

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

miR-146a na doença mixomatosa da válvula mitral no cão: comparação com o biomarcador cardíaco NT- proBNP

Helena Coelho dos Santos Ferreira Pinho

MI 2025



Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto

Helena Coelho dos Santos Ferreira Pinho

**miR-146a na doença mixomatosa da válvula mitral no cão: comparação com o
biomarcador cardíaco NT-proBNP**

Área científica: Ciências Clínicas - Medicina e Cirurgia de Animais de Companhia

Orientadora: Prof. Doutora Ana Patrícia Nunes Fontes de Sousa (ICBAS-UP)

Coorientador: Prof. Doutor Luís Pedro Rodrigues de Lima Lobo (Hospital Veterinário do
Porto)

Porto, 2025

RESUMO

A doença mixomatosa da válvula mitral é a doença cardíaca adquirida mais prevalente em cães, exigindo um diagnóstico precoce e monitorização contínua para uma gestão clínica eficaz. Os microRNAs, pequenas moléculas de RNA não codificante com função reguladora da expressão génica, têm emergido como potenciais biomarcadores em doenças cardiovasculares. Entre estes, destaca-se o microRNA-146a pela sua implicação na modulação da resposta inflamatória associada à remodelação cardíaca e à progressão para insuficiência cardíaca. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial diagnóstico do miR-146a em cães com DMVM, analisando a sua associação com parâmetros ecocardiográficos de remodelação cardíaca esquerda e a sua correlação com os níveis plasmáticos de NT-proBNP, biomarcador já estabelecido em cardiologia veterinária. Foram incluídos sessenta cães, distribuídos segundo a classificação do ACVIM (estádios B1, B2 e C), incluindo um grupo controlo. Os animais foram ainda estratificados conforme a presença de dilatação do átrio esquerdo e/ou ventrículo esquerdo. Os níveis plasmáticos de NT-proBNP foram determinados, e a expressão relativa do miR-146a foi quantificada por qRT-PCR. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto à idade e ao peso corporal. A expressão de miR-146a foi significativamente mais elevada em cães sintomáticos (estádio C) em comparação com os assintomáticos (estádios B1 e B2), bem como em animais com dilatação do AE e/ou VE ($p < 0,05$). Os níveis de NT-proBNP seguiram um padrão semelhante. Observou-se ainda uma correlação positiva entre os dois biomarcadores e os parâmetros ecocardiográficos AE/Ao e DIVEdN, indicadores clássicos de remodelação cardíaca esquerda. Estes resultados sugerem que o miR-146a poderá constituir um marcador adicional da progressão da DMVM, com potencial utilidade na estratificação de risco e na identificação de cães em fases clínicas mais avançadas. A sua correlação com parâmetros ecocardiográficos e com o NT-proBNP reforça o seu valor como ferramenta complementar de monitorização da doença. No entanto, serão necessários estudos adicionais para validar a sua aplicabilidade na prática clínica veterinária e consolidar o seu papel no contexto da rotina diagnóstica.

PALAVRAS- CHAVE: cão; doença mixomatosa da válvula mitral; microRNA; miR-146a; NT-proBNP

CASUÍSTICA

Durante o estágio curricular de 16 semanas realizado no Hospital Veterinário do Porto, acompanhei 529 casos clínicos, maioritariamente em medicina interna. A urologia foi a área mais representativa, com 85 casos (16,07%), dos quais se destacaram a doença renal crónica (47,06%), sobretudo em gatos geriátricos, e as obstruções uretrais (22,35%). Em cardiologia, acompanhei 84 casos (15,88%), sendo os diagnósticos mais frequentes a doença mixomatosa da válvula mitral em cães e a cardiomiopatia hipertrófica em gatos, ambas com igual representatividade (20,24%). Em gastroenterologia, acompanhei 76 casos (14,36%), dos quais se salientaram a pancreatite (21,05%) e as gastroenterites de origem indeterminada (9,21%). A oncologia esteve presente em 71 casos (13,42%), com maior incidência de linfoma multicêntrico (11,26%), o carcinoma de células escamosas (8,45%) e mastocitoma cutâneo (7,04%). Na área de dermatologia foram registados 64 casos (12,10%), entre os quais a dermatite atópica canina foi o diagnóstico mais comum (37,5%), seguida da síndrome atópica felina (14,06%) e da otite externa (7,81%). No âmbito das doenças infecciosas, acompanhei 40 casos (7,56%), sendo a panleucopenia felina o diagnóstico mais frequente (25%), seguida da infeção por FIV (12,5%). Na endocrinologia foram observados 37 casos (7,00%), sendo particularmente prevalentes a diabetes *mellitus* e o hipotireoidismo (ambos com 32,43%). O sistema respiratório contou com 21 casos (3,97%), maioritariamente quadros de pneumonia e derrame pleural (19,05%). Na área da neurologia, registei 17 casos (3,21%), com destaque para convulsões idiopáticas (23,53%) e síndrome vestibular periférica (17,65%). O mesmo número de casos foi observado no sistema musculoesquelético (3,21%), onde a rutura de ligamento cruzado cranial (29,41%) e fraturas traumáticas (17,65%) foram as patologias mais comuns. Em oftalmologia, observei 8 casos (1,51%), sendo metade deles úlceras da córnea (50%). Na teriogenologia, acompanhei 5 casos (0,95%), dos quais 4 eram piómetras e 1 mucómetra. Em hematologia, dos 4 casos acompanhados (0,75%), metade correspondia a anemia hemolítica imunomediada (50%).

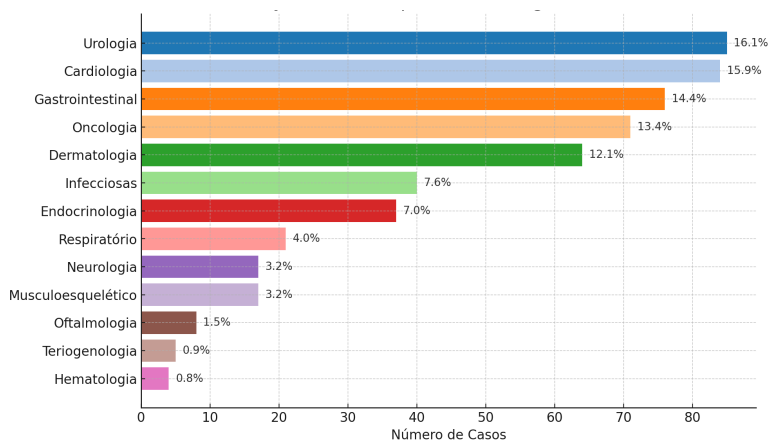
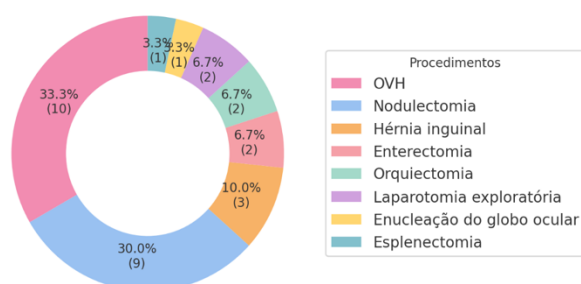


Figura 1. Distribuição percentual dos casos acompanhados durante o período de estágio, por área clínica.

No âmbito da clínica cirúrgica, participei em 34 procedimentos, dos quais 30 foram intervenções em tecidos moles (88,23%) e 4 em ortopedia (11,76%). As cirurgias de tecidos moles mais comuns foram a ovariectomia (33,33%) e a nodulectomia (30,00%). Assisti, ainda, a procedimentos de maior complexidade, como bypass ureteral subcutâneo (SUB), implantação de marcapasso cardíaco, valvuloplastia pulmonar e esternotomia, que permitiram o contacto com cirurgias de maior exigência técnica e clínica.

Procedimentos cirúrgicos em tecidos moles



Procedimentos cirúrgicos ortopédicos

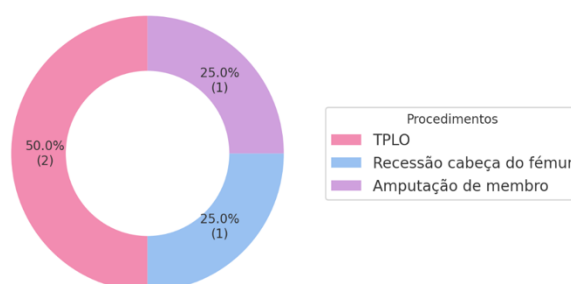


Figura 2. Distribuição percentual dos procedimentos cirúrgicos acompanhados durante o período de estágio.

AGRADECIMENTOS

E assim acaba mais uma etapa... Uma etapa intensa, carregada de aprendizagens e momentos que levo para sempre no coração. Ao longo deste percurso, tive a sorte de me cruzar com pessoas extraordinárias, que fizeram este período ser tão especial. A cada uma delas, o meu mais sincero e sentido obrigado.

Começo pela minha orientadora, Prof. Doutora Ana Patrícia Fontes de Sousa. Obrigada por me acolher com tanta generosidade, por cada palavra de orientação, por toda a atenção e cuidado. É, sem dúvida, uma referência.

À Dra. Ana Sofia dos Reis Ferreira, o meu sincero agradecimento. Obrigada por confiar em mim desde o início e por me dar a oportunidade de integrar este projeto. A sua presença constante, generosidade e preocupação foram fundamentais. De coração, obrigada.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Luís Lobo, obrigada por me receber de forma tão acolhedora, pelos conselhos sábios e ensinamentos partilhados ao longo deste tempo. Foi um privilégio aprender consigo.

À equipa do Hospital Veterinário do Porto (HVP), médicos, enfermeiros e auxiliares, o meu mais profundo obrigado. Obrigada por me receberem de braços abertos e me fazerem sentir em casa. Foram meses de entrega, de muito trabalho, mas também de enorme realização. Saio desta experiência mais confiante, mais destemida e com o coração cheio. Levo um bocadinho de cada um comigo. Obrigada por contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus colegas estagiários... que sorte a minha ter-me cruzado convosco. Obrigada por cada momento partilhado, por todas as gargalhadas, desabafos e pelo apoio constante. Não podia ter pedido melhor grupo para viver esta experiência. Levo-vos no coração.

À minha Bea, que sorte a minha ter-te ao meu lado nesta caminhada. Obrigada por tudo, pela tua presença constante em todos os momentos, pela amizade leve e verdadeira, pelas conversas reconfortantes e pelas gargalhadas infinitas. Esta jornada foi ainda mais bonita por te ter ao meu lado. Levo-te comigo, para a vida.

Aos meus *Pistachios*, Catarina, Bea, Mariana, Inês, Cristiana, Jaime, Telmo e Pedro, obrigada por tornarem este caminho mais leve, divertido e infinitamente mais bonito. Que venham muitas mais “sebastianas” juntos! Espero ter-vos sempre por perto.

À Inês Branco e à Francisca, obrigada por todos os momentos partilhados, pelo apoio constante e pela vossa companhia ao longo desta jornada. Guardo-vos num lugar muito especial no meu coração.

Aos meus queridos pais... não existem palavras que consigam expressar o quanto vos quero agradecer. Obrigada por estarem sempre, mas sempre, ao meu lado, por todo o apoio e incentivo e,

sobretudo, por acreditarem em mim incondicionalmente. Agarraram neste sonho com a mesma força que eu, caminharam comigo em cada etapa e nunca me deixaram desistir. Esta conquista também é vossa. Levar-vos-ei sempre comigo em cada nova etapa que a vida me reservar.

À minha maninha linda, obrigada por me mostrares que a vida pode ser simples, tranquila e sem pressas. És a minha calma neste mundo tão apressado.

Aos meus queridos avós, obrigada pela preocupação e pelo carinho constante. Ver-vos orgulhosos é o meu maior presente.

Bruno, obrigada por tudo. Obrigada por partilhares comigo as alegrias e conquistas, por seres colo e abraço apertado nos momentos difíceis, por seres companhia constante e apoio incondicional. Foste, sem dúvida, a chave de ouro deste percurso.

À minha amiga de sempre, Raquel... mesmo longe, estiveste sempre perto. Obrigada por todo o apoio. Para sempre!

Agradeço a toda a minha família e amigos que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes ao longo desta etapa.

E claro, aos meus patudos, Valentina e Brutus. Sem saberem, foram muitas vezes o meu refúgio. Obrigada pelo amor puro, que só vocês sabem dar.

Sem dúvida, o que levo de mais precioso desta etapa são as pessoas, os momentos e as memórias. Hoje, olho para trás com serenidade e com orgulho, com a certeza de que a pequena Helena, que sonhava em ser Médica Veterinária, estaria muito feliz. Esta é a concretização de um sonho, mas, acima de tudo, uma prova de superação.

Fui muito feliz e sabia!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. DOENÇA MIXOMATOSA DA VÁLVULA MITRAL	2
2.1 Definição	2
2.2 Epidemiologia	2
2.3 Etiopatogenia	2
2.4 Patologia e Fisiopatologia	3
2.5 Sinais Clínicos	4
2.6 Diagnóstico	5
2.7 Tratamento	7
3. BIOMARCADORES CARDÍACOS	8
3.1 Conceitos gerais	8
3.1.1. Relevância clínica e diagnóstica dos biomarcadores na DMVM	8
3.1.2. Utilidade clínica do NT-proBNP na avaliação e monitorização da DMVM canina	10
3.2 MicroRNAs como biomarcadores emergentes na Medicina Veterinária	12
3.2.1. Regulação molecular da DMVM: o contributo dos microRNAs	14
3.3. miR-146a na fisiopatologia cardiovascular: o que sabemos?	15
3.3.1. O miR-146a como potencial biomarcador na DMVM	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Descrição do estudo	20
4.2 Critérios de inclusão e exclusão	20
4.3 Colheita e processamento das amostras de sangue	21
4.4 Extração de RNA total	21
4.5 Síntese de cDNA e qRT-PCR	22
4.6 Avaliação ecocardiográfica e parâmetros utilizados na classificação da DMVM	23
4.7 Análise estatística	23
4.8 Considerações éticas	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Caracterização da população	25
5.2 Parâmetros ecocardiográficos	27
5.3 Expressão relativa do miR-146a ($2^{-\Delta Ct}$)	29
5.4 Análise comparativa entre o miR-146a e NT-proBNP	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição percentual dos casos acompanhados durante o período de estágio, por área clínica.	iv
Figura 2. Distribuição percentual dos procedimentos cirúrgicos acompanhados durante o período de estágio.	v
Figura 3. Distribuição da idade (A) e do peso corporal (B) dos cães nos diferentes grupos clínicos, de acordo com classificação ACVIM (controle, B1, B2 e C).	25
Figura 4. Distribuição dos parâmetros ecocardiográficos, AE/Ao (A) e DIVEdN (B), nos diferentes grupos (controle, B1, B2 e C).	27
Figura 5. Expressão relativa de miR-146a nos diferentes grupos em estudo (controle, B1, B2 e C) (A) e comparação da expressão de miR-146a entre cães assintomáticos (estádios B1 e B2) e sintomáticos (estádio C) (B).	29
Figura 6. Regressão linear da expressão relativa de miR-146a ($2^{-\Delta Ct}$) em função dos índices ecocardiográficos (AE/Ao (A) e DIVEdN (B)) em cães com DMVM.	30
Figura 7. Distribuição dos níveis plasmáticos de miR-146a ($2^{-\Delta Ct}$) em cães agrupados consoante com a presença ou ausência de dilatação do AE (A), do VE (B) e de ambas as câmaras (AE + VE) (C).	30
Figura 8. Expressão do miR-146a (A) e concentrações plasmáticas de NT-proBNP (B) ao longo dos estádios da DMVM, segundo classificação do ACVIM (Controle, B1, B2 e C).	31
Figura 9. Curvas ROC para a precisão de cada biomarcador (miR-146a e NT-proBNP) na discriminação de cães com DMVM de cães saudáveis (A) e na discriminação de cães sintomáticos (estádio C) de cães assintomáticos (estádios B1 e B2) (B).	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização demográfica da população de cães incluída no estudo.	26
Tabela 2. Distribuição dos principais parâmetros ecocardiográficos nos diferentes grupos experimentais.	28

