricante. As amostras e o reagente em questão foram bem homogeneizados para evitar a presença de grumos.

Em seguida, foi adicionado em cada tubo um volume de 200µL de clorofórmio, com o objetivo de solubilizar as moléculas lipídicas e proteicas presentes na solução. O material foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação a 14.000rpm, por 20 minutos, à 4°C para separação da solução em três fases: fase rosa (inferior), rica em fenol proveniente do reagente; fase orgânica (intermediária), contendo restos de proteínas e material orgânico; e fase aquosa (sobrenadante),

onde os RNAs são encontrados. Cerca de 600µL da fase aquosa foram transferidos para um novo microtubo estéril. Um volume de aproximadamente 1000µL de isopropanol foi adicionado em cada tubo e as amostras foram armazenadas a -80°C até o dia seguinte (*overnight*), para promover o processo de purificação e precipitação do RNA.

No segundo dia do protocolo, as amostras foram descongeladas em gelo e centrifugadas a 14.000rpm, por 20 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado vertendo-se o tubo de uma vez, mantendo um *pellet* ou precipitado no fundo do tubo (onde se encontra o RNA). Um volume de 1000µL de álcool 70% foi então adicionado em cada tubo com vistas a remover restos de resíduos de sais presentes, seguido pela centrifugação a 14.000rpm, por 20 minutos, à 4°C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em *workstation* por até 15-20 minutos até a secagem do *pellet*. Por fim, os *pellets* foram diluídos em um volume de 20µL de água livre de RNase e armazenados a -80°C até quantificação do RNA extraído.

A quantificação do RNA de cada amostra foi realizada utilizando o equipamento NanoDroop 2000/2000° (*Thermo Scientific*), em comprimento de onda de 260/280nm. Amostras com quantificação >100ng/µL de RNA foram selecionadas para a síntese de cDNA.

5.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foram utilizados o kit de transcrição reversa Taqman™ MicroRNA Reverse Transcription Kit em associação aos *primers* específicos para a transcrição de cada microRNA a ser analisado (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Inicialmente, uma diluição prévia do RNA quantificado foi realizada utilizando água livre de RNase, para atingir um volume de eluído final de 5µL, com 100ng/µL de RNA (500ng de RNA total).

Em seguida, foram adicionados, para cada 500ng de RNA total: 1µL de *primers* específicos para a transcrição de cada microRNA avaliado, 1,5µL de tampão de transcrição, 0,15µL de dNTP (10mM), 1µL de Enzima Multiscribe, 0,2µL de inibidor de RNase e água livre de nuclease até completar um volume final de 15µL (recomendação do fabricante). Os parâmetros de ciclo térmico utilizados para a transcrição reversa foram: 30min a 16°C, 30min a 42°C e 5min a 85°C.

Ao final deste processo, as amostras foram diluídas em água livre de RNase até completarem um volume final de 60µL e, em seguida, foram armazenadas a -20° até posterior análise das expressões gênicas.

5.5 Determinação de um normalizador endógeno

A seleção de um microRNA de referência interna (normalizador) foi realizada com o objetivo de identificar um microRNA endógeno que fosse o mais estável para ser utilizado na quantificação da expressão dos microRNAs estudados. Para isso, cada um dos três microRNAs escolhidos para o estudo (BAGARDI *et al.*, 2022b; GHILARDI *et al.*, 2022a; HULANICKA *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018; RO *et al.*, 2021) foi utilizado como possível candidato a normalizador, a saber: cfa-miR-30b, cfa-miR-128 e cfa-miR-130b.

O valor de limiar de ciclagem (Ct) de cada microRNA candidato foi obtido utilizando o método Δ CT, adquirido a partir da análise de RT-qPCR (descrita na sessão seguinte). Em seguida, os dados foram plotados na plataforma *RefFinder* (<http://leonxie.esy.es/RefFinder/>), que se utiliza de quatro diferentes ferramentas de algoritmos (*Delta CT*, *Bestkeeper*, *Genorm* e o *NormFinder*) e de uma análise global oriunda dos dados provenientes destas ferramentas (soma da média dos valores obtidos), para indicar qual seria o microRNA de expressão mais estável.

A seleção do controle endógeno se deu pela identificação daquele que apresentou o menor valor de estabilidade determinado pela análise do *RefFinder*. Para isso, quanto menor o valor, mais estável é o microRNA e isso indica uma semelhança de sua expressão em todos os grupos de amostras avaliados no estudo, sendo o melhor para ser utilizado como normalizador.

Com base nos achados, o cfa-miR-128 apresentou-se como o mais estável e foi escolhido como normalizador para os resultados obtidos no estudo.

5.6 Análise RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

Três microRNAs selecionados a partir de estudos anteriores, considerados como envolvidos na DVCM (BAGARDI *et al.*, 2022b; GHILARDI *et al.*, 2022a; HULANICKA *et al.*, 2014; JUNG; BOHAN, 2018; RO *et al.*, 2021) foram utilizados para a análise por RT-qPCR, com o intuito de detectar possíveis variações na expressão dessas moléculas nas amostras coletadas. Os microRNAs estudados foram: cfa-miR-30b-5p (ID do ensaio: 000602; sequência do microRNA maduro: UGUAAACAUCCUACACUCAGCU); cfa-miR-128-3p (ID do ensaio: 002216; sequência do microRNA maduro: UCACAGUGAACCGGUCUCUUU); e o cfa-miR-130b-3p (ID do ensaio: 000456; sequência do microRNA maduro: CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU).

A técnica foi realizada utilizando o kit TaqMan™ microRNA assay (*Applied Biosystems*), as sondas específicas para RT-qPCR de cada microRNA avaliado (*Applied Biosystems*) e o termociclador *QuantStudio3 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

Todas as reações foram feitas em placas de 96 poços. Os testes foram feitos em duplicata.

As misturas de amplificação foram preparadas e adicionadas nas placas, contendo: 20ng de cDNA molde (9,5µL), 10µL de Taqman *mastermix* (*Applied Biosystems*), e 0,5µL das sondas dos microRNAs, completando um volume final de 20µL. Um controle negativo também foi inserido (sem cDNA), para verificação da efetividade do processo de reação da PCR. Na sequência, as placas foram seladas e adicionadas ao termociclador, com as seguintes condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por um minuto.

Um valor de Ct foi atribuído para cada microRNA analisado, com base no valor de Ct do microRNA de referência interna. Estes cálculos foram feitos pelo *QuantStudio™ Design & Analysis Software* (*Applied Biosystems*) utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Seus valores foram utilizados para análise estatística.

5.7 Análise estatística

Os dados clínicos (idade, peso e frequência cardíaca) e de expressão dos microRNAs ($2^{-\Delta Ct}$) foram submetidos a teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal foram calculadas a média e desvio padrão. Uma análise de proporção foi realizada sobre os dados da variável sexo. A *one way* ANOVA e o *post test* de Tukey foram realizados para comparação entre grupos. Já os dados sem distribuição normal foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis em conjunto com o teste Student–Newman–Keuls para comparação entre grupos. Os dados foram analisados usando os *softwares* Prism 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e o BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá, Tefé, AM, Brasil). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

O valor de limiar de ciclo normalizado (ΔCt) de cada miRNA será utilizado para calcular a mudança de dobra entre os grupos, usando o método $2^{-\Delta Ct}$.

6 RESULTADOS

6.1 Características clínicas gerais dos animais

Devido uma baixa expressão do RNA em 10 amostras de plasma dos cães selecionados, houve um reajuste do tamanho amostral para 25 animais, os quais foram distribuídos pelos grupos da seguinte forma: A (n=4), B1 (n=9), B2 (n=4) e C (n=8).

As características clínicas dos animais recrutados estão dispostas na tabela 1. A idade dos animais variou de 7 à 14 anos, com idade média de 11 anos. A maior parte dos cães eram machos (55,56%) em comparação as fêmeas (44,44%). O peso corporal apresentou um valor médio de 6,41kg, variando entre 1,5 à 14,1kg. Já a frequência cardíaca (FC) dos animais apresentou média de aproximadamente 120bpm, com uma tendência a um aumento nos animais do grupo C. Não houve diferença significativa entre os grupos para a idade, peso e FC.