ABREVIATURAS

°C Graus Celsius

% Percentagem

2^{-ΔCt} Comparative threshold cycle method
(Método comparativo do ciclo limiar)

ACVIM American College of Veterinary Internal
Medicine (Colégio Americano de Medicina
Interna Veterinária)

AE Átrio esquerdo

AE/Ao Relação átrio esquerdo/aorta

ANP Atrial Natriuretic Peptide (Péptido
natriurético atrial)

Ao Aorta

AP-1 Activator Protein 1 (Proteína ativadora 1)

AUC Area Under the Curve (Área sob a curva)

BNP Brain Natriuretic Peptide (Péptido
natriurético cerebral)

Cel-miR-39 *Caenorhabditis elegans* microRNA-
39 mimetic (mimético do miRNA *Caenorhabditis*
elegans miR-39)

CEVs Células endoteliais valvulares

cDNA Complementary DNA (DNA
complementar)

cfa-miRNA *Canis familiaris* microRNA
(microRNA da família canina)

CIVs Células intersticiais valvulares

CKCS Cavalier King Charles Spaniel

Ct Cycle threshold (Ciclo limiar)

cTnI Cardiac Troponin I (Troponina I cardíaca)

DIVeD Diâmetro interno do ventrículo
esquerdo em diástole

DIVeD Diâmetro interno do ventrículo
esquerdo em diástole, normalizado
ao peso corporal

DMVM Doença mixomatosa da válvula
Mitral

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
(Ensaio Imunoenzimático)

ET-1 Endothelin-1 (Endotelina 1)

FOS Fos proto-oncogene (Fator induzido por
osteossarcoma)

g Força gravitacional

HP Hipertensão pulmonar

ICC Insuficiência cardíaca congestiva

ICD Insuficiência cardíaca direita

IRAK1 Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
1 (Proteína quinase associada ao recetor da IL-1)

Kg Quilograma

MEC Matriz extracelular

miR-146a microRNA-146a

miRNA microRNA

mL Mililitro

MMP-9 Matrix Metalloproteinase 9
(Metaloproteinase 9 da matriz)

mRNA Messenger RNA (RNA mensageiro)

NETs Neutrophil Extracellular Traps (Traps
extracelulares de neutrófilos)

NF-κB Nuclear Factor kappa B (Fator nuclear
kappa B)

NT-proANP N-terminal pro-Atrial Natriuretic Peptide (Fragmento N-terminal do péptido natriurético atrial)

NT-proBNP N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide (Fragmento N-terminal do péptido natriurético tipo B)

qRT-PCR Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR em tempo real)

r Correlação estatística

RM Regurgitação mitral

RNA Ácido ribonucleico

RNase Ribonuclease

ROC Receiver Operating Characteristic (Curva Característica de Operação do Recetor)

rpm Rotações por minuto

TGF- β Transforming Growth Factor beta (Fator de crescimento transformador beta)

TLR Toll-Like Receptor (Recetor Toll-like)

TRAF6 TNF Receptor-Associated Factor 6 (Fator associado ao recetor de TNF6)

VE Ventrículo esquerdo

μ L Microlitro

1. INTRODUÇÃO

A doença mixomatosa da válvula mitral (DMVM) é a doença cardíaca adquirida mais comum em cães, com especial incidência em raças de pequeno a médio porte e idade avançada. Trata-se de uma doença crônica, progressiva e frequentemente silenciosa nas fases iniciais, sendo a ecocardiografia o método de eleição para o seu diagnóstico. No entanto, a realização deste exame nem sempre é possível em todos os contextos clínicos, o que tem incentivado a procura por biomarcadores complementares que permitam uma avaliação precoce e objetiva da progressão da doença (Keene et al., 2019).

O fragmento N-terminal do péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) é atualmente um dos biomarcadores mais utilizados em medicina veterinária para avaliar distensão miocárdica e sobrecarga cardíaca, inclusive na DMVM (Hori et al., 2020). Apesar da sua reconhecida utilidade clínica apresenta limitações que dificultam o diagnóstico preciso (Wall et al., 2018). Estas limitações têm impulsionado a procura por biomarcadores mais sensíveis e específicos, capazes de detetar precocemente alterações e monitorizar de forma mais precisa a progressão da doença (Arroyo et al., 2018).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) não codificantes que regulam a expressão génica a nível pós-transcricional, participando em múltiplas vias fisiopatológicas. O avanço do conhecimento na biologia cardiovascular tem permitido associar padrões de expressão alterada de determinados miRNAs à presença de doenças cardíacas (Cakmak & Demir, 2020). Entre estes, destaca-se o microRNA-146a (miR-146a), reconhecido como um regulador negativo da resposta imune inata e da inflamação. Embora os seus efeitos no tecido cardíaco sejam por vezes contraditórios, a desregulação dos seus níveis tem sido consistentemente associada à presença de remodelação cardíaca e insuficiência cardíaca, sugerindo o seu potencial como biomarcador da progressão destas condições (He et al., 2019). No entanto, a sua expressão na DMVM canina permanece, até à data, pouco estudada.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial diagnóstico do miR-146a em cães com DMVM, explorando a sua associação com parâmetros clínicos e ecocardiográficos da doença, bem como a sua correlação com os níveis plasmáticos de NT-proBNP. Pretende-se, assim, contribuir para a validação do miR-146a como biomarcador complementar na estratificação de risco e na monitorização da progressão da DMVM em cães.

2. DOENÇA MIXOMATOSA DA VÁLVULA MITRAL

2.1 Definição

A DMVM é a doença cardíaca adquirida mais comum em cães, sendo uma importante causa de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Borgarelli & Buchanan, 2012). Também conhecida como endocardiose, doença valvular crônica e doença degenerativa da válvula mitral, caracteriza-se por uma degenerescência lenta e progressiva da válvula mitral, que compromete a sua competência funcional, resultando em prolapso e regurgitação mitral (RM) e subsequente dilatação do átrio esquerdo (AE) e do ventrículo esquerdo (VE) (Fox, 2012).

2.2 Epidemiologia

A DMVM é responsável por cerca de 75% das doenças cardíacas adquiridas em cães, afetando principalmente animais de raças pequenas e idade avançada (Ljungvall & Häggström, 2023). A prevalência da doença aumenta significativamente com a idade, sendo que mais de 85% dos cães com 13 anos apresentam evidências de lesões valvulares à necropsia. Raças predispostas, como Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) e Teckel, desenvolvem a doença precocemente, o que sugere uma componente genética. A distribuição por sexo revela uma ligeira predominância nos machos, que parecem ser cerca de 1,5 vezes mais afetados do que as fêmeas (Keene et al., 2019). Embora predominante em cães de pequeno porte (<20 Kg), a DMVM pode ocorrer em raças grandes, geralmente com evolução mais rápida e prognóstico reservado (Borgarelli et al., 2004). A válvula mitral é a principal estrutura afetada, porém, em aproximadamente 30% dos casos, observa-se também o envolvimento da válvula tricúspide (Borgarelli & Buchanan, 2012).

2.3 Etiopatogenia

A DMVM é uma condição multifatorial cuja etiologia não se encontra completamente elucidada. Evidências atuais apontam para uma forte componente genética, sobretudo em raças predispostas como o CKCS, onde a doença se manifesta de forma precoce e com elevada prevalência (Swift et al., 2017). Nestes cães, foram identificados loci nos cromossomos CFA13, CFA14 e CFA2, que aparentam estar associados ao desenvolvimento de DMVM (Axelsson et al., 2021; Madsen et al., 2011). Para além da predisposição genética, fatores biomecânicos parecem desempenhar um papel relevante na fisiopatologia da doença. A tensão mecânica crônica exercida sobre as cúspides mitrais, resultantes do ciclo cardíaco, de alterações anatómicas ou do envelhecimento, pode, por si só, atuar como fator desencadeante primário do processo degenerativo (Menciotti et al., 2017). A combinação entre estímulos mecânicos e predisposição genética promove a ativação de vias moleculares, como as

do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e da serotonina, que induzem a transição endotelial-mesenquimal das células endoteliais valvulares (CEVs) e a diferenciação das células intersticiais valvulares (CIVs) em miofibroblastos (Aupperle et al., 2008; Oyama et al., 2020). Estas células ativadas produzem matriz extracelular (MEC) de forma desorganizada, juntamente com metaloproteinases, cuja expressão aumentada, aliada à redução dos seus inibidores, acelera a degradação do colagénio e da elastina, comprometendo a integridade estrutural da válvula (Obayashi et al., 2011). Embora a inflamação não seja central neste processo, a presença de macrófagos, citocinas e miRNAs reguladores nas válvulas sugere um contributo adicional para a progressão da lesão (Piantedosi et al., 2022).

2.4 Patologia e Fisiopatologia

A válvula mitral é uma estrutura complexa formada por cúspides, cordas tendinosas, músculos papilares e anel mitral, que atuam de forma coordenada para garantir a coaptação valvular durante o ciclo cardíaco. Em condições normais, as cúspides são finas, translúcidas e organizadas em quatro camadas histológicas (*atrialis*, *spongiosa*, fibrosa e *ventricularis*), sustentadas por CEVs e CIVs, e por uma MEC rica em colagénio e proteoglicanos (Fox, 2012).

Na DMVM ocorre um espessamento progressivo das cúspides mitrais, com formação de nódulos, e alterações nas cordas tendinosas, que se tornam alongadas e propensas à rutura. Estas alterações decorrem de uma remodelação desorganizada da MEC, resultante da expansão da camada *spongiosa* e fragmentação da camada fibrosa, comprometendo a resistência e a função valvular. A nível celular, as CIVs, normalmente quiescentes, adquirem um fenótipo miofibroblástico ativo, com produção aumentada de MEC e metaloproteinases, enquanto as CEVs sofrem apoptose, perda de aderência à membrana basal e transição endotelial-mesenquimal. Estas alterações comprometem a competência valvular, o que, por sua vez, favorece o prolapso e a RM (Fox, 2012).

A RM leva a sobrecarga de volume, desencadeando a dilatação progressiva e hipertrofia excêntrica das câmaras cardíacas esquerdas. Inicialmente, a compensação ocorre através do mecanismo de Frank-Starling, que aumenta a força de contração em resposta ao estiramento das fibras miocárdicas. No entanto, à medida que a doença progride e o débito cardíaco diminui, são ativados mecanismos compensatórios neuro-hormonais, como o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona, que promovem vasoconstrição e retenção hídrica para manter a perfusão sistémica (Oyama, 2009).

Com a progressão da doença, estes mecanismos compensatórios tornam-se desadaptativos, exacerbando a remodelação cardíaca e a disfunção miocárdica. A dilatação progressiva do *annulus fibrosus* favorece o aumento do orifício regurgitante, agravando a RM e perpetuando o ciclo

degenerativo. Com o agravamento da RM, a pressão retrógrada sobre as veias pulmonares pode levar a congestão vascular e desenvolvimento de edema pulmonar e, em fases mais avançadas, a hipertensão pulmonar (HP) secundária e insuficiência cardíaca direita (ICD) (Ljungvall & Häggström, 2023). Os jatos regurgitantes de alta velocidade podem, a longo prazo, provocar complicações graves como a rutura das cordas tendinosas, que provoca um agravamento súbito da regurgitação mitral e desencadeia edema pulmonar fulminante, ou a rutura do AE, que pode resultar em tamponamento cardíaco agudo, frequentemente fatal (Fox, 2012).

A degenerescência da válvula tricúspide, frequentemente associada à DMVM, pode originar regurgitação tricúspide, geralmente bem tolerada. Todavia, quando associada a HP ou estenose pulmonar, pode levar a dilatação do ventrículo e átrio direitos, exacerbando a regurgitação tricúspide e contribuindo para o desenvolvimento de ICD, sobretudo em fases avançadas da doença (Reinero et al., 2020).

2.5 Sinais Clínicos

A DMVM em cães apresenta um curso clínico lento e progressivo, muitas vezes silencioso nas fases iniciais, sendo maioritariamente identificada apenas pela auscultação de um sopro cardíaco em consultas de rotina. À medida que a doença avança, surgem sinais clínicos relacionados com ICC, entre os quais se destacam a intolerância ao exercício, taquipneia, prostração e tosse (Porciello et al., 2016). A monitorização da frequência respiratória em repouso pelos tutores tem-se revelado um método sensível para identificar o início de edema pulmonar, sendo um aumento sustentado da frequência respiratória (>30 respirações/minuto) um indicador precoce de descompensação (Schober et al., 2010).

A tosse é um dos sinais mais frequentemente relatado pelos tutores. Contudo, a etiologia da tosse nem sempre é exclusivamente cardíaca. Muitos cães afetados por DMVM apresentam doenças respiratórias concomitantes, como bronquite crónica ou colapso traqueal, o que torna a diferenciação entre origem cardíaca e respiratória particularmente desafiante. A tosse de origem cardíaca tende a ser produtiva secundária à congestão pulmonar e, em casos graves, acompanhada de expectoração espumosa rosada. Já a tosse seca e irritativa pode estar associada à compressão brônquica pelo AE dilatado ou, mais frequentemente, à presença de doença respiratória primária. Nestes casos, a tosse pode ser exacerbada pelo esforço, à noite ou de manhã (Ferasin & Linney, 2019).

O quadro clínico pode incluir ainda síncope transitória, provocada por taquiarritmias, HP ou, mais raramente, por rutura do AE. Em cães com ICC avançada, surgem sinais de ICD, como ascite, hepatomegalia, esplenomegalia, distensão da veia jugular e pulso jugular visível, e sinais

gastrointestinais, como anorexia, vômitos e diarreia. Raramente, pode ocorrer edema periférico, geralmente associado a ascite ou hipoalbuminemia grave (Ljungvall & Häggström, 2023).

O desenvolvimento de ansiedade noturna, inapetência progressiva, caquexia cardíaca e preferência por decúbito esternal são achados frequentes em cães com descompensação da doença. Em raças de médio a grande porte, além da RM grave, é frequente a presença de disfunção miocárdica associada, o que agrava o prognóstico (Borgarelli et al., 2007).

2.6 Diagnóstico

O exame físico é frequentemente o primeiro passo na avaliação de cães com suspeita de DMVM. Nas fases iniciais, o único achado pode ser um sopro sistólico, geralmente holossistólico, audível com maior intensidade no ápex cardíaco do hemitórax esquerdo. A sua intensidade tende a aumentar com a progressão da doença, podendo, no entanto, atenuar-se em casos de regurgitação grave. A taquicardia em repouso é comum em fases descompensadas, refletindo a ativação do sistema nervoso simpático (Ljungvall et al., 2014).

Distinguir sinais de origem cardíaca e respiratória pode ser desafiante. A presença de arritmia sinusal respiratória em cães com tosse intensa sugere uma causa respiratória primária, enquanto a sua ausência associada a outros sinais, como taquicardia persistente e sopros intensos, apontam para envolvimento cardíaco avançado (Tilley, 2016). Estertores crepitantes, sobretudo em campos pulmonares dorsocaudais, podem indicar edema pulmonar, mas exigem interpretação cuidadosa, especialmente em raças pequenas predispostas a doenças respiratórias concomitantes (Ferasin et al., 2013). A avaliação da perfusão periférica, incluindo a coloração das mucosas e o pulso arterial, permite identificar sinais de falência circulatória (Ware et al., 2022). Em estadios terminais, podem surgir caquexia, hipotermia e sinais de ICD, como ascite, hepatomegalia e distensão da veia jugular e pulso jugular visível (Ljungvall & Häggström, 2023). A monitorização da frequência respiratória em repouso e das alterações no estado geral é essencial para detetar descompensações precoces e orientar o plano terapêutico (Keene et al., 2019).

A radiografia torácica continua a ser uma ferramenta valiosa na avaliação de cães com DMVM, permitindo a identificação precoce de alterações estruturais e sinais de congestão pulmonar. Nos estadios iniciais, a silhueta cardíaca pode apresentar-se normal; no entanto, com a progressão da doença, a dilatação do AE torna-se evidente, manifestando-se pela elevação da traqueia e afastamento dos brônquios principais. O índice cardíaco vertebral é amplamente utilizado para estimar o tamanho cardíaco, sendo valores superiores a 10,5 sugestivos de cardiomegalia (Keene et al., 2019). Adicionalmente, índices mais específicos, como o índice vertebral do AE $\geq 2,3$ e a dimensão radiográfica do AE $\geq 1,8$ são considerados indicadores de dilatação atrial esquerda (Malcolm et al., 2018; Salguero

et al., 2018; Vezzosi et al., 2021). A presença de dilatação venosa pulmonar, acompanhada por padrões intersticiais ou alveolares bilaterais e simétricos, é indicativa de congestão pulmonar, embora possa ser confundida com doenças respiratórias crônicas. Em situações de insuficiência cardíaca aguda, como ocorre na rutura de cordas tendinosas, pode desenvolver-se edema pulmonar mesmo na ausência de cardiomegalia evidente. Nos estádios mais avançados da doença, podem também ser observados sinais de ICC, como ascite, hepatomegalia e derrame pleural (Reinero et al., 2020).

A eletrocardiografia é útil na detecção e caracterização de arritmias, como fibrilhação atrial, taquicardia ventricular e extrassístoles. Alterações eletrocardiográficas, como ondas P de duração aumentada (P mitral) ou complexos QRS alargados, podem refletir dilatação ou hipertrofia das câmaras cardíacas. No entanto, o eletrocardiograma apresenta sensibilidade limitada para a avaliação da remodelação cardíaca, sendo a ecocardiografia o método de eleição para essa finalidade (Keene et al., 2019). Em casos de síncope ou suspeita de arritmias intermitentes, está indicada a monitorização eletrocardiográfica contínua com Holter, idealmente por um período de 48 horas, de modo a aumentar a probabilidade de detecção de eventos arritmicos relevantes (Mavropoulou et al., 2021).

Os exames laboratoriais complementam o diagnóstico, permitindo identificar comorbidades e monitorizar possíveis complicações. Em fases avançadas da doença, é comum a elevação dos níveis de ureia e creatinina, geralmente associada à hipoperfusão renal ou uso de diuréticos, bem como alterações eletrolíticas e aumento das enzimas hepáticas, sobretudo por congestão hepática. O lactato também pode encontrar-se elevado em situações de hipoperfusão tecidual (Ware et al., 2022). Quando presente, a anemia tende a ser ligeira e de origem multifatorial, podendo resultar de hemodiluição ou disfunção renal (Gavazza et al., 2020). Biomarcadores cardíacos, como o NT-proBNP e a troponina I cardíaca (cTnI), são úteis no apoio diagnóstico, estratificação da gravidade e prognóstico, mas devem ser interpretados em conjunto com os restantes achados clínicos e imagiológicos (Ogawa et al., 2021).

A ecocardiografia é o método de eleição para a avaliação da DMVM, permitindo identificar alterações morfológicas da válvula mitral e quantificar o impacto funcional da RM. Nos estádios iniciais, é possível detetar espessamento e prolapso das cúspides mitrais, mais frequentemente da cúspide anterior. A dilatação do AE é um dos principais indicadores de progressão da doença, sendo que uma relação AE/aorta (AE/Ao) $\geq 1,6$ é considerada sugestiva de dilatação. A remodelação ventricular esquerda é avaliada através do diâmetro interno em diástole, ajustado ao peso corporal (DIVEdN), sendo valores $\geq 1,7$ compatíveis com hipertrofia excêntrica. Estes dois parâmetros são fundamentais para a identificação de cães em estadio B2, definindo o início do tratamento médico (Keene et al., 2019). A função sistólica pode encontrar-se aumentada nas fases iniciais da DMVM, refletindo um estado hiperdinâmico compensatório, mas tende a diminuir à medida que a doença

progride (Osuga et al., 2021). A gravidade da RM pode ser avaliada por Doppler contínuo, analisando-se a velocidade e o perfil espectral do jato regurgitante (Zheng et al., 2022). O Doppler colorido complementa esta avaliação, permitindo estimar a direção, a extensão e área do jato. A análise do fluxo transmitral por Doppler pulsado, incluindo as ondas E e A e a razão E/tempo de relaxamento isovolumétrico, bem como o índice E/E' obtido por Doppler tecidual, fornece informações sobre a função diastólica e as pressões de enchimento do AE (Kim & Park, 2015; Schober et al., 2010). A avaliação do lado direito do coração é igualmente essencial, especialmente para a detecção de HP, sendo a medição da velocidade do jato de regurgitação tricúspide e outros parâmetros ecocardiográficos ferramentas essenciais com valor prognóstico estabelecido. Assim, a ecocardiografia é uma ferramenta indispensável para o diagnóstico, estratificação, monitorização e definição terapêutica da DMVM (Ljungvall & Häggström, 2023; Tilley, 2016).

2.7 Tratamento

A abordagem terapêutica da DMVM visa retardar a progressão para ICC, controlar os sinais clínicos e melhorar a qualidade de vida. O tratamento é delineado com base no estadio clínico, segundo as diretrizes do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) (Keene et al., 2019). No estadio B1, ainda sem evidência de remodelação cardíaca significativa, não está recomendado o início de tratamento médico. As prioridades incluem a monitorização regular com avaliação da pressão arterial, radiografias torácicas, ecocardiografia e controlo da frequência respiratória em repouso. No estadio B2, com cardiomegalia documentada por ecocardiografia, mas ainda sem sinais de ICC, está indicado o início do tratamento médico. O pimobendan é o tratamento de eleição, tendo demonstrado eficácia em atrasar o aparecimento da ICC e prolongar a sobrevida (Boswood et al., 2016). A adição de um inibidor da enzima conversora da angiotensina e/ou espironolactona pode ser considerada individualmente, embora a evidência de benefício seja limitada (Borgarelli et al., 2020). A restrição ligeira de sódio na dieta é recomendada. Com o aparecimento de ICC (estadio C), a terapêutica de base inclui furosemina, pimobendan e um inibidor da enzima conversora da angiotensina, podendo ser adicionada espironolactona (Franchini et al., 2022). A digoxina é indicada principalmente em casos de fibrilhação atrial, preferencialmente em combinação com diltiazem (Gelzer et al., 2009). A monitorização clínica e analítica é essencial para ajustar o tratamento e prevenir efeitos adversos. No estadio D, correspondente a ICC refratária, pode ser necessário o uso combinado de diuréticos (como torasemida e hidroclorotiazida) e vasodilatadores como a amlodipina (Chetboul et al., 2017). Os betabloqueadores, como carvedilol, podem ser considerados com precaução em cães estáveis. O sildenafil pode ser útil em casos com HP secundária. A cirurgia de reparação da válvula mitral, embora pouco acessível, pode ser considerada em casos

altamente selecionados (Uechi, 2012). Mais recentemente, a técnica transcateter com o dispositivo V-Clamp tem-se afirmado como uma alternativa minimamente invasiva promissora, com evidências preliminares de eficácia e segurança na DMVM em cães (Potter et al., 2024). O tratamento da DMVM deve, assim, ser adaptado ao estadio da doença e à resposta individual, com base numa monitorização contínua e sustentado pela melhor evidência científica disponível (Atkins et al., 2009; Keene et al., 2019).

3. BIOMARCADORES CARDÍACOS

3.1 Conceitos gerais

Um biomarcador é uma substância biológica mensurável que reflete processos fisiológicos, alterações patológicas ou respostas a intervenções terapêuticas (Mobasheri & Cassidy, 2010). Idealmente, um biomarcador deve apresentar alta sensibilidade e especificidade, ser estável em amostras biológicas e de fácil quantificação, correlacionando-se com a gravidade da doença (Oyama, 2015).

Os biomarcadores constituem ferramentas essenciais em várias áreas da medicina moderna, incluindo a oncologia, neurologia, pneumologia, cardiologia e doenças metabólicas, permitindo uma abordagem mais precoce, precisa e personalizada (Mobasheri & Cassidy, 2010). No contexto cardiovascular, destacam-se diferentes classes de biomarcadores com aplicações clínicas relevantes, como os biomarcadores de lesão miocárdica ou necrose (troponinas), os indicadores de função miocárdica (péptidos natriuréticos), bem como os marcadores de inflamação (proteína C-reativa), homeostase lipídica (lipoproteína de elevada densidade e baixa densidade) e stresse oxidativo (mieloperoxidase). Estes biomarcadores têm assumido um papel cada vez mais importante na estratificação de risco, no diagnóstico e na monitorização da evolução das doenças cardíacas (de Lima & Ferreira, 2017).

3.1.1. Relevância clínica e diagnóstica dos biomarcadores na DMVM

Na prática clínica veterinária, os biomarcadores cardíacos têm-se revelado ferramentas valiosas no apoio ao diagnóstico, prognóstico e monitorização da DMVM em cães, sobretudo quando exames complementares, como a ecocardiografia, não estão prontamente disponíveis (Chanmongkolpanit et al., 2024). Entre os biomarcadores mais estudados destacam-se os fragmentos N-terminais dos péptidos natriuréticos atriais e cerebrais (NT-proANP e NT-proBNP, respetivamente) e a cTnI (Oyama & Singletary, 2010).

Os péptidos natriuréticos são hormonas produzidas em resposta ao estiramento das paredes cardíacas por sobrecarga de volume, hipertrofia ou hipoxia. Desempenham um papel fundamental como contrarreguladores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, promovendo vasodilatação, natriurese e efeitos antifibróticos. Os principais péptidos natriuréticos de interesse clínico são o ANP (péptido natriurético atrial) e o BNP (péptido natriurético cerebral), ambos clivados em fragmentos biologicamente ativos e em formas inativas mais estáveis, como o NT-proANP e o NT-proBNP (de Lima & Ferreira, 2017). Este último é o biomarcador mais amplamente utilizado na DMVM, sendo detalhado num capítulo específico.

O ANP é secretado pelos átrios em resposta à distensão, apresentando um tempo de semivida curto e baixa estabilidade plasmática, o que limita a sua aplicabilidade clínica. Por outro lado, o NT-proANP, forma inativa e mais estável do ANP, tem demonstrado maior sensibilidade na deteção de aumentos subtis da pressão de enchimento atrial (Habibullah et al., 1995) e na identificação precoce de ICC (Boswood et al., 2003). Em cães com DMVM, concentrações superiores a 1000 pmol/L foram associadas a um tempo mais curto até ao desenvolvimento de ICC (Eriksson et al., 2014). O NT-proANP apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes às do NT-proBNP para diagnóstico do estadio B2 e exclusão de ICC em cães com dispneia (Ogawa et al., 2021). Estudos recentes também demonstraram uma correlação significativa entre o NT-proANP e a relação AE/Ao ao longo dos diferentes estadios da DMVM, mesmo antes dos critérios diagnósticos do estadio B2 serem atingidos (Chanmongkolpanit et al., 2024).

A cTnI é um biomarcador específico de lesão miocárdica, libertada na circulação em resposta a lesão ou necrose dos cardiomiócitos (van der Laarse, 2002). É uma das subunidades do complexo da troponina, que regula a interação actina-miosina na contração muscular cardíaca. Vários estudos apontam que níveis elevados de cTnI se correlacionam com a DMVM moderada a grave, principalmente quando os sinais clínicos são progressivos (Chan et al., 2019; Ogawa et al., 2021). Apesar da sua menor capacidade discriminatória face aos péptidos natriuréticos na diferenciação entre estadios clínicos, níveis persistentemente elevados estão associados a maior gravidade da doença e aumento das dimensões cardíacas (Chanmongkolpanit et al., 2024; Ljungvall et al., 2010; Ogawa et al., 2021). Curiosamente, um estudo demonstrou que a diminuição da cTnI ao longo do tempo foi correlacionada a um maior risco de morte de causa cardíaca, sugerindo disfunção miocárdica avançada (Chan et al., 2019). Concentrações elevadas de cTnI podem refletir fenómenos subjacentes como fibrose miocárdica, HP ou stresse oxidativo, os quais nem sempre acompanham a dilatação cardíaca ou progressão clínica evidente da DMVM. Adicionalmente, fatores como insuficiência renal, idade avançada e inflamação sistémica também podem contribuir para o aumento dos níveis séricos de cTnI, o que diminui a sua especificidade (Chan et al., 2019; Chanmongkolpanit et al., 2024).

Para além dos biomarcadores cardíacos, a monitorização da função renal é fundamental, sobretudo nos estadios mais avançados da DMVM. A progressão da ICC pode levar ao desenvolvimento da síndrome cardiorrenal, em que a hipoperfusão renal, resultante do baixo débito cardíaco, associada à ativação neuro-hormonal, contribui para o comprometimento da função renal (Rangaswami et al., 2019). Estudos confirmam que quanto mais avançado o estadio da DMVM, maior tende a ser o grau de azotemia (Nicolle et al., 2007). Níveis elevados de ureia (>27 mg/dL), com creatinina dentro dos valores de referência, são frequentes em cães sintomáticos, sugerindo azotemia pré-renal (Nicolle et al., 2007). Em cães sob tratamento diurético, aumentos de ureia e da razão ureia/creatinina associam-se a maior progressão da doença e menor tempo de sobrevivência, reforçando o seu valor como marcadores prognósticos (Brložnik et al., 2023).

Importa salientar que, apesar do seu reconhecido valor diagnóstico, nenhum biomarcador deve ser interpretado de forma isolada. A sua integração com dados ecocardiográficos, clínicos e laboratoriais é fundamental para uma avaliação mais completa e precisa da DMVM, contribuindo para decisões terapêuticas mais informadas e individualizadas (Borgarelli et al., 2021).