Com relação as raças dos animais, a maior parte dos cães atendidos foram Poodles (n=5) e SRD (n=5), seguidos por Pinschers (n=1), Chihuahuas (n=2), Daschunds (n=2), Lhasa Apso (n=2), Maltês (n=2), Fox Paulistinha (n=1), Snauzer (n=1), Spitz Alemão (n=1) e Yorkshire Terrier (n=1). A disposição do grau de sopro por grupo pode ser melhor observada na Tabela 1, mostrando um aumento da intensidade com o avançar da doença.

Tabela 1 - Aspectos clínicos dos cães incluídos no estudo de acordo com os grupos

Variáveis	Grupo A (média±DP) n=4	Grupo B1 (média±DP) n=9	Grupo B2 (média±DP) n=4	Grupo C (média±DP) n=8	Total (média±DP) n=25
N amostral					
Idade (anos)	10±2,83	10,78±2,11	9,75±1,89	12,37±2,13	11±2,31
Sexo					
F [n (%)]*	3 (75)	4 (44,44)	0 (0)	2 (25)	9 (36)
M [n (%)]*	1 (25)	5 (55,56)	4 (100)	6 (75)	16 (64)
Peso (kg)	5,87±4,82	7,67±3,12	6,85±1,14	5,06±2,05	6,41±2,97
FC (bpm)	115,5±12,69	118,78±17,25	111,75±3,30	129,12±19,35	120,44±16,51
Grau do sopro					
Sem sopro	4	3	-	1	8
I/VI					
II/VI	-	3	3	-	6
III/VI	-	-	4	2	6
IV/VI	-	-	-	4	4
V/VI	-	-	-	1	1

Abreviaturas: FC: frequência cardíaca; DP: Desvio padrão.

*Valores dispostos em percentual.

6.2 Identificação do normalizador endógeno

A análise para a escolha do microRNA normalizador foi realizada a partir da avaliação do limiar de ciclagem (CT) e uso da ferramenta *online RefFinder*. A seleção do microRNA de

referência foi feita a partir dos três microRNAs eleitos para o seguinte estudo, cuja a molécula mais estável foi escolhida para normalização e quantificação dos dois microRNAs restantes (utilizados para análise da expressão gênica).

De acordo com a análise do *RefFinder*, foi observada uma unanimidade das quatro ferramentas de algoritmos que o apoiam (*Delta CT*, *Bestkeeper*, *Genorm* e o *NormFinder*), em apontar o miR-128 como a molécula mais estável (Figura 2a-d). A análise global gerada (Figura 2e) veio para corroborar com estes achados, dando uma maior confiabilidade ao resultado obtido.

Na Tabela 2 observamos com maior detalhamento os valores de estabilidade adquiridos pelos algoritmos e análise global. Notou-se que os valores determinados pela *Genorm* foram semelhantes entre o miR-30b e o miR-128, com ambos apresentando um valor inferior ao miR130b. Para as demais análises, o miR-128 apresentou o menor valor, o que confirma a sua seleção como normalizador.

Tabela 2 - Valor de estabilidade dos microRNAs miR-30b, miR-128 e miR-130b

Ferramentas de algoritmo	miR-30b	miR-128	miR-130b
BestKeeper	3,906	2,411	3,952
Delta CT	8,659	8,331	11,442
Genorm	5,548	5,548	9,477
NormFinder	4,786	2,806	10,753
Análise global	1,682	1	3

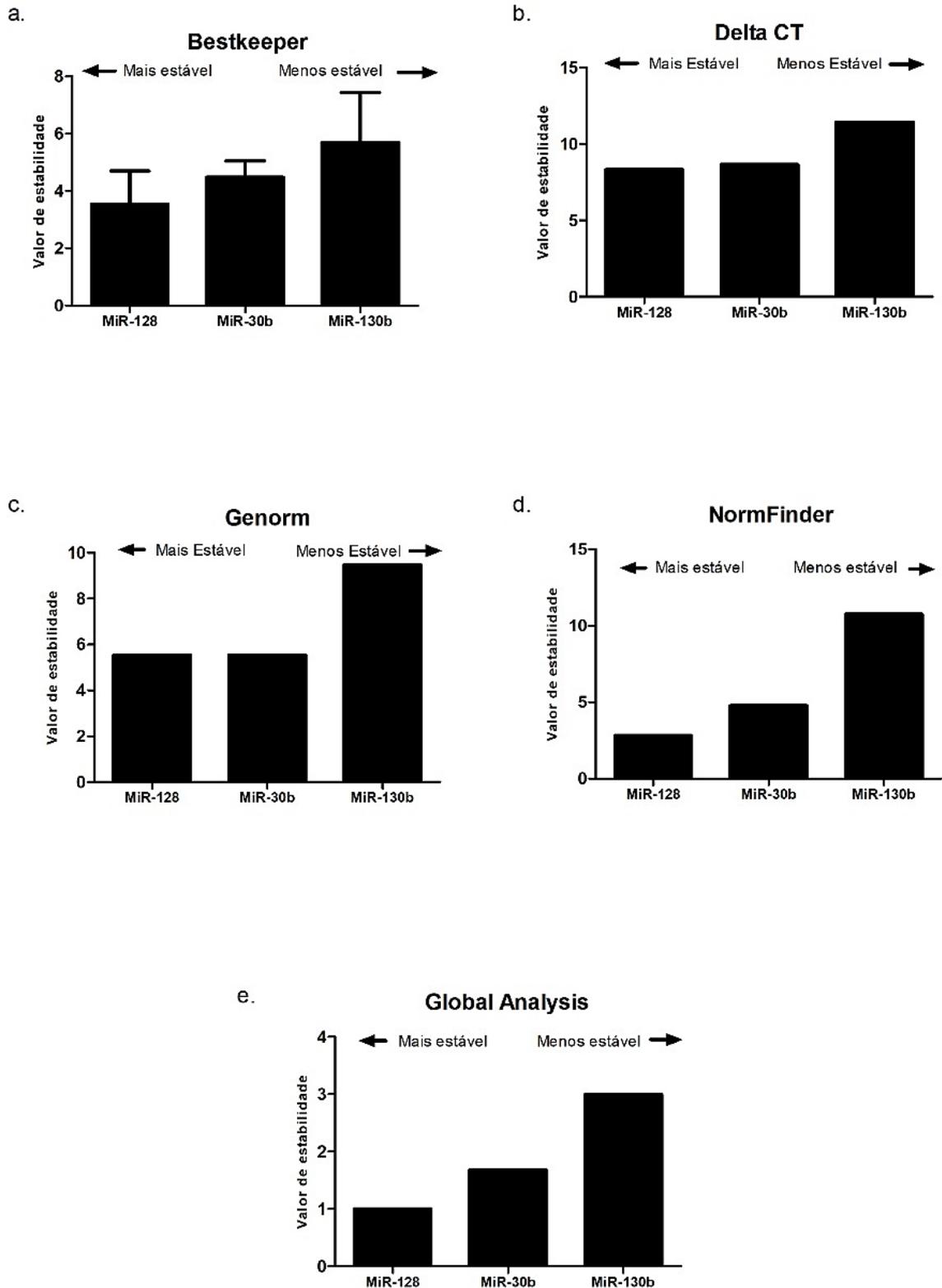


Figura 2 - Níveis de estabilidade do miR-30b, miR-128 e miR-130b avaliados em amostras do grupo A (n=4) e dos grupos B1 (n=9), B2 (n=4) e C (n=8) a partir de quatro ferramentas de algoritmo: a) *BestKeeper*; b) Delta CT (limiar de ciclagem); c) *Genorm*; d) *NormFinder*. No gráfico e) observa-se a análise global feita pela plataforma *RefFinder*, baseada na junção das informações decorrentes dos quatro algoritmos utilizados. Fonte: elaboração própria

6.3 Expressão do miR-30b em cães com DVMM

De acordo com os resultados obtidos na RT-qPCR e análise estatística aplicada, houve uma redução significativa da expressão do microRNA no grupo C em comparação ao grupo A e ao grupo B2. Para os demais, não houve diferença significativa (Figura 3).