3.1.2. Utilidade clínica do NT-proBNP na avaliação e monitorização da DMVM canina

O BNP pertence à família dos péptidos natriuréticos e é sintetizado predominantemente pelos cardiomiócitos ventriculares, em resposta ao estiramento miocárdico associado a sobrecarga de volume ou pressão (Hori et al., 2020). O precursor de BNP, secretado pelos miócitos, é clivado em dois fragmentos: o BNP ativo que promove efeitos fisiológicos, como vasodilatação, natriurese e inibição da fibrose; e o NT-proBNP, biologicamente inativo, porém mais estável e com tempo de semivida prolongado, o que o torna adequado para avaliação laboratorial (Hezzell et al., 2017; Wall et al., 2018).

O NT-proBNP tem-se consolidado como um biomarcador essencial na monitorização da DMVM em cães, com utilidade comprovada no diagnóstico, estadiamento e estratificação de risco (Häggström et al., 2000; Oyama et al., 2009). Em 2021, Ogawa e colaboradores demonstraram a sua elevada capacidade para identificar cães com dilatação cardíaca e ICC (Ogawa et al., 2021). Estudos subsequentes confirmaram que os níveis de NT-proBNP são significativamente mais elevados em cães sintomáticos (estadio C) em comparação com cães assintomáticos (estadio B1 e B2) e com animais controlo. Através da análise da curva ROC, estes autores determinaram que um valor de corte superior a 787,65 pmol/L distinguia cães com e sem ICC (sensibilidade: 78,38%, especificidade: 72,55% e AUC: 0,792) (Chanmongkolpanit et al., 2024). Além disso, este biomarcador mostrou-se útil na diferenciação entre causas cardíacas e respiratórias de dispneia, sobretudo em cães geriátricos. Valores inferiores a 800 pmol/L tornam improvável uma origem cardíaca, enquanto concentrações superiores a 1800 pmol/L são altamente sugestivas de congestão cardíaca (Fine et al., 2008; Oyama et al., 2009).

Os níveis circulantes de NT-proBNP aumentam proporcionalmente à gravidade da doença, refletindo o stresse hemodinâmico e a sobrecarga miocárdica (Ogawa et al., 2021). Um aumento de 100 pmol/L está associado a maior risco de mortalidade por qualquer causa (Moonarmart et al., 2010), e concentrações superiores a 1500 pmol/L estão associadas a maior probabilidade de ICC ou morte de origem cardíaca (Borgarelli et al., 2021), realçando o valor prognóstico deste biomarcador.

Além disso, os níveis plasmáticos de NT-proBNP apresentam uma associação consistente com indicadores de dilatação cardíaca, particularmente com a relação AE/Ao. Embora a sua produção ocorra predominantemente nos ventrículos, a forte correlação com a dilatação atrial sugere uma contribuição do AE para a secreção de BNP, sobretudo nos estádios mais avançadas da doença (Ogawa et al., 2021). Esta associação com a relação AE/Ao pode ser observada mesmo antes de se atingirem os critérios ecocardiográficos que definem o estadio B2, o que reforça a utilidade do NT-proBNP na deteção precoce da remodelação atrial subclínica (Borgarelli et al., 2021; Chanmongkolpanit et al., 2024; Ogawa et al., 2021).

Como marcador complementar à ecocardiografia, o NT-proBNP reflete alterações hemodinâmicas associadas à RM degenerativa primária, apresentando correlação com a dilatação atrial, disfunção ventricular, fibrilhação atrial e HP. Estudos demonstraram que concentrações de NT-proBNP superiores a 407 pg/mL estão associadas a um pior prognóstico, enquanto valores inferiores a 200 pg/mL indicam baixo risco de eventos adversos (Lancellotti et al., 2010; Magne et al., 2012).

A utilidade clínica NT-proBNP torna-se especialmente relevante em contextos nos quais a ecocardiografia não está prontamente acessível (Chanmongkolpanit et al., 2024). Testes laboratoriais, como os da Bionote®, demonstraram elevada sensibilidade na distinção entre cães com ICC (estadio C), cães assintomáticos com cardiomegalia (estadio B2) e cães saudáveis (Riengvirodkij & Sakcamduang, 2021). Além disso, a introdução de testes rápidos revelou resultados consistentes com os obtidos por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) combinando rapidez, fiabilidade e aplicabilidade imediata em ambiente clínico (Ogawa et al., 2021). Nestes cenários, o NT-proBNP mostrou desempenho superior ao da cTnI na diferenciação entre cães com ICC e aqueles com DMVM assintomática ou sem doença cardíaca (Chanmongkolpanit et al., 2024).

Vários valores de corte para o NT-proBNP têm sido propostos na literatura (como 787,65 pmol/L, 1.207 pmol/L ou 1.772 pmol/L); no entanto, ainda não existe consenso quanto ao ponto de corte ideal, sobretudo para a deteção precoce do estadio B2, fase crucial para o início do tratamento médico. Esta variabilidade metodológica dificulta a padronização da sua aplicação clínica e reforça a importância de uma interpretação cautelosa dos resultados, idealmente integrada com outros dados clínicos e ecocardiográficos (Chanmongkolpanit et al., 2024; Ogawa et al., 2021; Wolf et al., 2013).

Do ponto de vista terapêutico, há evidências que indicam que a monitorização sequencial dos níveis de NT-proBNP pode refletir a resposta clínica ao tratamento. Reduções nos seus valores após o início da terapêutica, nomeadamente com diuréticos e pimobendan, associam-se à melhoria clínica e a uma maior sobrevida (Boswood et al., 2018; Hezzell et al., 2018; Wolf et al., 2013), ao passo que aumentos progressivos tendem a indicar agravamento da condição clínica (Oyama & Singletary, 2010). Embora o uso do NT-proBNP como ferramenta para orientar decisões terapêuticas ainda não esteja plenamente estabelecido na prática clínica de rotina, dados preliminares sustentam o seu potencial nessa função, reforçando a importância de mais estudos longitudinais para validação (Chanmongkolpanit et al., 2024; Oyama & Singletary, 2010).

Importa, no entanto, reconhecer que o NT-proBNP apresenta limitações. Fatores como idade, sexo, insuficiência renal, HP, hipertiroidismo e uso de diuréticos podem elevar as suas concentrações, independentemente da função cardíaca (Sjöstrand et al., 2014; Wall et al., 2018). Em cães com azotemia, por exemplo, as concentrações de NT-proBNP tendem a ser significativamente mais elevadas, sendo nestes casos recomendada a avaliação da razão NT-proBNP/creatinina, de forma a aumentar a precisão diagnóstica (Schmidt et al., 2009).

Assim, embora o NT-proBNP represente uma ferramenta valiosa na monitorização e estadiamento da DMVM, a sua interpretação deve ser integrada com dados clínicos e imagiológicos. A combinação entre NT-proBNP, a relação AE/Ao e a velocidade da onda E tem-se destacado como o modelo preditivo mais robusto para eventos como ICC ou morte de origem cardíaca (Borgarelli et al., 2021).

3.2 MicroRNAs como biomarcadores emergentes na Medicina Veterinária

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, com cerca de 21 nucleótidos, que regulam negativamente a expressão génica a nível pós-transcricional (Mercer et al., 2009). Desde a sua descoberta em *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993), os miRNAs tornaram-se reconhecidos como reguladores fundamentais de mais de 60% dos genes codificadores de proteínas nos mamíferos (Friedman et al., 2009; Sayed & Abdellatif, 2011).

Os miRNAs circulam no sangue periférico e fluídos corporais, como saliva e urina (Weber et al., 2010), livres ou associados a proteínas, como argonaute-2, ou encapsulados em vesículas, como exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos (Kamal & Shahidan, 2020). Os miRNAs podem ser libertados passivamente na circulação como consequência de danos teciduais (Turchinovich et al., 2011) ou ativamente por meio de exossomas, permitindo a comunicação intercelular (Asgarpour et al., 2020). Notavelmente, os miRNAs demonstram elevada estabilidade e resistência à degradação, mesmo sob condições adversas, como variações extremas de temperatura, pH e múltiplos ciclos de

congelamento/descongelamento, o que os torna particularmente atrativos como biomarcadores não invasivos (Fiedler et al., 2014; Mitchell et al., 2008).

Os miRNAs podem ser quantificados em células, tecidos e fluidos biológicos, recorrendo a diferentes métodos como extração com fenol-clorofórmio, utilização de esferas magnéticas ou colunas de purificação. Posteriormente, a sua expressão pode ser analisada por diversas técnicas, sendo o PCR em tempo real (qRT-PCR) considerado o método de referência para miRNAs circulantes (Dave et al., 2019).

A biogénese dos miRNAs tem início no núcleo celular, com a transcrição de um miRNA primário pela RNA polimerase II, que é posteriormente processado pelo complexo Drosha-DGCR8, originando um miRNA precursor em estrutura tipo *hairpin*, com cerca de 70 nucleótidos (Lee et al., 2004). Este último é exportado para o citoplasma pela Exportina-5 (Bohnsack et al., 2004), onde sofre uma nova clivagem mediada por *Dicer*, dando origem ao miRNA maduro de cadeia dupla (Hutvagner et al., 2001). A cadeia guia é incorporada no complexo indutor de silenciamento por RNA, onde se associa à argonaute-2 e se liga, preferencialmente, à região 3'-UTR do mRNA alvo (Ha et al., 2014). Dependendo da complementaridade, esta ligação resulta na repressão da tradução ou na degradação do mRNA (Bartel, 2018; O'Brien et al., 2018).

A nomenclatura dos miRNAs segue uma convenção padronizada, sendo geralmente precedida pelo prefixo “miR-”, com exceção da família “let-”, que inclui alguns dos primeiros miRNAs identificados. Após o prefixo, é atribuído um número que corresponde à ordem de descoberta do miRNA. Quando existem variantes com pequenas diferenças na sequência nucleotídica (geralmente de um ou dois nucleótidos), adiciona-se uma letra minúscula ao final do número, como em “miR-208a” e “miR-208b”. Para indicar a espécie de origem, pode ainda ser utilizado um prefixo composto por três ou quatro letras, como “cfa-” para *Canis familiaris* (Bronze-da-Rocha, 2014).

Os miRNAs desempenham um papel central na regulação de diversos processos fisiopatológicos, como a resposta imune e inflamatória, a hematopoiese e o controlo tumoral (Baltimore et al., 2008). No sistema cardiovascular, estão envolvidos na diferenciação, crescimento, contratilidade dos cardiomiócitos e na regulação do ritmo cardíaco (Islas & Moreno-Cuevas, 2018). Atuam em vias moleculares essenciais para a homeostase cardíaca, como a via do TGF- β e da quinase ativada por mitogénio, ambas associadas à fibrose, as vias dependentes de cálcio e de controlo do ciclo celular, relacionadas à hipertrofia, e as vias angiogénicas mediadas pelo fator de crescimento endotelial vascular (Wang & Cai, 2017; Wehbe et al., 2019; Yang et al., 2016). Dessa forma, não surpreende que a desregulação de miRNAs esteja fortemente associada ao desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, incluindo defeitos congénitos, arritmias, doenças valvulares degenerativas e insuficiência cardíaca (Cakmak & Demir, 2020).

3.2.1. Regulação molecular da DMVM: o contributo dos microRNAs

A investigação crescente sobre os miRNAs tem vindo a destacar o seu papel central na fisiopatologia da DMVM. Além de atuarem como reguladores epigenéticos dos processos de remodelação cardíaca, os miRNAs surgem como biomarcadores promissores no diagnóstico precoce, estratificação do risco e monitorização da progressão da doença. Evidências recentes indicam que a expressão dos miRNAs circulantes se altera de forma dinâmica ao longo da evolução da doença, refletindo modificações estruturais e funcionais do coração.

No estudo conduzido por Li *et al.* (2015), foram analisados 277 miRNAs em cães distribuídos por diferentes estadios da doença (A a D, de acordo com a classificação ACVIM), tendo sido identificados 11 miRNAs com expressão diferencial significativa. Nos grupos B1/B2 e C/D, observaram-se quatro miRNAs com expressão aumentada, três dos quais pertencentes à família cfa-let-7/cfa-miR-98, e sete com expressão reduzida, em comparação com o grupo A. Importa salientar que a magnitude das alterações foi proporcional à gravidade clínica, evidenciando uma desregulação progressiva. Estes perfis de expressão sugerem a existência de uma assinatura molecular potencialmente útil para o diagnóstico, estratificação da doença, prognóstico e monitorização terapêutica (Li *et al.*, 2015).

A reforçar esta tendência, Yang *et al.* (2017) identificaram alterações na expressão de ex-miRNAs associados ao envelhecimento (miR-9, miR-495, miR-599), à presença de DMVM (miR-9 e miR-599) e à progressão para ICC (miR-181c e miR-495) (Yang *et al.*, 2017). Num estudo posterior, os mesmos autores analisaram a expressão de miRNAs diretamente nas CIVs de cães com DMVM, tendo observado uma regulação negativa significativa dos miRNAs let-7c, miR-17, miR-20a e miR-30d. Estes miRNAs estão envolvidos em vias moleculares associadas à diferenciação miofibroblástica, senescência e apoptose celular, processos chave na degenerescência valvular mixomatosa, o que destaca o seu potencial como alvos terapêuticos promissores (Yang *et al.*, 2018).

A desregulação dos miRNAs torna-se progressivamente mais acentuada com o avanço da doença. No estudo de Hulanicka *et al.* (2014), a análise comparativa entre cães nos estadios B (assintomáticos) e C (com ICC ligeira a moderada), revelou perfis de expressão distintos, com assinaturas moleculares específicas para cada fase da doença. Destacaram-se, em particular, a regulação negativa do miR-30b no estadio B e do miR-133 no estadio C, reforçando o potencial dos miRNAs como ferramentas de estratificação precisa da DMVM (Hulanicka *et al.*, 2014).

Considerando a elevada predisposição dos CKCS para a DMVM, Lu *et al.* (2015) exploraram possíveis alterações transcriptómicas específicas da raça. Através de microarrays, identificaram alterações na expressão de genes associados à inflamação, remodelação da MEC e migração celular, bem como a presença de 59 famílias de miRNAs caninos (cfa-miRNAs) (Lu *et al.*, 2015).

A análise dos perfis de expressão de miRNAs em raças predispostas à DMVM revelou variações inter-raciais significativas. Um exemplo ilustrativo é o miR-30b, conhecido por inibir o fator de crescimento do tecido conjuntivo, uma proteína profibrótica envolvida na progressão da fibrose valvular (Duisters et al., 2009). Em cães da raça Teckel, este miRNA apresentou regulação negativa no estadios B da doença, ao passo que, em CKCS, foi identificado com regulação positiva no estadios B1, associando-se a parâmetros ecocardiográficos mais favoráveis. Estas diferenças destacam a importância de se considerar o contexto genético e racial na interpretação dos perfis de miRNAs e na sua aplicação como biomarcadores ou alvos terapêuticos (Bagardi et al., 2022; Hulanicka et al., 2014).

Adicionalmente, a expressão diferencial de miRNAs tem permitido identificar padrões moleculares associados à hipertrofia excêntrica do VE induzida pela DMVM. No estudo de Ro *et al.* (2021), o perfil de miRNAs foi comparado entre cães com DMVM (modelo de hipertrofia excêntrica) e com estenose pulmonar (modelo de hipertrofia concêntrica), tendo sido identificados 11 miRNAs diferencialmente expressos. Nos estadios C e D da DMVM, observou-se regulação positiva do miR-130b, acompanhada de uma diminuição significativa de outros miRNAs como miR-30d e let-7b. Esta abordagem comparativa permitiu distinguir miRNAs implicados na remodelação cardíaca em geral daqueles mais especificamente associados à fisiopatologia da DMVM (Ro et al., 2021).

A relevância translacional destes achados é reforçada pelas semelhanças funcionais e histológicas entre a DMVM em cães e o prolapso da válvula mitral em humanos, ambas formas de degeneração mixomatosa que podem culminar em RM e ICC. Em pacientes humanos com prolapso da válvula mitral, Songia *et al.* (2021) identificaram um perfil distinto de miRNAs circulantes, com regulação positiva de miR-140-3p, miR-150-5p, miR-210-3p, miR-451a e miR-487a-3p, e regulação negativa de miR-223-3p, miR-323a-3p, miR-340-5p e miR-361-5p. Embora esses miRNAs ainda não tenham sido diretamente associados à DMVM em cães, os resultados sustentam o paralelismo biológico entre espécies e reforçam o potencial translacional dos miRNAs (Songia et al., 2021).

Em síntese, os miRNAs emergem com ferramentas promissoras para o diagnóstico, estadiamento e monitorização da DMVM, com potencial para identificar indivíduos em risco ainda em fases subclínicas. A convergência entre os dados obtidos em cães e humanos sugere a existência de mecanismos moleculares conservados, sublinhando o papel dos miRNAs não apenas como biomarcadores, mas também como possíveis alvos terapêuticos na doença valvular degenerativa (Songia et al., 2021).

3.3. miR-146a na fisiopatologia cardiovascular: o que sabemos?

O miR-146a é amplamente reconhecido como um regulador pós-transcricional essencial da resposta imune inata, desempenhando um papel central na modulação de vias inflamatórias (Saba et

al., 2014). A sua expressão tem sido implicada em diversos contextos fisiopatológicos, incluindo infecções, doenças autoimunes, reações alérgicas, neoplasias e, de forma crescente, em disfunções cardiovasculares (Gilyazova et al., 2023).

Altamente conservado entre espécies, o miR-146a pertence uma pequena família de miRNAs juntamente com o miR-146b. Embora partilhem elevada homologia na sequência madura, diferindo em apenas dois nucleótidos na extremidade 3', está demonstrado que são regulados de forma independente, o que sugere funções distintas. O miR-146a maduro é codificado pelo gene MIR146A (5q33.3), enquanto o miR-146b deriva do gene MIR146B (10q24.32). Entre as isoformas estudadas, miR-146a-5p é a mais expressa e a mais amplamente investigada (Paterson & Kriegel, 2017).

Embora inicialmente descrito como um regulador da resposta imune inata, o miR-146a tem vindo a destacar-se também como um mediador central da homeostase cardiovascular, sobretudo pelo seu papel na modulação negativa da via inflamatória mediada pelos recetores Toll-like e pelo fator de transcrição nuclear kappa-B (TLR/NF-κB). Esta via, fortemente envolvida na fisiopatologia de várias doenças cardíacas, é regulada através da repressão das proteínas quinase associada ao recetor da interleucina-1 (IRAK1, do inglês *IL-1 receptor- associated kinase 1*) e fator associado ao recetor de TNF 6 (TRAF6, do inglês *TNF receptor- associated factor 6*) conforme demonstrado por Taganov e colaboradores, que identificaram a indução de miR-146a por lipopolissacarídeos em células da linhagem monocítica humana de forma dependente de NF-κB (Taganov et al., 2006).

O envolvimento do miR-146a em diversas doenças cardiovasculares tem sido extensivamente documentado. Na cardiomiopatia induzida por septicémia, Gao *et al.* (2015) demonstraram que o aumento da expressão de miR-146a atenua a disfunção cardíaca, ao suprimir a ativação de NF-κB, por meio da inibição de IRAK1 e TRAF6, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias e a infiltração de células inflamatórias em cardiomiócitos e macrófagos (Gao et al., 2015). Em modelos experimentais de isquemia/reperfusão, a administração de miméticos de miR-146a resultou na redução da área de enfarte, do stresse oxidativo e da fibrose, além de melhorar a função cardíaca, por inibição das vias NF-κB e NADPH oxidase 4/ proteína quinase ativada por mitogénio p38 (Xiao et al., 2021). Adicionalmente, Zhang *et al.* (2019) demonstraram que o miR-146a protege os cardiomiócitos, prevenindo a apoptose por meio da regulação negativa do recetor nuclear 1 mediador (Zhang et al., 2019). Este efeito é amplificado pela ação sinérgica com o microRNA-21, que converge nas vias TRAF6 e da fosfatase e homólogo da tensina/ proteína quinase B, modulando a atividade de p38 e da caspase-3 (Huang et al., 2016).

O miR-146a desempenha um papel relevante na fisiopatologia da aterosclerose, atuando como modulador negativo da inflamação vascular. A sua expressão reduz a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como interleucina-6, fator de necrose tumoral α, quimiocina, metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9), LDL oxidada e moléculas de adesão endotelial. Essa atividade

contribui para limitar o recrutamento de monócitos, a inflamação vascular e a progressão da placa aterosclerótica. Entretanto, os dados clínicos permanecem contraditórios. Enquanto alguns estudos associam níveis elevados de miR-146a à instabilidade da placa e a um maior grau de estenose (Huang et al., 2020), outros destacam o seu papel estabilizador, sugerindo um potencial terapêutico na contenção da progressão da doença aterosclerótica (Ardinal et al., 2024).

Ainda no contexto da aterosclerose, o miR-146a demonstrou promover a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, favorecendo um ambiente anti-inflamatório e reparador, crucial na contenção da lesão vascular e da fibrose (He et al., 2016; Huang et al., 2016). Além disso, está também envolvido na modulação da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, processo que, quando desregulado, contribui para a trombose. A ausência de miR-146a resulta num fenótipo neutrofilico envelhecido e hiperreativo, com formação exacerbada de NETs. Em doentes humanos com fibrilhação atrial, o polimorfismo rs2432697 associa-se à baixa expressão de miR-146a, níveis elevados de elastase e risco aumentado de eventos trombóticos (Arroyo et al., 2018).

No contexto da fibrose miocárdica, o miR-146a apresenta um perfil maioritariamente protetor. Num modelo experimental com ratos diabéticos verificou-se que a redução da expressão de miR-146a está associada a maior inflamação e fibrose cardíaca (Feng et al., 2017). Ao nível molecular, Palomer et al. (2015) demonstraram que o miR-146a inibe a via Fos (fator induzido por osteossarcoma) / proteína ativadora 1 (AP-1), resultando na redução da atividade da MMP-9, enzima essencial na degradação da matriz extracelular e na progressão da fibrose, o que contribui para atenuar a remodelação cardíaca (Palomer et al., 2015).

Apesar de amplamente descrito como protetor, evidências recentes sugerem que, em determinados contextos, o miR-146a pode exercer efeitos deletérios. A sua sobre-expressão suprime o eixo modificador pequeno semelhante à ubiquitina 1/ ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático/endoplasmático tipo 2a, crucial para a homeostase do cálcio, prejudicando a contratilidade dos cardiomiócitos (Oh et al., 2018). A sua inibição, por outro lado, restaurou a função cardíaca e atenuou a remodelação miocárdica, através da regulação positiva da desidrogenase do complexo 2- oxoglutarato mitocondrial, em modelos de hipertrofia, e da modulação de vias intracelulares pró-remodeladores, como a proteína quinase B e a proteína quinase regulada por sinal extracelular, em modelos de enfarte do miocárdico (He et al., 2019; Heggermont et al., 2017). Adicionalmente, níveis plasmáticos elevados de miR-146a, em conjunto com microRNA-21, associam-se à remodelação ventricular adversa após enfarte, sugerindo um valor prognóstico negativo (Liu, et al., 2015).

O miR-146a assume, assim, um papel complexo na fisiopatologia cardiovascular. A sua capacidade de modular processos como inflamação, fibrose, apoptose e remodelação cardíaca destaca-o como alvo terapêutico e biomarcador promissor. No entanto, os seus efeitos dependem do

tipo celular, do estadio da doença e do contexto inflamatório, o que reforça a necessidade de abordagens clínicas individualizadas para a sua aplicação segura e eficaz.

3.3.1. O miR-146a como potencial biomarcador na DMVM

Apesar da ausência de estudos que explorem diretamente o papel do miR-146a na DMVM, a análise crítica da literatura permite antecipar a sua possível relevância na fisiopatologia da doença. O estudo de Piantedosi *et al.* (2022) assume particular relevância ao demonstrar a existência de um microambiente inflamatório ativo no tecido valvular de cães com DMVM, marcado por infiltração de células inflamatórias e expressão aumentada de interleucina-6, fator de necrose tumoral α e interleucina-1 beta (Piantedosi *et al.*, 2022). Estes dados reforçam a hipótese de que a inflamação desempenha um papel mais relevante na DMVM do que anteriormente se admitia, abrindo espaço para a consideração de moduladores endógenos da via inflamatória, como o miR-146a.

Reconhecido como regulador negativo da via TLR/NF- κ B, o miR-146a exerce a sua ação inibitória por meio da supressão direta dos adaptadores IRAK1 e TRAF6, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Taganov *et al.*, 2006). Este mecanismo, amplamente descrito em modelos de septicemia, isquemia/reperfusão e fibrose cardíaca, poderá ser igualmente relevante na DMVM, ao limitar o recrutamento celular e a ativação inflamatória das CEVs. Além disso, o miR-146a regula negativamente o gene FOS, um componente essencial do complexo de transcrição AP-1. A inibição da via Fos/AP-1 reduz a expressão de MMP-9, mas também está associada à diminuição de mediadores-chave da fibrose e remodelação cardíaca, incluindo TGF- β 1, colagénio tipo I e IV, fibronectina, actina α do músculo liso e a endotelina-1 (ET-1) (Palomer *et al.*, 2015).

A ET-1, em particular, assume relevância na fisiopatologia valvular, sendo produzida pelas CEVs em resposta a estímulos inflamatórios e mecânicos. A ET-1 atua de forma parácrina na ativação das CIVs, promovendo a sua diferenciação em miofibroblastos (Oyama, 2009). Assim, ao modular negativamente o eixo AP-1/ET-1/TGF- β 1, o miR-146a pode contribuir para limitar a progressão da doença valvular. Além disso, o miR-146a tem sido implicado na polarização de macrófagos para o fenótipo M2, associado a um perfil anti-inflamatório e reparador, e na inibição da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos. Estes mecanismos, ao contribuírem para a resolução da inflamação e redução do stresse imunológico local, podem atenuar a progressão da doença (He *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016).

Outro ponto chave é a relação entre células T e miR-146a. A literatura sugere que o miR-146a regula a maturação de células T, pela via TRAF 6-NF- κ B, controlando, assim, a resposta inflamatória aguda e crónica (Arroyo *et al.*, 2021). No estudo de Piantedosi *et al.* (2022) observou-se um aumento significativo de células T reguladoras em cães com DMVM nos estadios mais avançados, sugerindo uma resposta compensatória à inflamação. Assim, a disfunção do miR-146a pode comprometer a

regulação imunológica mediada por células T, contribuindo para o ambiente inflamatório crônico e a progressão da doença valvular (Piantedosi et al., 2022).

A DMVM não se restringe à degenerescência valvular, estendendo-se a alterações estruturais progressivas no miocárdio, que contribuem diretamente para a evolução clínica da doença. Evidências experimentais indicam um papel ativo do miR-146a nesse processo. A sua sobre-expressão tem sido associada à intensificação da remodelação cardíaca, com agravamento da disfunção ventricular e dilatação das câmaras cardíacas. Por outro lado, a inibição do miR-146a revelou efeitos protetores consistentes, incluindo reversão parcial da disfunção sistólica, melhoria dos parâmetros hemodinâmicos e redução da fibrose intersticial (He et al., 2019; Heggermont et al., 2017; Oh et al., 2018). Estes dados reforçam a hipótese de que o miR-146a atua não apenas nos mecanismos inflamatórios e valvulares, mas também na remodelação miocárdica associada à progressão da DMVM, sugerindo o seu potencial como biomarcador de remodelação e de prognóstico nesta doença.

Em suma, considerando o papel chave que o miR-146a desempenha na modulação da inflamação, fibrose e remodelação em diversos contextos cardiovasculares, é razoável propor que este miRNA possa participar, direta ou indiretamente, na regulação dos mecanismos moleculares que sustentam a progressão da DMVM. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre os níveis plasmáticos de expressão do miR-146a e as características clínicas da DMVM em cães, com o intuito de avaliar o seu potencial valor diagnóstico, bem como a sua correlação com os níveis de NT-proBNP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição do estudo

Um total de 60 cães, de ambos os sexos, foi recrutado no HVP e no Hospital Veterinário UPVET do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto (ICBAS-UP), entre novembro de 2020 e abril de 2023, para a realização deste estudo prospetivo. A participação foi autorizada mediante a obtenção de consentimento informado e escrito por parte dos tutores, permitindo a inclusão dos animais no estudo e a colheita de amostras sanguíneas para fins de investigação.

Para cada cão, foi recolhido o processo clínico completo, incluindo dados clínicos, laboratoriais e imagiológicos. Todos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica completa, composta por anamnese detalhada com registo de sinais clínicos, exame físico, ecocardiografia, hemograma, bioquímica sérica (ureia e creatinina), eletrocardiograma e medição da pressão arterial sistémica. Com base na avaliação ecocardiográfica e segundo os critérios estabelecidos pelo ACVIM (Keene et al., 2019), os cães foram classificados em quatro grupos clínicos: grupo controlo (n=10), constituído por cães sem alterações clínicas ou ecocardiográficas compatíveis com doença cardíaca; estadio B1 (n=21), correspondente a cães com sopro cardíaco, mas sem evidência de cardiomegalia ou sinais clínicos; estadio B2 (n=16), composto por cães com sopro cardíaco e evidência de cardiomegalia, mas clinicamente assintomáticos; e estadio C (n=13), que incluiu cães com sinais clínicos compatíveis com ICC. Embora o estadio A inclua cães com risco aumentado de desenvolver doença cardíaca, mas sem alterações estruturais cardíacas identificáveis, neste estudo esses animais foram incluídos no grupo controlo. Adicionalmente, os cães com DMVM foram classificados em subgrupos com base na presença ou ausência de dilatação do AE e/ou do VE, originando seis perfis morfológicos distintos: AE normal (n=22), AE dilatado (AED) (n=28), VE normal (n=20), VE dilatado (VED) (n=30), ambas as câmaras com dimensões normais (n=18), e ambas dilatadas (AED+VED) (n=26).

Foram colhidas amostras de sangue para a quantificação dos biomarcadores em estudo e para as análises hematológicas e bioquímicas. Os níveis plasmáticos de NT-proBNP foram determinados num grupo mais restrito de cães (grupo controlo, n=5; estadio B1, n=7; estadio B2, n=8; estadio C, n=4) e a expressão de miR-146a foi avaliada em todos os cães, através da extração de RNA total, seguida de transcrição reversa e quantificação qRT-PCR.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para o grupo controlo foram ausência de sinais clínicos sistémicos e relatório ecocardiográfico dentro dos parâmetros de normalidade. No grupo com DMVM, os critérios

de inclusão implicaram o diagnóstico confirmado da doença com base nas alterações ecocardiográficas compatíveis, classificadas segundo as diretrizes do ACVIM (Keene et al., 2019).