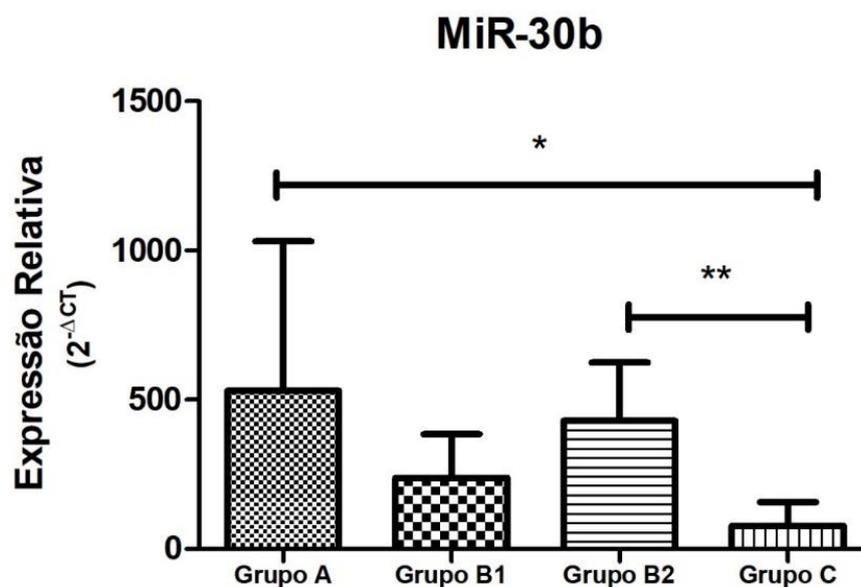


Figura 3 - Expressão relativa do miR-30b em amostras de plasma de cães sem e com DVCM. Fonte: elaboração própria.

*diferença significativa (<0,05) entre os grupos A e C.

**diferença significativa (<0,05) entre os grupos B2 e C.

6.4 Expressão do miR-130b em cães com DVMM

Ao avaliar o miR-130b, foi verificada maior expressão pelo grupo A (controle), com redução gradativa da expressão dos grupos com DVCM (B1, B2 e C), entretanto sem que houvesse diferença significativa entre estes (Figura 4).

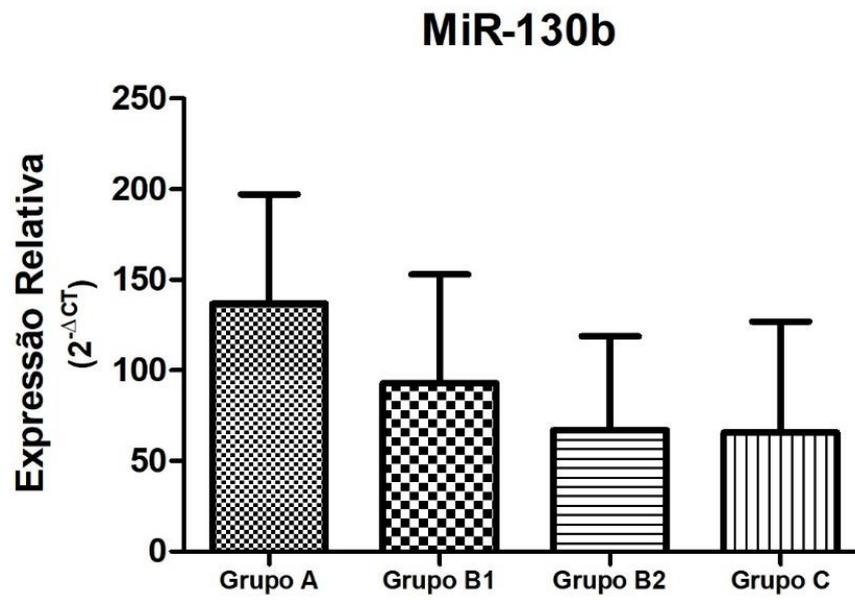


Figura 4 - Expressão relativa do miR-130b em amostras de plasma de cães sem e com DVC. Fonte: elaboração própria.

7 DISCUSSÃO

Os dados clínicos aqui apresentados (idade, sexo, peso, raça, frequência cardíaca e grau/intensidade do sopro), corroboram com os achados encontrados na literatura.

Para este estudo, a idade e o peso dos cães recrutados foram controlados. Com relação a idade, a determinação da faixa etária foi feita com base na idade em que estes animais são mais comumente afetados clinicamente pela doença, de acordo com os dados epidemiológicos de incidência e prevalência disponíveis (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012), assim como pelos achados de Hulanicka *et al.* (2014) e Bagardi *et al.* (2022) que demonstram que o fator idade parece não influenciar na expressão de microRNAs na DVMM. Para o peso, os animais recrutados tinham pesos variados, porém, dentro da faixa inferior a 20kg, sendo um limite de peso que caracteriza os cães de pequeno porte, os quais apresentam maior prevalência para o desenvolvimento da DVMM (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; KEENE *et al.*, 2019; MATTIN *et al.*, 2015; OYAMA *et al.*, 2020).

Para o sexo, a maior parte dos animais afetados pela DVMM foram machos, em que foram observados uma maior chance de desenvolvimento em comparação a fêmeas (cerca de 1,5 vezes mais) (KEENE *et al.*, 2019), a qual pode ser manifestada com maior proporção em cães mais jovens (BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; MATTIN *et al.*, 2015).

No que se refere as raças dos animais, todas as raças aqui relatadas são predispostas para o desenvolvimento da doença (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; MATTIN *et al.*, 2015). Cães sem raça definida também podem ser acometidos, uma vez que a doença afeta animais de pequeno porte (BORGARELLI; BUCHANAN, 2012; BORGARELLI; HAGGSTROM, 2010; GORDON; SAUNDERS; WESSELOWSKI, 2017; KEENE *et al.*, 2019; MATTIN *et al.*, 2015; OYAMA *et al.*, 2020).

Com relação a frequência cardíaca, apesar de não ter sido observada uma diferença significativa por grupo, foi identificado um aumento da FC em cães sintomáticos. Este aumento é um achado clínico esperado na DVMM (WARE; BONAGURA, 2022) por conta da ativação de mecanismos compensatórios e do aumento do trabalho cardíaco, na tentativa de manter o débito cardíaco e a pressão arterial (BUSSADORI; ORICCO, 2023).

Sobre o grau e intensidade do sopro, a tabela mostra um aumento da gravidade do sopro com o avançar da DVMM, o que também é esperado. O aumento da intensidade do sopro tem uma forte relação com a progressão e gravidade da doença, sendo importante para avaliar a sobrevida dos animais (LJUNGVALL; HÄGGSTRÖM, 2023; WARE; BONAGURA, 2022).

Até o presente momento, o miR-128 não havia sido utilizado como normalizador de dados de expressão para a DVMM em cães. O intuito inicial era avaliar a sua expressão gênica junto aos demais microRNAs selecionados. Entretanto, mediante intercorrências da experimentação (devido a falhas na análise de outros normalizadores pré-selecionados), uma nova análise foi realizada entre os três microRNAs eleitos para a análise de expressão na doença, e este microRNA foi remanejado para ser o normalizador da pesquisa, o qual mostrou ser o mais estável para desempenhar a função de normalização de dados, quando comparado ao miR-30b e ao miR-130b.

Para o devido entendimento e interpretação da expressão gênica de microRNAs e de mRNAs pela RT-qPCR, é de suma importância que os dados sejam normalizados de forma apropriada, utilizando-se de genes e/ou microRNAs endógenos que sejam expressos de forma estável e abundante em todas as amostras avaliadas, independentemente do tipo de tecido, das etapas pré-analíticas e do tempo de análise (DROBNA *et al.*, 2018; FOCHI *et al.*, 2021). Seu objetivo é reduzir ao máximo a variação que pode ocorrer entre os grupos, fora as discrepâncias apresentadas frente a doença e/ou tratamento analisados, uma vez que a técnica de RT-qPCR visa analisar as diferenças obtidas entre grupos controle e caso nas amostras examinadas (FOCHI *et al.*, 2021).

Apenas um trabalho buscou selecionar um gene como normalizador endógeno para análise de RT-qPCR em cães com várias doenças cardíacas, incluindo a DVMM (RO *et al.*, 2021a), apesar deste não ser o foco primordial do estudo. Neste trabalho, os autores fizeram um levantamento entre seis genes e um microRNA (SNORD61, SNORD68, SNORD95, SNORD72, SNORD96A, RNU6_2 e celmiRNA-39), e identificaram que o SNORD61 foi o mais estável dentre os selecionados, sendo escolhido como normalizar do estudo (RO *et al.*, 2021a). Além deste gene, os microRNAs celmiRNA-39 (JUNG; BOHAN, 2018) e o miR-16-5p (BAGARDI *et al.*, 2022a; GHILARDI *et al.*, 2022b; HULANICKA *et al.*, 2014) também foram utilizados como normalizadores em outros estudos de expressão de microRNAs em cães com DVCM. A normalização utilizando a média geométrica global (contendo todos os valores de CT das amostras do experimento), também foi uma opção utilizada por alguns autores (LI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2017, 2018).