Foram excluídos deste estudo cães com doenças sistêmicas concomitantes significativas, como doenças renais, hepáticas, hormonais, inflamatórias ou neoplasias, que pudessem interferir com os valores dos biomarcadores estudados, com base no histórico médico, exame clínico e resultados laboratoriais. Foram também excluídos os cães com qualquer doença cardíaca congênita ou adquirida, além da DMVM, diagnosticada por ecocardiografia.

4.3 Colheita e processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular utilizando uma seringa de 5 mL e uma agulha de calibre 23G ou 25G, consoante o diâmetro da veia de cada animal. Um mililitro foi transferido para um tubo com heparina, destinado às análises bioquímicas (ureia e creatinina), enquanto os restantes mililitros foram distribuídos por quatro tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O tubo com heparina foi imediatamente enviado para análise bioquímica, e um dos tubos com EDTA foi utilizado para a realização do hemograma. Os restantes tubos com EDTA destinaram-se à obtenção de plasma para análise de miR-146a e NT-proBNP. Para tal, o plasma foi separado por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos, imediatamente após a colheita. Em seguida, foram alíquotados, para cada cão, no mínimo 250 µL de plasma em quatro criotubos, os quais foram armazenados a -80 °C até à análise. A quantificação dos níveis plasmáticos de NT-proBNP foi realizada pelo laboratório de referência IDEXX, através do Cardiopet® proBNP, um imunoensaio quantitativo de segunda geração baseado na técnica de ELISA. O procedimento de quantificação do miR-146a é descrito na secção seguinte.

4.4 Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o Kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante e seguindo cuidados rigorosos para evitar contaminação por ribonucleases (RNases). Após descongelação lenta das amostras em gelo, 100 µL de plasma foram incubados com 500 µL de QIAzol, durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 3,5 µL do controlo interno cel-miR-39 ($1,6 \times 10^8$ cópias/µL); este controlo exógeno, um mimético do miRNA *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39), foi utilizado como normalizador interno da expressão de miRNAs no plasma. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de clorofórmio à mistura, seguida de agitação em vórtex por, no mínimo, 15 segundos, e incubação à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$, a 4 °C, durante 15 minutos, originando três fases: a fase aquosa superior (incolor), contendo o RNA; a

interfase (branca), contendo DNA e proteínas; e a fase orgânica inferior (rosada), contendo principalmente proteínas. Para cada amostra, a fase aquosa superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de recolha e misturada com 450 µL de etanol a 100%, promovendo as condições ideais para a ligação de moléculas de RNA com 18 nucleótidos ou mais. Em seguida, a mistura foi aplicada às colunas de centrifugação RNeasy MinElute, fornecidas pelo kit, onde o RNA total se adsorve à membrana da coluna. A purificação foi realizada através de lavagens sequenciais com os reagentes RWT, RPE e etanol a 80%, todos fornecidos pelo fabricante. Após as lavagens, as colunas foram centrifugadas à velocidade máxima, com as tampas abertas, para garantir a secagem completa das membranas. Posteriormente, o RNA foi eluído com a adição de 14 µL de água livre de RNase no centro da membrana de cada coluna, seguido de centrifugação à velocidade máxima durante 1 minuto, resultando num volume final de aproximadamente 12 µL de RNA total por amostra. As amostras eluídas foram então armazenadas a -80 °C até à sua utilização em análises subsequentes.

4.5 Síntese de cDNA e qRT-PCR

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e um termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Inicialmente, os componentes do kit e as amostras de RNA total foram descongelados em gelo. Neste protocolo, o cDNA é sintetizado de forma específica para cada primer de transcrição reversa adicionado; por isso, cada amostra de cão foi utilizada separadamente para a deteção do miR-146a e do controlo exógeno cel-miR-39. Para cada reação de RT, foram misturados 7 µL de master mix, 5 µL de RNA total e 3 µL do primer específico 5× RT (hsa-miR-146a ou cel-miR-39). O master mix foi previamente preparado com 0,15 µL de dNTPs (100 mM com dTTP), 1,0 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1,5 µL de tampão 10× RT, 0,19 µL de inibidor de RNase (20 U/µL) e 4,16 µL de água livre de nucleases. Como controlo negativo, foi preparada uma reação substituindo a amostra de RNA por água livre de nucleases. As misturas foram mantidas em gelo durante 5 minutos antes de serem transferidas para o termociclador. As condições de transcrição reversa foram as seguintes: 16 °C durante 30 minutos, seguido de 42 °C durante 30 minutos, 85 °C durante 5 minutos, e manutenção a 4 °C até à remoção das amostras. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até à realização das reações de PCR quantitativo.

A quantificação dos níveis de miR-146a foi realizada por PCR em tempo real com transcrição reversa (qRT-PCR), utilizando o ensaio TaqMan® MicroRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com *primers* específicos para o miR-146a e cel-miR-39, num sistema *PikoReal 96* (Thermo Fisher Scientific). Cada reação, realizada em duplicado, incluiu cDNA, master mix, primer e água, totalizando 20 µL. O protocolo de amplificação consistiu em: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos

de amplificação com 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 60 segundos. Foram incluídos dois controles negativos: um referente à transcrição reversa (se RNA) e outro contendo apenas água.

A análise dos dados de qRT-PCR foi efetuada utilizando o método comparativo do ciclo limiar ($2^{-\Delta Ct}$), sendo a expressão relativa do miR-146a determinada por comparação com os valores do controle exógeno cel-miR-39.

4.6 Avaliação ecocardiográfica e parâmetros utilizados na classificação da DMVM

Todos os cães incluídos no estudo foram submetidos a exame ecocardiográfico em ambiente calmo e controlado, sendo posicionados em decúbito lateral direito e, posteriormente, em decúbito lateral esquerdo, para obtenção das diferentes janelas cardíacas adequadas. Os exames ecocardiográficos foram realizados por três ecocardiografistas experientes seguindo protocolos uniformes e padronizados de aquisição e medição, segundo as diretrizes do ACVIM (Keene et al., 2019). Foram utilizados o modo B, modo M bem como Doppler pulsado, contínuo e colorido, para avaliação morfológica e funcional das estruturas cardíacas.

A janela paraesternal direita em eixo longo permitiu a análise morfológica da válvula mitral, avaliando espessamento, prolapso e coaptação das cúspides. O Doppler colorido foi utilizado para detetar e avaliar qualitativamente a RM. O plano em eixo curto possibilitou a medição dos diâmetros do AE e da Ao na base cardíaca, durante o início da diástole, para cálculo do razão AE/Ao. Considerou-se indicativa de dilatação do AE valores iguais ou superiores a 1,6. Ainda nesta janela, ao nível dos músculos papilares, foi medido o diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd) sendo o valor normalizado ao peso corporal (DIVEdN = DIVEd (cm)/peso corporal (Kg) 0,294). Valores de DIVEdN $\geq 1,7$ foram interpretados como indicativos de remodelação ventricular com hipertrofia excêntrica. A avaliação da função sistólica foi realizada com base na fração de encurtamento, fração de ejeção, calculada através do método de Simpson em modo B, e na contratilidade miocárdica observada subjetivamente. Na janela apical esquerda, a RM foi caracterizada com maior precisão, permitindo o alinhamento ótimo do jato regurgitante. Com recurso ao Doppler colorido e espectral, foi determinada a velocidade do jato regurgitante e calculado o gradiente de pressão pela fórmula $4 \times v^2$. A gravidade da RM foi classificada pela proporção do jato em relação à área do AE: ligeira (<30%), moderada (30–70%) e grave (>70%).

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software IBM SPSS Statistics (versão 30.0) e Python (versão 3.13). A normalidade das variáveis numéricas foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. Sempre que os dados não apresentaram distribuição normal em pelo menos um dos grupos,

foram aplicados testes não paramétricos, de forma a garantir a robustez dos resultados. Os resultados são apresentados como médias $\pm$ desvios-padrão para variáveis com distribuição normal e como medianas com intervalos interquartis (IQR) para variáveis com distribuição anormal.

As comparações entre mais de dois grupos foram efetuadas com o teste de Kruskal-Wallis, e, quando significativas, foram seguidas por análises de comparações múltiplas por pares através do teste de Mann-Whitney U. Para variáveis contínuas com distribuição normal e variância homogénea, foi utilizado o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey.

As correlações entre variáveis contínuas foram avaliadas com o coeficiente de correlação de Spearman. Para a análise da capacidade discriminatória dos biomarcadores miR-146a e NT-proBNP em diferentes contextos clínicos, foram construídas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), calculando-se a área sob a curva (AUC), sensibilidade, especificidade e valor de corte ótimo com base no índice de Youden. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

4.8 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo ORBEA (Organismo Responsável pelo Bem-Estar Animal) do ICBAS-UP, em conformidade com a legislação Portuguesa (Lei n.º 92/1995).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

Dos 60 cães avaliados, 10 (16,7%) eram clinicamente saudáveis e 50 (83,3 %) apresentavam diagnóstico de DMVM. Entre os cães com DMVM, 21 (42,0%) foram classificados no estadió B1, 16 (32%) no estadió B2 e 13 (26%) no estadió C, de acordo com a classificação do ACVIM. A amostra foi composta por 34 machos, dos quais eram 16 castrados e 26 fêmeas, incluindo 6 esterilizadas.

A mediana da idade na população global foi de 11 anos (percentil 25- percentil 75: 9,00 – 13,00) e a mediana do peso corporal foi de 9,1 Kg (5,99 – 16,34). Não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ou subgrupos em relação à idade, peso corporal ou distribuição por sexo ($p>0,05$) (figura 3). As características demográficas dos diferentes grupos encontram-se resumidas na tabela 1.

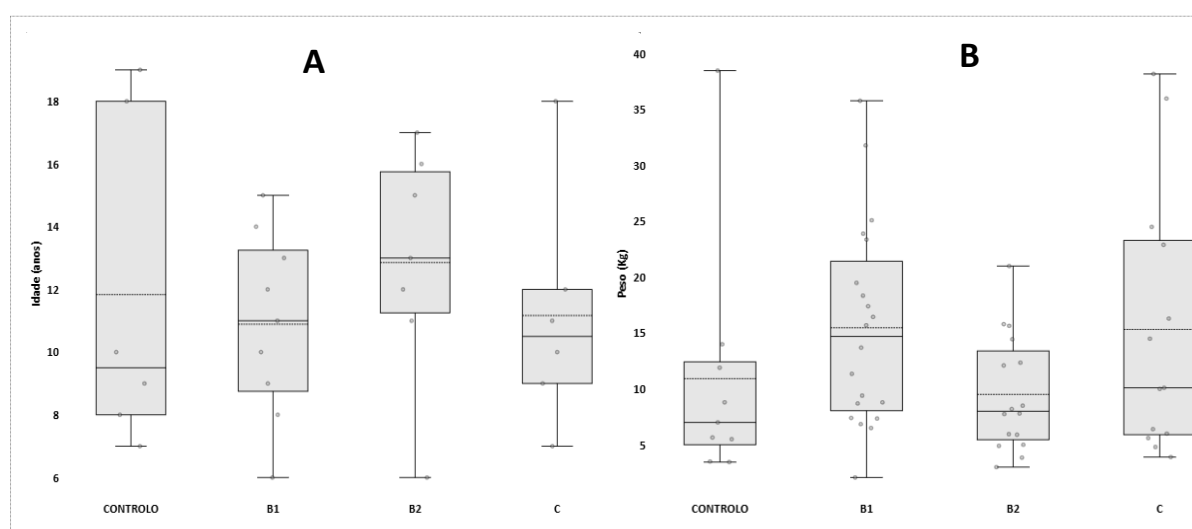


Figura 3. Distribuição da idade (A) e do peso corporal (B) dos cães nos diferentes grupos clínicos, de acordo com classificação ACVIM (controle, B1, B2 e C).

Os valores são apresentados sob a forma de boxplot, representando a mediana (linha horizontal), intervalo interquartil (caixa), valores individuais (pontos) e valores extremos (bigodes). Controlo (n=10); B1 (n=21); B2 (n=16); C (n=13). ACVIM: Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária; Kg: quilograma. $p>0,05$.

Tabela 1. Caracterização demográfica da população de cães incluída no estudo.

Grupos	Nº de cães	Sexo (M/F)	Estadio ACVIM (B1/B2/C)	Idade (anos)	Peso corporal (Kg)
Controlo	10	7/3	-	9,00 (8,00-12,00)	6,33 (3,50-12,43)
B1	21	10/11	-	12,00 (8,50-13,50)	13,70 (7,38- 21,44)
B2	16	9/7	-	12,50 (12,00-14,50)	8,00 (5,23-13,93)
C	13	8/5	-	10,00 (9,50-11,50)	10,10 (5,80-23,70)
AE Normal	22	10/12	21/1/0	12,50 (8,75-13,25)	14,70 (7,39-20,47)
AE Dilatado	28	17/11	0/15/13	12,00 (10,00-13,00)	8,35 (5,68-15,36)
VE Normal	20	10/10	18/1/1	13,00 (9,50-15,00)	9,10 (6,59-17,88)
VE Dilatado	30	17/13	4/14/12	11,50 (10,00-13,00)	11,10 (5,99-18,30)
AE+ VE Normais	18	8/10	18/0/0	12,50 (8,75-14,25)	10,38 (7,23-18,64)
AE + VE Dilatados	26	15/11	0/14/12	11,50 (10,00-12,25)	9,25 (5,94-15,81)

Os valores são apresentados como mediana (percentil 25- percentil 75). AE: átrio esquerdo; VE: ventrículo esquerdo; DMVM: doença mixomatosa da válvula mitral; ACVIM: Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária; M/F: número de machos / número de fêmeas; Kg: quilograma. $p > 0,05$.

A amostra incluiu uma ampla variedade de raças, predominando os cães sem raça definida (50%) e raças de pequeno porte, como o Yorkshire Terrier, Pug e Shih-Tzu. Não foi identificada associação estatisticamente significativa entre a raça e estadio clínico, sendo as raças distribuídas de forma uniforme entre os grupos.

5.2 Parâmetros ecocardiográficos

A análise dos parâmetros ecocardiográficos revelou padrões consistentes de progressão estrutural entre os grupos avaliados. Os índices AE/Ao e DIVEdN apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,001$), com valores superiores nos grupos B2 e C em comparação com aos grupos controlo e B1. O grupo B1 não diferiu significativamente do grupo controlo em nenhum dos dois índices ($p > 0,05$). Embora o grupo C, tenha apresentado valores numericamente superiores aos do grupo B2, não se observaram diferenças estatisticamente significativa no índice DIVEdN entre estes dois grupos ($p > 0,05$) (figura 4 e tabela 2).