Aqui, foi evidenciada uma estabilidade satisfatória do miR-128 como normalizador, com resultado unânime apresentado pelas quatro ferramentas de algoritmo utilizadas e corroborado pela análise global do *RefFinder*. A base utilizada pela plataforma *RefFinder* consiste na determinação do grau de estabilidade dos microRNAs candidatos, sendo que esta estabilidade é expressa de maneira inversamente proporcional ao valor obtido na análise. Desta

maneira, quanto menor o valor de estabilidade, mais estável é o microRNA, mostrando que existe uma semelhança de expressão em todos os grupos de amostras utilizados no estudo. Mesmo com esta estabilidade apresentada pelo miR-128, pesquisas adicionais para identificar um bom normalizador para a DVMM são aconselhadas, baseado em um método universal que seja direcionado para esta doença (DROBNA *et al.*, 2018), uma vez que a utilização heterogênea de normalizadores endógenos constitui um desafio no delineamento de perfis de microRNAs em fluidos corporais (REDIS *et al.*, 2012).

Com relação ao miR-30b, a escolha deste microRNA para investigação no presente estudo foi feita com base em três estudos realizados, em que os mesmos apresentaram resultados distintos (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; HULANICKA *et al.*, 2014), o que dificultou o entendimento de como a expressão do microRNA se comporta na doença e em seus estágios.

No caso do estudo de Hulanicka *et al.* (2014) foram observadas uma redução significativa na expressão do miR-30b em plasma de cães Daschunds no estágio B, e uma redução na expressão no grupo C que não apresentou relevância estatística. Já Bagardi *et al.* (2022) analisaram a sua expressão em plasma de CCKS observaram um aumento significativo da expressão em cães do estágio B1 da doença, em comparação ao grupo A (controle), sendo avaliado apenas este estágio da doença. No mesmo ano, Ghilardi *et al.* (2022) publicaram em seu trabalho uma tabela contendo valores de expressão do miR-30b nos diferentes estágios da DVMM, demonstrando um aumento na expressão do microRNA em cães com a doença quando comparados aos animais do grupo controle, porém, os autores não apresentaram uma análise da diferença estatística destes dados no estudo. No resultado aqui apresentado, foi evidenciada uma redução significativa da expressão do miR-30b no plasma de cães do grupo C, com relação ao grupo A e o grupo B2. Este resultado não condiz com os apresentados acima, embora uma tendência de redução da expressão em plasma de cães estágio C tenha sido identificada no trabalho de Hulanicka *et al.* (2014).

Algo interessante de ser pontuado diz respeito a uma redução na expressão deste microRNA em estudos relacionados a distúrbios cardiovasculares induzidos em ratos, principalmente direcionados a fatores e genes que geram remodelamento ventricular (SONG *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019). Sabe-se que a família miR-30 é expressa de forma abundante no coração e é conhecida por apresentar importantes funções sobre a apoptose, autofagia, inflamação e estresse oxidativo, podendo atuar sobre genes que estão envolvidos de forma direta ou indireta no desenvolvimento de diversas doenças cardíacas humanas (ZHANG *et al.*, 2019). Como cães no estágio C da doença apresentam um

grau de remodelamento ventricular importante (KEENE *et al.*, 2019), pode ser que haja uma associação entre a redução da expressão e o remodelamento ventricular em cães. Para verificação de tal suposição, testes de validação experimental para comprovação da interação entre genes relacionados ao remodelamento ventricular e o microRNA de interesse precisariam ser realizados.

Na avaliação da expressão do miR-130b, foi observada uma redução na sua expressão em pacientes com DVMM em comparação com o grupo A, apesar do resultado não ter apresentado significância estatística ($p > 0,05$). Ro *et al.* (2021) identificaram em seu estudo um aumento significativo da expressão do miR-130b no soro de cães estágio B em comparação ao grupo saudável, sem obter diferença significativa para os grupos C e D. Analisando a disposição gráfica do resultado apresentado pelos autores, pode-se observar que há uma redução gradual da expressão nos grupos C e D (RO *et al.*, 2021a). Um aspecto similar foi observado no seguinte trabalho, porém com uma tendência a redução em todos os grupos com DVMM, e não apenas nos sintomáticos, como identificado por Ro *et al.* (2021a).

Em um estudo prévio realizado pelos mesmos autores (RO *et al.*, 2021), a expressão do miR-130b foi aumentada de forma significativa em cães estágio C ou D com hipertrofia cardíaca excêntrica, quando comparado ao grupo controle. Estes resultados diferentes observados nestas pesquisas podem ser explicados diferentes fatores, como pela variação no tamanho amostral de cada estudo, diferenças raciais, e uso de diferentes técnicas de detecção do microRNA (*Microarrays* vs. RT-qPCR).

Algumas limitações relacionadas ao presente estudo foram citadas ao longo desta discussão. O pequeno tamanho amostral e a heterogeneidade no número de amostras por grupo entram como um dos principais fatores limitantes. Por se tratar de um estudo piloto, um tamanho de amostra pequeno é geralmente utilizado nas pesquisas de biomarcadores (KAMAL; SHARIDAN, 2020). A intensão para este estudo era de se obter dez amostras por grupo, garantindo uma uniformidade. No entanto, entraves foram encontrados na seleção dos animais (ex.: baixa adesão pelos tutores; adequação dos cães aos critérios de inclusão e exclusão), e na fonte e/ou processamento das amostras (ex.: baixa quantificação do RNA), acabaram reduzindo drasticamente o n amostral. Os autores da maioria dos trabalhos que avaliaram a expressão de microRNAs na DVMM, também relataram estes aspectos como limitantes (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; JUNG; BOHAN, 2018; LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021; 2021a; YANG *et al.*, 2018).

A variação na raça e no sexo (incluindo animais castrados e não castrados) não foi devidamente controlada neste estudo, o que pode ter interferido na expressão dos microRNAs.

Estes fatores também não foram controlados em alguns trabalhos (BAGARDI *et al.*, 2022; GHILARDI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021;2021a). A influência do uso de medicamentos também não foi controlada e avaliada no presente estudo, o que também não foi analisada por alguns autores (LI *et al.*, 2015; RO *et al.*, 2021;2021a), e não foi citado por outros autores (HULANICKA *et al.*, 2014). No estudo feito por Bagardi *et al.* (2021), os cães selecionados eram do estágio B1 e não faziam uso de medicamentos. Em outro estudo (JUNG; BOHAN, 2018) um dos critérios de exclusão foi o uso de medicamentos para tratamento de ICC (JUNG; BOHAN, 2018), porém, o miR-30b e o miR-130b não foram avaliados nesta pesquisa.

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no seguinte estudo, pode-se concluir que:

- O miR-128 pode ser utilizado como normalizador endógeno para análise de dados de expressão de microRNAs circulantes na DVMM;
- O miR-30b apresentou diferença significativa na sua expressão, revelando uma redução da expressão em pacientes sintomáticos (grupo C).
- O miR-130b demonstrou uma tendência a redução gradual da expressão em cães com DVMM.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de uso dos microRNAs como potenciais biomarcadores cardíacos em cães com DVMM tem ganhado repercussão nas pesquisas nos últimos anos. Mesmo com os avanços já observados, ainda se sabe pouco acerca dos microRNAs e de sua utilização clínica.

Um aspecto relevante nos estudos diz respeito a determinação de normalizadores para a DVMM. Neste trabalho, o miR-128 foi selecionado como a melhor opção, podendo ser utilizado como normalizador endógeno para análise de dados de expressão para a doença. Esta descoberta encoraja a realização de mais estudos futuros, com o objetivo de determinar, entre outros normalizadores e sob condições metodológicas universais, as melhores opções de normalizadores a serem utilizados, padronizando marcadores internos que podem ser utilizados em pesquisas de análise de expressão para esta doença.

Os microRNAs miR-30b e miR-130b aqui avaliados foram destacados como os mais promissores biomarcadores existentes para a doença na literatura atual. Neste estudo, foi possível identificar uma expressão diferencial do miR-30b em cães sintomáticos e uma redução gradual da expressão do miR-130b. A relevância biológica da expressão destes marcadores merece ser mais investigada, assim como alguns pontos de limitação do estudo precisam ser considerados ao analisar tais resultados.

A realização de estudos maiores, controlados, detalhados, com um bom desenho experimental e padronização da metodologia e de métodos estatísticos, são recomendados. Além disso, para se atingir a aplicação clínica dos microRNAs como biomarcadores ou alvo terapêutico, outros modelos de estudos avaliando a expressão a nível tecidual e circulante, a identificação de possíveis genes-alvo, bem como a validação experimental são particularmente propostos, a fim de ampliar os conhecimentos e preencher as "lacunas" ainda existentes sobre a dinâmica dos microRNAs na DVMM em cães.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, n. 1, p. 1–38, 2015. DOI: 10.7554/eLife.05005
- ATKINS, C.; BONAGURA, J.; ETTINGER, S.; FOX, P.; GORDON, S.; HAGGSTROM, J.; HAMLIN, R.; KEENE, B.; LUIS-FUENTES, V.; STEPIEN, R. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1142–1150, 2009. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x
- BAGARDI, M.; GHILARDI, S.; ZAMARIAN, V.; CECILIANI, F.; BRAMBILLA, P. G.; LECCHI, C. Circulating MiR-30b-5p is upregulated in Cavalier King Charles Spaniels affected by early myxomatous mitral valve disease. **PLoS ONE**, v. 17, n. 7 July, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0266208
- BAISAN, R. A.; DE ROSA, A.; DI LORIA, A.; VULPE, V.; PIANTEDOSI, D. Cardiac biomarkers in clinical practice of dog and cat - a review. **Human and Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 50–58, 2016.
- BEAUMIER, A.; ROBINSON, S. R.; ROBINSON, N.; LOPEZ, K. E.; MEOLA, D. M.; BARBER, L. G.; BULMER, B. J.; CALVALIDO, J.; RUSH, J. E.; YERI, A.; DAS, S.; YANG, V. K. Extracellular vesicular microRNAs as potential biomarker for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 3, p. 1260–1271, 2020. DOI: 10.1111/jvim.15762
- BLAKE, R. R.; MARKBY, G. R.; CULSHAW, G. J.; MARTINEZ-PEREIRA, Y.; LU, C. C.; CORCORAN, B. M. Survival of activated myofibroblasts in canine myxomatous mitral valve disease and the role of apoptosis. **Research in Veterinary Science**, v. 128, n. November 2019, p. 99–106, 2020. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.11.004
- BORGARELLI, M.; BUCHANAN, J. W. Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 14, n. 1, p. 93–101, 2012. DOI: 10.1016/j.jvc.2012.01.011
- BORGARELLI, M.; HAGGSTROM, J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: Natural history, clinical presentation and therapy. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 40, n. 4, p. 651–663, 2010. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.03.008
- BOSWOOD, A.; HÄGGSTRÖM, J.; GORDON, S. G.; WESS, G.; STEPIEN, R. L.; OYAMA, M. A.; KEENE, B. W.; BONAGURA, J.; MACDONALD, K. A.; PATTESON, M.; SMITH, S.; FOX, P. R.; SANDERSON, K.; WOOLLEY, R.; SZATMÁRI, V.; MENAUT, P.; CHURCH, W. M.; O’SULLIVAN, M. L.; JAUDON, J. P.; KRESKEN, J. G.; RUSH, J.; BARRETT, K. A.; ROSENTHAL, S. L.; SAUNDERS, A. B.; LJUNGVALL, I.; DEINERT, M.; BOMASSI, E.; ESTRADA, A. H.; FERNANDEZ DEL PALACIO, M. J.; MOISE, N. S.; ABBOTT, J. A.; FUJII, Y.; SPIER, A.; LUETHY, M. W.; SANTILLI, R. A.; UECHI, M.; TIDHOLM, A.; WATSON, P. Effect of Pimobendan in Dogs with Preclinical Myxomatous Mitral Valve Disease and Cardiomegaly: The EPIC Study—A Randomized Clinical Trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1765–1779, 2016. DOI: 10.1111/jvim.14586

BRAMAN, A.; WEBER, P. S.; TRITTEN, L.; GEARY, T.; LONG, M.; BEACHBOARD, S.; MACKENZIE, C. Further characterization of molecular markers in canine dirofilaria immitis infection. **Journal of Parasitology**, v. 104, n. 6, p. 716–731, 2018. DOI: 10.1645/18-12

BUCHANAN, J. W.; BÜCHELER, J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 2, p. 194–199, 1995.

BUSSADORI, C.; ORICCO, S. Cardiovascular physiology and pathophysiology. *In*: EDRA PUBLISHING US LLC. **Textbook of Cardiovascular Medicine in Dogs and Cats**. [s.l: s.n.]p. 134–259.

CARDIAC EDUCATION GROUP. **The EPIC Trial: Pimobendan in Preclinical Myxomatous Mitral Valve Disease**. 2016. Disponível em: <https://cardiaceducationgroup.org/wpcontent/uploads/2016/12/CEG_Recommendations_EPIC_121316.pdf>. Acesso em: jul. 2022.

CHANG, T.; MENDELL, J. T. microRNAs em vertebrados Fisiologia e Humana Doença. **Annu. Rev. Genômica Hum**, v. 8, n. 1, p. 215–239, 2007. DOI: 10.1146/annurev.genom.8.080706.092351

CHEN, Y.; WAKILI, R.; XIAO, J.; WU, C. T.; LUO, X.; CLAUSS, S.; DAWSON, K.; QI, X.; NAUD, P.; SHI, Y. F.; TARDIF, J. C.; KÄÄB, S.; DOBREV, D.; NATTEL, S. Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: Relationship to arrhythmogenic structural remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 77, p. 113–124, 2014. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.001

CHEN, Y.; WANG, X. MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 1, p. 127–131, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz757

COLPAERT, R. M. W.; CALORE, M. MicroRNAs in Cardiac Diseases. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 737, 2019. DOI: 10.3390/cells8070737

DROBNA, M.; SZARZYŃSKA-ZAWADZKA, B.; DACA-ROSZAK, P.; KOSMALSKA, M.; JAKSIK, R.; WITT, M.; DAWIDOWSKA, M. Identification of endogenous control mirnas for RT-qPCR in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018. DOI: 10.3390/ijms19102858

FEINBAUM, R.; AMBROS, V.; LEE, R. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 116, n. 116, p. 843–854, 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y

FOCHI, S.; ORLANDI, E.; CECCUZZI, L.; RODOLFO, M.; VERGANI, E.; TURCO, A.; ROMANELLI, M. G.; GOMEZ-LIRA, M. Identification of suitable mRNAs and microRNAs as reference genes for expression analyses in skin cells under sex hormone exposure. **Gene**, v. 769, n. May 2020, p. 145336, 2021. DOI: 10.1016/j.gene.2020.145336

FORERO, D. A.; GONZÁLEZ-GIRALDO, Y.; CASTRO-VEGA, L. J.; BARRETO, G. E. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. **BioTechniques**, v. 67, n. 4, p. 192–199, 2019. DOI: 10.2144/btn-2019-0065

- FOX, P. R. Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 14, n. 1, p. 103–126, 2012. DOI: 10.1016/j.jvc.2012.02.001
- GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 21–37, 2019. DOI: 10.1038/s41580-018-0045-7
- GHILARDI, S.; LECCHI, C.; BAGARDI, M.; ROMITO, G.; COLOMBO, F. M.; POLLI, M.; FRANCO, C.; BRAMBILLA, P. G. Prospective pilot study on the predictive significance of plasma miR-30b-5p through the study of echocardiographic modifications in Cavalier King Charles Spaniels affected by different stages of myxomatous mitral valve disease: The PRIME study. **PLoS ONE**, v. 17, n. 12 December, p. 1–14, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0274724
- GORDON, S. G.; SAUNDERS, A. B.; WESSELOWSKI, S. R. Asymptomatic Canine Degenerative Valve Disease: Current and Future Therapies. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 47, n. 5, p. 955–975, 2017. DOI: 10.1016/j.cvsm.2017.04.003
- GURHA, P. MicroRNAs in cardiovascular disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 31, n. 3, p. 249–254, 2016. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000280
- HORI, Y.; IGUCHI, M.; HIRAKAWA, A.; KAMIYA, Z.; YAMANO, S.; IBARAGI, T.; ISAYAMA, N.; YAMASHITA, Y.; IWASA, N.; INABA, H.; HEISHIMA, Y.; YUKI, M. Evaluation of atrial natriuretic peptide and cardiac troponin I concentrations for assessment of disease severity in dogs with naturally occurring mitral valve disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 256, n. 3, p. 340–348, 2020. DOI: 10.2460/javma.256.3.340
- HUANG, W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Em: JINGSHAN HUANG ET AL. Bioinformatics in MicroRNA Research, Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]p. 57–67. DOI: 10.1007/978-1-4939-7046-9
- HULANICKA, M.; GARNCARZ, M.; PARZENIECKA-JAWORSKA, M.; JANK, M. Plasma miRNAs as potential biomarkers of chronic degenerative valvular disease in Dachshunds. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1186/s12917-014-0205-8
- JOSHUA, J.; CASWELL, J. L.; MONNÉ RODRIGUEZ, J. M.; KIPAR, A.; O’SULLIVAN, M. L.; WOOD, G.; FONFARA, S. MicroRNA profiling of the feline left heart identifies chamber-specific expression signatures in health and in advanced hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology Plus**, v. 4, n. May, p. 1–16, 2023. DOI: 10.1146/annurev.genom.8.080706.092351
- JUNG, S. W.; BOHAN, A. Genome-wide sequencing and quantification of circulating microRNAs for dogs with congestive heart failure secondary to myxomatous mitral valve degeneration. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 2, p. 163–169, 2018. DOI: 10.2460/ajvr.79.2.163