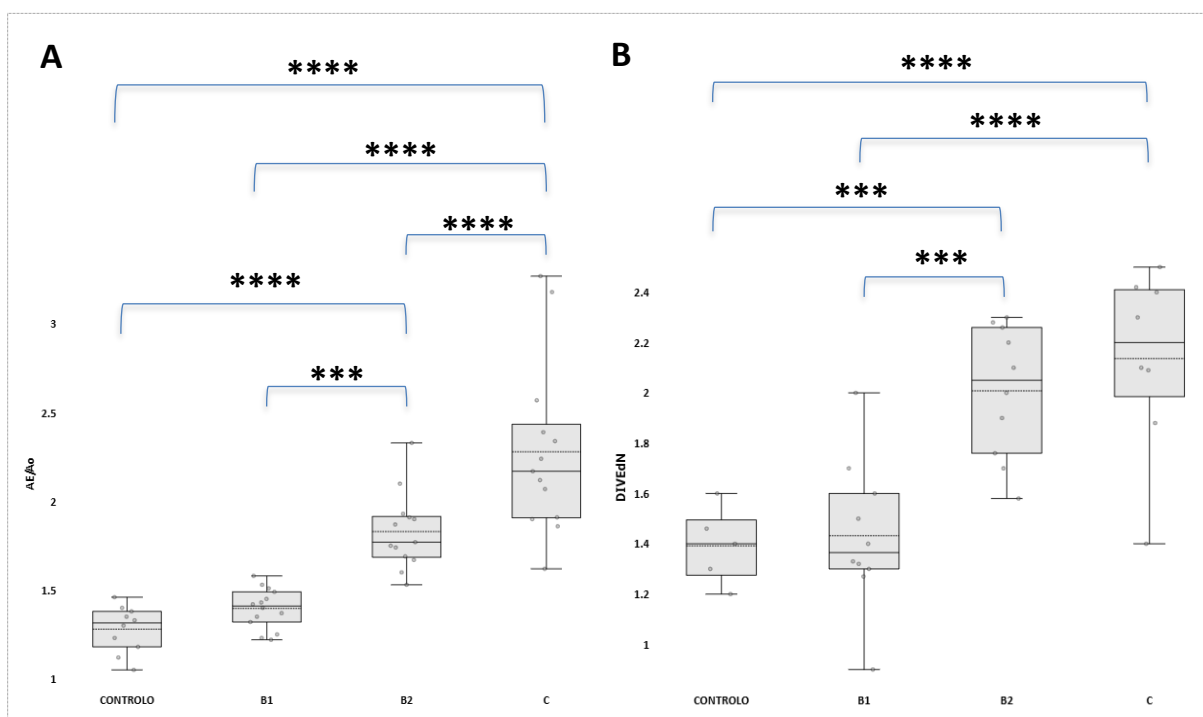


Figura 4. Distribuição dos parâmetros ecocardiográficos, AE/Ao (A) e DIVEdN (B), nos diferentes grupos (controlo, B1, B2 e C).

Os valores são apresentados sob a forma de boxplot, representando a mediana (linha horizontal), intervalo interquartil (caixa), valores individuais (pontos) e valores extremos (bigodes). Controlo (n=10); B1 (n=21); B2 (n=16); C (n=13). AE/Ao: relação átrio esquerdo/aorta; DIVEdN: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado ao peso corporal; ACVIM: Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária. $p > 0,05$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Quando analisados os subgrupos, com base na presença de dilatação, ambos os índices AE/Ao e DIVEdN apresentaram medianas significativamente mais elevadas nos grupos com dilatação do AE, do VE, ou de ambas as câmaras (AE+VE), em comparação com os respetivos grupos sem dilatação ($p < 0,001$). Estes resultados confirmam uma associação estatisticamente significativa entre a presença de dilatação cardíaca e o aumento destes índices ecocardiográficos (tabela 2). Em contrapartida, os parâmetros relacionados à RM e regurgitação tricúspide, incluindo as velocidades dos jatos regurgitantes e os gradientes de pressão estimados, não apresentaram diferenças estatisticamente

significativas entre os grupos ($p > 0,05$), mesmo nas comparações entre animais com e sem dilatação cardíaca (tabela 2).

Estes resultados indicam que, nesta amostra, os índices AE/Ao e DIVEdN foram mais sensíveis na detecção de alterações estruturais cardíacas do que os parâmetros ecocardiográficos associados à regurgitação valvular.

Tabela 2. Distribuição dos principais parâmetros ecocardiográficos nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	AE/Ao	DIVEdN	VRM (m/s)	gradRM (mmHg)	VRT (m/s)	gradRT (mmHg)
Controlo	10	1,32 (1,19-1,37)	1,40 (1,33-1,57)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
B1	21	1,42 (1,35-1,49)	1,50 (1,40-1,60)	5,36 (0,00-5,69)	114,8 (0,00-130,12)	0,97 (0,00-2,52)	3,8 (0,00-25,40)
B2	16	1,75 (1,69-1,90)	2,00 (1,87-2,22)	5,15 (3,44-5,97)	106,9 (48,23-142,55)	2,72 (1,33-3,17)	29,7 (7,05-40,10)
C	13	2,17 (1,91-2,39)	2,10 (2,10-2,40)	5,23 (4,53-5,60)	109,3 (82,10-125,40)	1,67 (0,00-2,96)	11,2 (0,00-35,00)
AE Normal	22	1,42 (1,36-1,51)	1,50 (1,40-1,60)	5,31 (0,00-5,69)	112,95 (0,00-129,69)	0,49 (0,00-2,46)	1,9 (0,00-24,17)
AE Dilatado	28	1,9 [‡] (1,75-2,19)	2,10 [‡] (1,90-2,30)	5,36 (4,13-5,91)	114,95 (68,10-139,67)	2,63 (0,00-3,17)	27,7 (0,00-40,10)
VE Normal	20	1,43 (1,37-1,53)	1,45 (1,38-1,60)	5,31 (2,66-5,63)	112,95 (37,65-126,40)	1,13 (0,00-2,60)	5,20 (0,00-27,05)
VE Dilatado	30	1,89 [‡] (1,70-2,16)	2,10 [‡] (1,90-2,30)	5,36 (3,82-6,03)	114,95 (58,45-145,45)	2,45 (0,00-3,20)	24,0 (0,00-41,00)
AE+ VE Normais	18	1,42 (1,37-1,50)	1,45 (1,35-1,60)	5,31 (0,89-5,66)	112,95 (12,55-127,73)	0,49 (0,00-2,46)	1,9 (0,00-24,17)
AE + VE Dilatados	26	1,90 [‡] (1,75-2,22)	2,10 [‡] (2,00-2,30)	5,36 (4,15-5,93)	114,95 (68,98-140,63)	2,63 (0,00-3,20)	27,7 (0,00 -41,00)

Os valores são apresentados como mediana (percentil 25- percentil 75). AE: Átrio esquerdo, VE: Ventrículo esquerdo, AE/Ao: relação átrio esquerdo/aorta; DIVEdN: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado ao peso corporal; VRM: velocidade de regurgitação mitral; gradRM: gradiente de pressão mitral, VRT: velocidade de regurgitação tricúspide, gradRT: gradiente de pressão tricúspide, m/s: metros por segundo, mmHg: milímetros de mercúrio.

[‡] Diferença estatisticamente significativa em relação ao respetivo grupo sem dilatação ($p < 0,001$).

5.3 Expressão relativa do miR-146a ($2^{-\Delta Ct}$)

A quantificação da expressão do miR-146a foi realizada com base na metodologia de normalização relativa, recorrendo ao cálculo de $2^{-\Delta Ct}$, em que ΔCt representa a diferença entre o ciclo limiar (Ct) do miRNA alvo (miR-146a) e o Ct do gene de referência (cel-miR-39). Esta abordagem permite controlar variações técnicas na extração e na amplificação, garantindo maior fiabilidade e comparabilidade entre amostras. Assim, os valores obtidos refletem a expressão relativa do miR-146a, ajustada à variabilidade experimental inerente à técnica de qRT-PCR.

A expressão relativa de miR-146a, avaliada pelo método $2^{-\Delta Ct}$, revelou diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos ($p < 0,01$). Observou-se um aumento progressivo da mediana da expressão de miR-146a com o avanço da doença. A análise entre grupos demonstrou que os cães do estadio C apresentaram níveis significativamente mais elevados de miR-146a em comparação com o estadio B1 ($p < 0,01$). Adicionalmente, os cães sintomáticos (estadio C) apresentaram expressão significativamente superior à dos grupos assintomáticos (estadio B1 e B2) ($p = 0,005$) (figura 5).

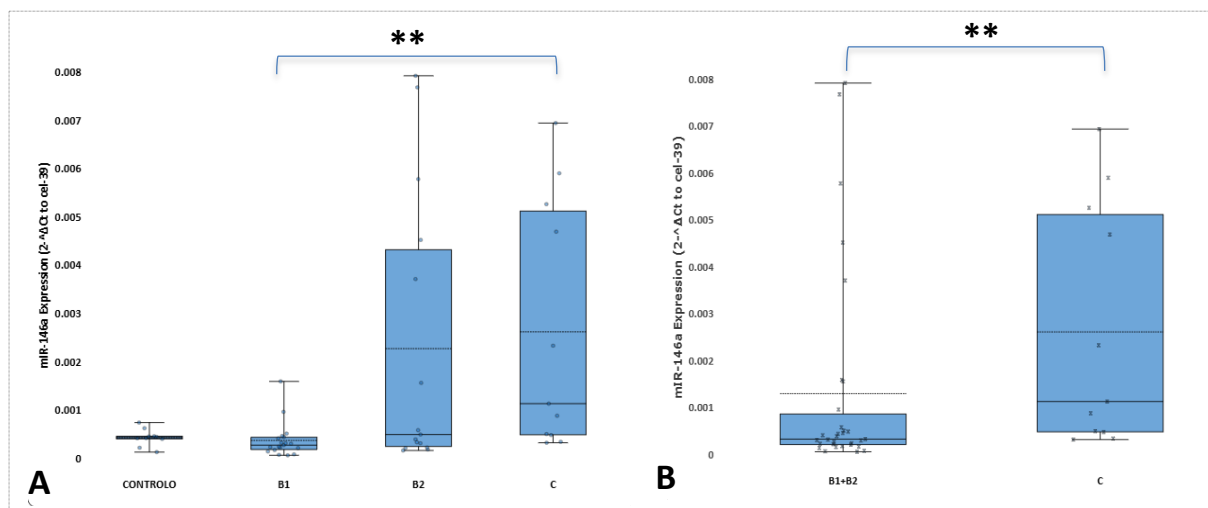


Figura 5. Expressão relativa de miR-146a nos diferentes grupos em estudo (controlo, B1, B2 e C) (A) e comparação da expressão de miR-146a entre cães assintomáticos (estádios B1 e B2) e sintomáticos (estadio C) (B). Os valores são apresentados sob a forma de boxplot, representando a mediana (linha horizontal), intervalo interquartil (caixa), valores individuais (pontos) e valores extremos (bigodes). Controlo ($n=10$); B1 ($n=21$); B2 ($n=16$); C ($n=13$); B1+B2 ($n=37$). $2^{-\Delta Ct}$: Expressão relativa de miR-146a em relação ao controlo exógeno (cel-miR-39). ** $p < 0,01$.

A análise de correlação entre a expressão relativa de miRNA e os parâmetros ecocardiográficos revelou uma associação positiva fraca, mas estatisticamente significativa, entre os níveis plasmáticos de miR-146a e a relação AE/Ao ($r = 0,30$; $p = 0,02$), bem como o DIVEdN ($r = 0,24$; $p = 0,007$). Estes resultados indicam uma tendência de aumento da expressão de miR-146a com o grau de dilatação das câmaras esquerdas, particularmente em relação à dilatação do AE (figura 6).

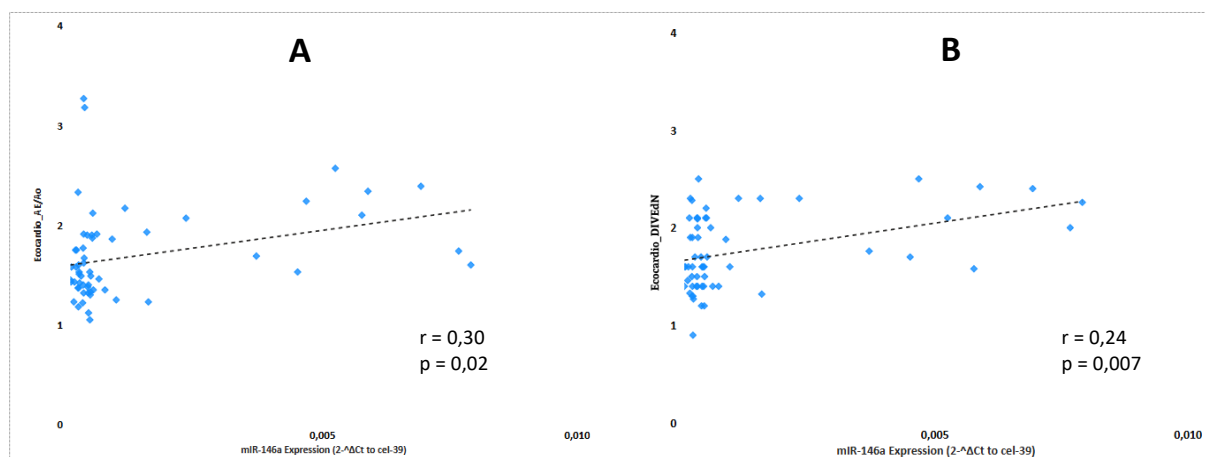


Figura 6. Regressão linear da expressão relativa de miR-146a ($2^{-\Delta Ct}$) em função dos índices ecocardiográficos (AE/Ao (A) e DIVEdN (B)) em cães com DMVM.

Cada ponto representa um animal. A (n=60). B (n=60). AE/Ao: relação átrio esquerdo/aorta; DIVEdN: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado ao peso corporal; DMVM: doença mixomatosa da válvula mitral; r: correlação de Spearman. $p = 0,02$; $p = 0,007$.

A expressão plasmática de miR-146a foi significativamente superior nos grupos com dilatação cardíaca, em comparação com os respectivos grupos sem dilatação ($p < 0,01$ em todas as comparações) (figura 7).