- JUNG, S. W.; DILLON, R. MicroRNA signaling networks in a canine model of mitral regurgitation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 1141, 2012. DOI: 10.2460/ajvr.79.2.163
- KAMAL, N. N. S. B. N. M.; SHAHIDAN, W. N. S. Non-exosomal and exosomal circulatory MicroRNAs: Which are more valid as biomarkers? **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. January, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2019.01500
- KEENE, B. W.; ATKINS, C. E.; BONAGURA, J. D.; FOX, P. R.; HÄGGSTRÖM, J.; FUENTES, V. L.; OYAMA, M. A.; RUSH, J. E.; STEPIEN, R.; UECHI, M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 3, p. 1127–1140, 2019. DOI: 10.1111/jvim.15488
- KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, 2010. DOI: 10.1038/nrg2843
- LACERDA, C. M. R.; MACLEA, H. B.; KISIDAY, J. D.; ORTON, E. C. Static and cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins and serotonin in canine mitral valves. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 14, n. 1, p. 223–230, 2012. DOI: 10.1016/j.carpath.2019.107196
- LAM, C.; GAVAGHAN, B. J.; MEYERS, F. E. Radiographic quantification of left atrial size in dogs with myxomatous mitral valve disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 35, n. 2, p. 747–754, 2021. DOI: 10.1111/jvim.16073
- LEWIS, T.; SWIFT, S.; WOOLLIAMS, J. A.; BLOTT, S. Heritability of premature mitral valve disease in Cavalier King Charles spaniels. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 73–76, 2011. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.02.016
- LI, Q.; FREEMAN, L. M.; RUSH, J. E.; LAFLAMME, D. P. Expression profiling of circulating microRNAs in canine myxomatous mitral valve disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 14098–14108, 2015. DOI: 10.3390/ijms160614098
- LJUNGVALL, I.; HÄGGSTRÖM, J. Myxomatous Valvular Disease. *Em*: EDRA PUBLISHING US LLC. **Textbook of CARDIOVASCULAR MEDICINE in dogs and cats**. [s.l: s.n.]p. 1112. DOI:
- MADSEN, M. B.; OLSEN, L. H.; HÄGGSTRÖM, J.; HÖGLUND, K.; LJUNGVALL, I.; FALK, T.; WESS, G.; STEPHENSON, H.; DUKES-MCEWAN, J.; CHETBOUL, V.; GOUNI, V.; PROSCHOWSKY, H. F.; CIRERA, S.; KARLSKOV-MORTENSEN, P.; FREDHOLM, M. Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. **The Journal of heredity**, v. 102 Suppl, n. Whitney 1974, p. 62–67, 2011. DOI: 10.1093/jhered/esr041
- MALCOLM, E. L.; VISSER, L. C.; PHILLIPS, K. L.; JOHNSON, L. R. Diagnostic value of vertebral left atrial size as determined from thoracic radiographs for assessment of left atrial size in dogs with myxomatous mitral valve disease Elizabeth. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 253, n. 8, p. 1038–1045, 2018. DOI: 10.2460/javma.253.8.1038

MARKBY, G.; SUMMERS, K. M.; MACRAE, V. E.; DEL-POZO, J.; CORCORAN, B. M. Myxomatous Degeneration of the Canine Mitral Valve: From Gross Changes to Molecular Events. **Journal of Comparative Pathology**, v. 156, n. 4, p. 371–383, 2017. DOI: 10.1016/j.jcpa.2017.01.009

MATTIN, M. J.; BOSWOOD, A.; CHURCH, D. B.; LÓPEZ-ALVAREZ, J.; MCGREEVY, P. D.; O'NEILL, D. G.; THOMSON, P. C.; BRODBELT, D. C. Prevalence of and Risk Factors for Degenerative Mitral Valve Disease in Dogs Attending Primary-care Veterinary Practices in England. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 847–854, 2015. DOI: 10.1111/jvim.12591

MENCIOTTI, G.; BORGARELLI, M. Review of diagnostic and therapeutic approach to canine myxomatous mitral valve disease. **Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 47, 2017. DOI: 10.3390/vetsci4040047

MIKAWA, S.; NAGAKAWA, M.; OGI, H.; AKABANE, R.; KOYAMA, Y.; SAKATANI, A.; OGAWA, M.; MIYAKAWA, H.; SHIGEMOTO, J.; TOKURIKI, T.; TODA, N.; MIYAGAWA, Y.; TAKEMURA, N. Use of vertebral left atrial size for staging of dogs with myxomatous valve disease. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 30, p. 92–99, 2020. DOI: 10.1016/j.jvc.2020.06.001

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, p. 1–12, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402

O'BRIEN, M. J.; BEIJERINK, N. J.; WADE, C. M. Genetics of canine myxomatous mitral valve disease. **Animal Genetics**, v. 52, n. 4, p. 409–421, 2021. DOI: 10.1111/age.13082

O'SHAUGHNESSY, S.; CRAWFORD, I.; ARSEVSKA, E.; SINGLETON, D.; HUGHES, D.; NOBLE, P. J.; HEZZELL, M. Clinical findings associated with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement in dogs and cats attending first opinion veterinary practices. **Veterinary Record**, v. 191, n. 2, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1002/vetr.945

OYAMA, M. A.; BOSWOOD, A.; CONNOLLY, D. J.; ETTINGER, S. J.; FOX, P. R.; GORDON, S. G.; RUSH, J. E.; SISSON, D. D.; STEPIEN, R. L.; WESS, G.; ZANNAD, F. Clinical usefulness of an assay for measurement of circulating N-terminal pro-B type natriuretic peptide concentration in dogs and cats with heart disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 1, p. 71–82, 2013. DOI: 10.2460/javma.243.1.71

OYAMA, M. A.; ELLIOTT, C.; LOUGHRAN, K. A.; KOSSAR, A. P.; CASTILLERO, E.; LEVY, R. J.; FERRARI, G. Comparative pathology of human and canine myxomatous mitral valve degeneration: 5HT and TGF- β mechanisms. **Cardiovascular Pathology**, v. 46, p. 1-11, 2020. DOI: 10.1016/j.carpath.2019.107196

PAN, W.; ZHONG, Y.; CHENG, C.; LIU, B.; WANG, L.; LI, A.; XIONG, L.; LIU, S. MiR-30-Regulated Autophagy Mediates Angiotensin II-Induced Myocardial Hypertrophy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0053950

PASQUINELLI, A. E.; REINHART, B. J.; SLACK, F.; MARTINDALE, M. Q.; KURODAK, M. I.; MALLER, B.; HAYWARD, D. C.; BALL, E. E.; DEGNAN, B.; MÜLLER, P.;

SPRING, J.; SRINIVASAN, A.; FISHMAN, M.; FINNERTY, J.; CORBO, J.; LEVINE, M.; LEAHY, P.; DAVIDSON, E.; RUVKUN, G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86–89, 2000.

RANI, V.; SENGAR, R. S. Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 685–692, 2022. DOI: 10.1002/bit.28029

REDIS, R. S.; CALIN, S.; YANG, Y.; YOU, M. J.; CALIN, G. A. Cell-to-cell miRNA transfer: From body homeostasis to therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 169–174, 2012. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.003

REIS-FERREIRA, A.; NETO-MENDES, J.; BRÁS-SILVA, C.; LOBO, L.; FONTES-SOUSA, A. P. Emerging Roles of Micrnas in Veterinary Cardiology. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2022. DOI: 10.3390/vetsci9100533

RIOLO, G.; CANTARA, S.; MARZOCCHI, C.; RICCI, C. miRNA targets: From prediction tools to experimental validation. **Methods and Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 2021. DOI: 10.3390/mps4010001

RO, W. Bin; KANG, M. H.; SONG, D. W.; KIM, H. S.; LEE, G. W.; PARK, H. M. Identification and Characterization of Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers in Dogs With Heart Diseases. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 1–13, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.729929

RO, W. Bin; KANG, M. H.; SONG, D. W.; LEE, S. H.; PARK, H. M. Expression Profile of Circulating MicroRNAs in Dogs With Cardiac Hypertrophy: A Pilot Study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 1–10, 2021a. DOI: 10.3389/fvets.2021.652224

SÁNCHEZ SALGUERO, X.; PRANDI, D.; LLABRÉS-DÍAZ, F.; MANZANILLA, E. G.; BUSSADORI, C. A radiographic measurement of left atrial size in dogs. **Irish Veterinary Journal**, v. 71, n. 25, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1186/s13620-018-0137-x

SCHULTE, C.; KARAKAS, M.; ZELLER, T. MicroRNAs in cardiovascular disease - Clinical application. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 5, p. 687–704, 2017. DOI: 10.1515/cclm-2016-0576

SEMPERE, L. F.; AZMI, A. S.; MOORE, A. microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 12, n. 6, p. 1–54, 2021. DOI: 10.1002/wrna.1662

SHEHADEH, L. A.; HARE, J. M. Ribonucleic Acid Biomarkers for Heart Failure. Is There a Correlation Between Heart and Blood Transcriptomics?*. **JACC: Heart Failure**, v. 1, n. 6, p. 477–479, 2013. DOI: 10.1016/j.jchf.2013.10.002

SONG, C. L.; LIU, B.; WANG, J. P.; ZHANG, B. L.; ZHANG, J. C.; ZHAO, L. Y.; SHI, Y. F.; LI, Y. X.; WANG, G.; DIAO, H. Y.; LI, Q.; XUE, X.; WU, J. D.; LIU, J.; YU, Y. P.; CAI, D.; LIU, Z. X. Anti-Apoptotic Effect of MicroRNA-30b in Early Phase of Rat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Model. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 11, p. 2610–2619, 2015. DOI: 10.1002/jcb.25208

STEUDEMANN, C.; BAUERSACHS, S.; WEBER, K.; WESS, G. Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1186/1746-6148-9-12

TRITTEN, L.; BURKMAN, E.; MOORHEAD, A.; SATTI, M.; GEARY, J.; MACKENZIE, C.; GEARY, T. Detection of Circulating Parasite-Derived MicroRNAs in Filarial Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002971

VACCHI-SUZZI, C.; HAHNE, F.; SCHEUBEL, P.; MARCELLIN, M.; DUBOST, V.; WESTPHAL, M.; BOEGLIN, C.; BÜCHMANN-MØLLER, S.; CHEUNG, M. S.; CORDIER, A.; DE BENEDETTO, C.; DEURINCK, M.; FREI, M.; MOULIN, P.; OAKELEY, E.; GRENET, O.; GREVOT, A.; STULL, R.; THEIL, D.; MOGGS, J. G.; MARRER, E.; COUTTET, P. Heart Structure-Specific Transcriptomic Atlas Reveals Conserved microRNA-mRNA Interactions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0052442

WAHID, F.; SHEHZAD, A.; KHAN, T.; KIM, Y. Y. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 11, p. 1231–1243, 2010. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 1, p. 25–30, 2016. DOI: 10.1002/jcp.25056

WARE, W. A.; BONAGURA, J. D. **CARDIOVASCULAR DISEASE IN COMPANION ANIMALS: Dog, cat and Horse**. [s.l.: s.n.]968 p.

WEBER, K.; ROSTERT, N.; BAUERSACHS, S.; WESS, G. Serum microRNA profiles in cats with hypertrophic cardiomyopathy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 402, n. 1–2, p. 171–180, 2015. DOI: 10.1007/s11010-014-2324-8

WESSELOWSKI, S.; GORDON, S. G.; FRIES, R.; SAUNDERS, A. B.; SYKES, K. T.; VITT, J.; BOUTET, B.; HÄGGSTRÖM, J.; KADOTANI, S.; STACK, J.; BARNETT, B. G. Use of physical examination, electrocardiography, radiography, and biomarkers to predict echocardiographic stage B2 myxomatous mitral valve disease in preclinical Cavalier King Charles Spaniels. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 50, p. 1–16, 2023. DOI: 10.1016/j.jvc.2023.10.001

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–862, 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90530-4

YANG, V. K.; LOUGHRAN, K. A.; MEOLA, D. M.; JUHR, C. M.; THANE, K. E.; DAVIS, A. M.; HOFFMAN, A. M. Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1080/20013078.2017.1350088

YANG, V. K.; TAI, A. K.; HUH, T. P.; MEOLA, D. M.; JUHR, C. M.; ROBINSON, N. A.; HOFFMAN, A. M. Dysregulation of valvular interstitial cell *let-7c*, *MIR-17*, *MIR-20a*, and

- MIR-30d in naturally occurring canine myxomatous mitral valve disease. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0188617
- ZHANG, L.; JIA, X. Down-regulation of miR-30b-5p protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury by targeting Aven. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 24, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1186/s11658-019-0187-4
- ZHANG, Y.; ZHENG, S.; GENG, Y.; XUE, J.; WANG, Z.; XIE, X.; WANG, J.; ZHANG, S.; HOU, Y. MicroRNA profiling of atrial fibrillation in canines: MiR-206 modulates intrinsic cardiac autonomic nerve remodeling by regulating SOD1. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0122674
- ZHAO, G. Significance of non-coding circular RNAs and micro RNAs in the pathogenesis of cardiovascular diseases. **Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 11, p. 713–720, 2018. DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105387
- ZHAO, X. S.; REN, Y.; WU, Y.; REN, H. K.; CHEN, H. MiR-30b-5p and miR-22-3p restrain the fibrogenesis of post-myocardial infarction in mice via targeting PTAFR. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 24, n. 7, p. 3993–4004, 2020. DOI: 10.26355/eurrev_202004_20869

APÊNDICE

Apêndice A – Modelo de Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) Sr(a) convido o(a) Sr(a). para participar na pesquisa que tem o título de **“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS EM TECIDO VALVAR E PLASMA SANGUÍNEO DE CÃES COM DOENÇA VALVULAR CRÔNICA DE MITRAL: ESTUDO EXPLORATÓRIO E COMPARATIVO”**, que tem como objetivo identificar e qualificar a expressão de marcadores biológicos presentes no coração e sangue de cães, e buscar compreender o potencial papel destes marcadores na doença cardíaca estudada.

No caso de aceitar fazer parte desta pesquisa, o seu animal será submetido a realização de exames diagnósticos (ecocardiograma e eletrocardiograma), exame físico e clínico e a colheita de sangue. Um exame de radiografia torácica, caso necessário, precisará ser realizado em momento futuro, porém o Sr.(a) receberá a informação previamente, e será marcado um momento oportuno para realização dele. Caso seu animal já tenha realizado algum destes exames diagnósticos em um prazo de até 6 meses, ele não precisará ser realizado e será solicitado ao(a) Sr(a) a autorização para o acesso aos mesmos. A colheita do sangue do seu animal ocorrerá através da introdução de uma agulha na veia, após raspagem do pelo e limpeza prévia da região com álcool 70%. Para isso, o animal deverá respeitar um jejum de 8 horas. No caso de precisar repetir a colheita ou exame, será solicitado ao Sr.(a) a repetição do procedimento em momento oportuno. Todos estes procedimentos serão realizados por uma equipe treinada para tais exames. O Sr. (a) será informado sobre os locais e datas de agendamento e só assinará este documento estando ciente da necessidade de realização de todos os exames e colheitas solicitados. Informamos que os custos com os exames serão de nossa inteira responsabilidade, deixando-os isentos. Infelizmente o projeto não prevê ressarcimento para despesas de deslocamento do tutor e seu animal, para o local de colheita e realização dos exames.

A realização dos exames diagnósticos e da colheita de sangue, que são procedimentos rotineiros e comuns, podem causar um leve incômodo durante e após o término em seu animal. É possível também haver um pouco de dor em decorrência da picada da agulha na colheita do sangue, e o local ficar levemente inchado e roxo, mas reforçamos que teremos uma equipe treinada que fará o possível para que esses efeitos indesejáveis não aconteçam. Haverá a necessidade da contenção física do seu animal.

A participação do animal na pesquisa será importante pois permitirá desenvolvermos um estudo que possibilita aumentar os conhecimentos sobre o desenvolvimento da doença cardíaca estudada, que é bastante frequente em cães, sobretudo idosos e de pequeno porte. Caso participe da nossa pesquisa, o(a) Sr(a) terá liberdade para pedir esclarecimentos sobre qualquer questão, bem como para desistir de participar da mesma a qualquer momento que desejar, mesmo depois de ter assinado este documento; e não será, por isso, penalizada de nenhuma forma. Como benefício direto, o seu animal passará por avaliação clínica e cardiológica, bem como por realização de exames diagnósticos importantes, todos realizados de forma gratuita, os quais o Sr(a) terá acesso aos resultados e as orientações em casos de anormalidades. Como benefício indireto, o resultado deste estudo poderá contribuir de forma substancial para a

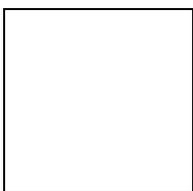
compreensão das funções e possíveis interferências dos marcadores pesquisados na doença em questão. Os resultados também poderão ser divulgados em meio científico e na própria Universidade. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) que também poderá esclarecer suas dúvidas quanto a mesma. A CEUA-UESC fica na Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, Bahia, funciona de 8h às 16h, na sexta-feira sendo que você poderá entrar em contato através do telefone: (73) 3680-5319 ou por e-mail: ceuauesc@gmail.com. Caso desista, basta avisar ao(s) pesquisador(es) e este termo de consentimento será devolvido, bem como todas as informações dadas pelo(a) Sr(a) serão destruídas e novas colheitas não serão mais realizadas. Como responsável por este estudo comprometo-me em manter sigilo de todos os seus dados pessoais e do seu animal, manter seu anonimato e você terá o direito a solicitar indenização, caso entenda ter sofrido algum tipo de prejuízo físico ou moral decorrente da pesquisa.

ALEXANDRE DIAS MUNHOZ

Pesquisador Responsável Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, Bahia, CEP:45662-900 Telefone para contato: (73) 98881-3378.

Eu, _____, RG _____, aceito participar das atividades da pesquisa: **“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS EM TECIDO VALVAR E PLASMA SANGUÍNEO DE CÃES COM DOENÇA VALVULAR CRÔNICA DE MITRAL: ESTUDO EXPLORATÓRIO E COMPARATIVO”**. Fui devidamente informado(a) e forneço permissão para coleta de informações clínicas, exames diagnósticos e colheita de sangue do meu animal. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade, e que os dados de identificação e outros pessoais não relacionados à pesquisa serão tratados confidencialmente.

Assinatura: _____



Testemunha 1 _____

Testemunha 2 _____

[Obs.: Informo que o presente documento será obtido em duas vias (uma via para o sujeito da pesquisa e uma para guarda do pesquisador) e será impresso em folha única.]

Apêndice B – Valores de expressão do cfa-miR-30b e cfa-miR-130b

GRUPOS	MICRORNAS	
	cfa_miR_30b	cfa-miR-mir_130b
A	226,9697451	149,5367414
A	624,8457116	189,736863
A	69,97929328	-
A	1195,050766	71,30128587
B1	410,8181723	200,346874
B1	391,768119	27,75847084
B1	384,3051344	64,13636921
B1	19,46561728	66,96596746
B1	257,1303666	30,00968332
B1	41,3081971	95,89317213
B1	201,3213253	155,4553211
B1	162,788637	55,20994236
B1	278,8520738	140,9320755
B2	617,7401065	42,38130744
B2	165,8639092	14,91669679
B2	528,1691364	74,50969177
B2	403,340982	135,7074572
C	-	144,442971
C	120,3303026	116,8372251
C	9,820906458	6,335050807
C	234,8923942	33,69251433
C	88,94589935	15,62577878
C	39,44734204	50,08671851
C	23,02064243	9,685699137
C	22,02173435	149,4331263

ANEXOS

Anexo A – Protocolo de Extração de RNA a partir de amostras de sangue (Adaptado de LAPAGEN-UESC: POQ-LPAG-001-003)

1º Dia

- 1 - Adicionar 600µL de reagente TRIzol® em um microtubo de 1,5mL estéril;
- 2 - Adicionar 300-400µL de plasma ao reagente, homogeneizando bem até desfazer os grumos formados;
- 3 - Adicionar 200µL de clorofórmio gelado, homogeneizando as amostras por pipetagem ou vertendo o tubo por aproximadamente sete vezes.
- 4 - Deixar descansar sobre a bancada a temperatura ambiente por cinco minutos.
- 5 - Centrifugar a 14.000rpm, a temperatura de 4°C, por vinte minutos.
- 6 - Transferir aproximadamente 600µL do sobrenadante para um novo microtubo devidamente identificado com a ID da amostra.
- 7 - Adicionar aproximadamente 1.000µL de Isopropanol gelado, vertendo o tudo por aproximadamente cinco vezes a fim de homogeneizar o material.
- 8 - Armazenar em freezer a uma temperatura entre -80°C, até o dia seguinte (overnight).

2º Dia

- 1 - Descongelar as amostras.
- 2 - Centrifugar a 14.000rpm, a temperatura de 4°C, por vinte minutos.
- 3 - Descartar o sobrenadante de uma vez, mantendo o pellet.
- 4- Adicionar 1.000µL de álcool a 70% gelado.
- 5 - Centrifugar a 14.000rpm, a temperatura de 4°C, por vinte minutos.
- 6 - Descartar o sobrenadante e deixar os tubos com a abertura para baixo com a finalidade de secar, por aproximadamente 30 minutos, observando a mudança na cor do pellet.
- 7 - Adicionar aproximadamente 20µL de H₂O milliQ autoclavada.
- 8 - Armazenar em freezer a uma temperatura entre -80°C a -20°C.

Anexo B – Protocolo de Síntese de cDNA (*Applied Biosystems*)

- 1 - Diluir o RNA extraído em água ultra pura para formar uma concentração de 500ng/5µL e manter em gelo;
- 2 - Separar um microtubo estéril;
- 3 - Adicionar ao microtubo: 1,0µL de *primers* específicos para a transcrição dos microRNAs (kit TaqMan® reverse transcription); 1,5µL de 10X *Reverse Transcription Buffer*; 0,15µL de 100mM dNTPs; 1,0µL de MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*; 0,2µL de *RNase Inhibitor*; 4,5 µL de água ultra pura (livre de nuclease);
- 4 - Homogeneizar bem os reagentes dentro do tubo;
- 5 - Adicionar 10µL do mix nos tubos contendo as amostras de RNA extraído diluídas, homogeneizando bem em cada amostra;
- 6 - Levar os tubos ao termociclador e configurar os parâmetros de ciclo térmico da seguinte forma: 30min a 16°C, 30min a 42°C e 5min a 85°C;
- 7 - Ao finalizar, diluir as amostras em 45µL de água ultra pura;
- 8 - Armazenar o material a -20°.

Anexo C – Protocolo de análise de RT-qPCR (*Applied Biosystems*):

- 1 - Separar um microtubo estéril;
- 2 - Adicionar ao tubo: 10,0µL de Taqman *mastermix* (*Applied Biosystems*) e 0,5µL do *primer* específico para o microRNA utilizado na reação (TaqMan® *microRNA assay*);
- 3 - Separar uma microplaca de 96 poços (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate);
- 4 - Adicionar em cada poço: 10,5µL do mix e 9,5µL de cDNA;
- 5 - Em um dos poços, adicionar apenas o mix (controle negativo);
- 6 - Selar a placa;
- 7 - Levar ao termociclador com as seguintes condições de reação: 10 min a 95°C, 40 ciclos a 95°C por 15 seg e a 60°C por 1 min.
- 8 - Ao final da leitura, descartar a placa em lixo apropriado.