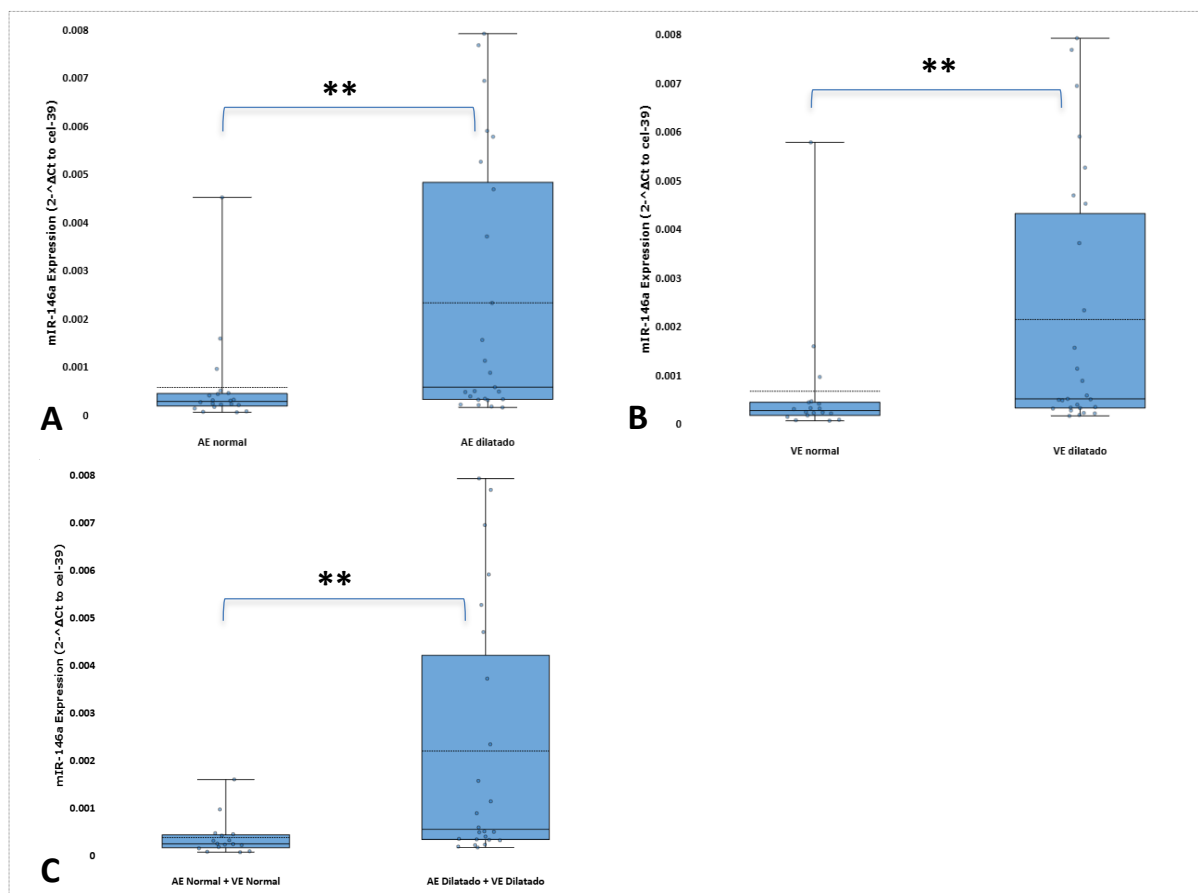


Figura 7. Distribuição dos níveis plasmáticos de miR-146a ($2^{-\Delta Ct}$) em cães agrupados consoante com a presença ou ausência de dilatação do AE (A), do VE (B) e de ambas as câmaras (AE + VE) (C).

Os valores são apresentados sob a forma de boxplot, representando a mediana (linha horizontal), intervalo interquartil (caixa), valores individuais (pontos) e valores extremos (bigodes). AE normal (n=22); AE dilatado (n=28); VE normal (n=20); VE dilatado (n=30); AE+VE normais (n=18); AE+VE dilatados (n=26). AE: átrio esquerdo; VE: ventrículo esquerdo; $2^{-\Delta Ct}$: Expressão relativa de miR-146a em relação ao controlo exógeno (cel-miR-39). **p< 0,01.

5.4 Análise comparativa entre o miR-146a e NT-proBNP

Os níveis plasmáticos de ambos os biomarcadores, miR-146a e NT-proBNP, aumentaram progressivamente com a gravidade da doença, sendo significativamente mais elevados no estadio C do que no estadio B1 (miR-146a: p< 0,01; NT-proBNP: p< 0,05) (figura 8).

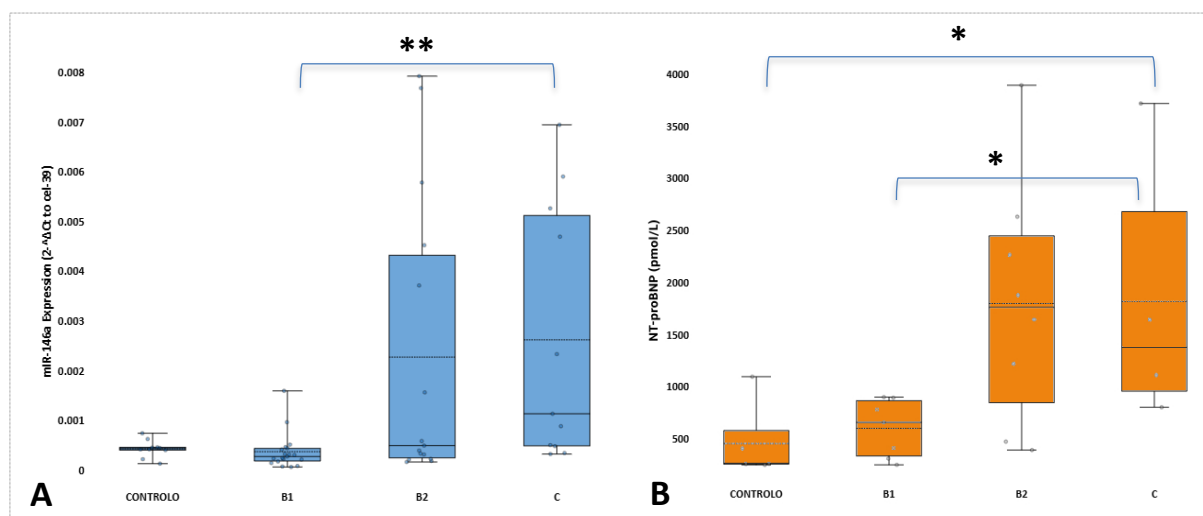


Figura 8. Expressão do miR-146a (A) e concentrações plasmáticas de NT-proBNP (B) ao longo dos estádios da DMVM, segundo classificação do ACVIM (Controlo, B1, B2 e C).

Os valores são apresentados sob a forma de boxplot, representando a mediana (linha horizontal), intervalo interquartil (caixa), valores individuais (pontos) e valores extremos (bigodes). (A) Controlo (n=10); B1 (n=21); B2 (n=16); C (n=13). (B) Controlo (n=5); B1 (n=7); B2 (n=8); C (n=4). $2^{-\Delta Ct}$: Expressão relativa de miR-146a em relação ao controlo exógeno (cel-miR-39); ACVIM: Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária; DMVM: doença mixomatosa da válvula mitral; miR-146a: microRNA-146a; NT-proBNP: fragmento N-terminal péptido natriurético do tipo B. *p < 0,05; **p < 0,01.

A análise das curvas ROC permitiu comparar a capacidade discriminatória do miR-146a e do NT-proBNP na diferenciação entre cães saudáveis (grupo controlo) e cães com DMVM (estádios B1, B2 e C). O NT-proBNP apresentou uma AUC de 0,84, demonstrando bom desempenho na identificação de animais doentes. Em contraste, o miR-146a revelou uma AUC de 0,49, sugerindo ausência de valor discriminatório nesta comparação. Por outro lado, o miR-146a mostrou melhor desempenho discriminatório na distinção entre animais assintomáticos (estadio B1 e B2) e sintomáticos (estadio C) (AUC: 0,76), em relação ao NT-proBNP (AUC: 0,67). O ponto de corte ótimo identificado, com base no índice de Youden, foi de 0,00032 (sensibilidade: 100%; especificidade: 54% e AUC: 0,76) (figura 9).

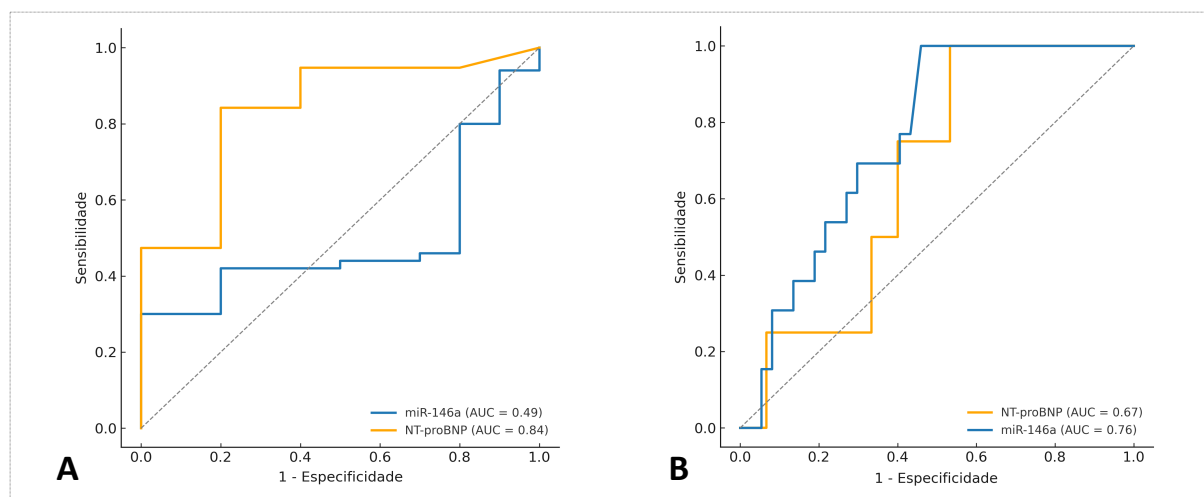


Figura 9. Curvas ROC para a precisão de cada biomarcador (miR-146a e NT-proBNP) na discriminação de cães com DMVM de cães saudáveis (A) e na discriminação de cães sintomáticos (estadio C) de cães assintomáticos (estádios B1 e B2) (B). A linha a tracejado representa a referência diagnóstica (AUC = 0,5). (A) NT-proBNP: Saudáveis(n=5); DMVM (n=19); miR-146a: Saudáveis(n=10); DMVM (n=50). (B) NT-proBNP: estadio B1 e B2 (n=15); estadio C (n=4); miR-146a: estadio B1 e B2 (n=37); estadio C (n=13). AUC: área sob a curva; DMVM: doença mixomatosa da válvula mitral; miR-146a: microRNA-146a; NT-proBNP: fragmento N-terminal do péptido natriurético do tipo B; ROC: receiver operating characteristic.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam uma tendência para o agravamento dos parâmetros estruturais, bem como alterações nos perfis de biomarcadores funcionais e moleculares, à medida que a DMVM progride. Estes achados revelam padrões compatíveis com a evolução da doença e levantam hipóteses pertinentes sobre os mecanismos subjacentes.

A população incluída neste estudo apresentou uma idade mediana de 11 anos e um peso corporal mediano de 9,1 Kg, não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos clínicos. Estes valores estão em consonância com o perfil típico da DMVM, uma doença de carácter progressivo que afeta predominantemente cães de pequeno a médio porte e cuja prevalência aumenta com a idade, podendo chegar aos 100% em cães geriátricos de raças de alto risco (Borgarelli & Buchanan, 2012). De facto, a idade avançada é reconhecida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento e agravamento da doença, uma vez que as alterações degenerativas da válvula mitral tendem a intensificar-se com o tempo. Embora alguns estudos indiquem uma ligeira predominância em machos, neste estudo não se verificaram diferenças significativas quanto ao sexo. Relativamente ao peso corporal, a sobre-representação de cães de pequeno porte neste estudo está de acordo com a distribuição típica da DMVM, que afeta essencialmente cães com <20 kg (Keene et al., 2019). Quanto à composição racial, observaram-se sobretudo cães sem raça definida e raças de pequeno porte, como Yorkshire Terrier, Shih-Tzu e Pug. Apesar da distribuição uniforme entre grupos, é reconhecido que certas raças apresentam uma predisposição genética, nomeadamente o CKCS, onde a doença tende a manifestar-se em idades mais precoces e a apresentar uma progressão mais rápida (Swift et al., 2017), com alterações estruturais significativas observadas em fases iniciais da doença, associadas a variantes genéticas que comprometem a integridade da válvula mitral (Axelsson et al., 2021; Madsen et al., 2011).

Tal como descrito na literatura, observou-se um aumento progressivo dos índices AE/Ao e do DIVEdN ao longo dos diferentes estadios, com diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e os estadios B2 e C (Ljungvall & Häggström, 2023). A ausência de diferença significativa entre o controlo e o estadio B1 no parâmetro AE/Ao está em conformidade com a definição deste estadio, segundo a classificação do ACVIM, no qual não se verificam critérios ecocardiográficos de dilatação do AE (Keene et al., 2019). A dilatação atrial esquerda constitui um mecanismo compensatório face ao aumento do volume regurgitante, permitindo manter a pressão intra-atrial relativamente baixa durante a sístole ventricular, mesmo em fases avançadas da doença. Por sua vez, a dilatação ventricular esquerda, evidenciada por valores mais elevados de DIVEdN, foi particularmente marcante no estadio C, refletindo a sobrecarga de volume crónica e a consequente hipertrofia excêntrica, características típicas da evolução da DMVM (Hori et al., 2020).

Neste contexto, as correlações estatisticamente significativas, embora modestas, entre os níveis de miR-146a e os índices ecocardiográficos AE/Ao e DIVEdN adquirem especial relevância, sugerindo que a expressão deste miRNA poderá refletir, pelo menos em parte, o grau de remodelação estrutural cardíaca. Esta hipótese é sustentada por evidência experimental, que associa diretamente o miR-146a a mecanismos de remodelação miocárdica (He et al., 2019; Oh et al., 2018; Palomer et al., 2015). Em modelos de insuficiência cardíaca induzida por enfarte do miocárdio, a sua expressão positiva foi relacionada com disfunção ventricular, dilatação das câmaras cardíacas e ativação de vias pró-fibróticas. Inversamente, a sua inibição resultou em melhorias hemodinâmicas, redução da fibrose intersticial e recuperação parcial da função sistólica (He et al., 2019), reforçando o seu papel ativo na remodelação adversa. Embora não seja possível estabelecer uma relação causal direta, os dados aqui obtidos sugerem que o miR-146a poderá funcionar como marcador molecular de remodelação cardíaca, particularmente em estádios clínicos mais avançados da DMVM.

A análise da expressão do miR-146a ao longo dos diferentes estádios da DMVM revelou um padrão compatível com a progressão da doença, com níveis significativamente mais elevados no grupo sintomático (estádio C) em comparação com os grupos assintomáticos (estádios B1 e B2). Este aumento refletiu-se numa boa capacidade discriminatória entre cães sintomáticos e assintomáticos ($AUC = 0,76$), sugerindo que o miR-146a poderá estar implicado em mecanismos moleculares associados à fase clínica da doença, possivelmente relacionados com inflamação e remodelação estrutural. Por outro lado, a ausência de diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos assintomáticos, bem como o fraco desempenho na distinção entre cães saudáveis e doentes ($AUC = 0,49$), indicam que este miRNA não se revela útil como marcador para rastreio precoce, mas poderá constituir um potencial indicador de agravamento ou descompensação clínica.

Em paralelo, o NT-proBNP permanece como um dos biomarcadores mais amplamente estudados e utilizados na prática clínica veterinária, nomeadamente no contexto da DMVM. Embora não esteja diretamente implicado nos mecanismos celulares de remodelação, os níveis do NT-proBNP aumentam progressivamente à medida que se verifica dilatação atrial e ventricular, refletindo, de forma indireta, a magnitude da sobrecarga de volume e o grau de adaptação estrutural do coração. Estudos anteriores demonstraram uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de NT-proBNP e parâmetros ecocardiográficos de remodelação, como a relação AE/Ao, bem como uma boa capacidade discriminatória entre os diferentes estádios clínicos (Ogawa et al., 2021). No presente estudo, o NT-proBNP revelou excelente desempenho na distinção entre cães saudáveis e doentes ($AUC = 0,84$), evidenciando a sua sensibilidade a alterações hemodinâmicas precoces. No entanto, demonstrou apenas desempenho moderado na diferenciação entre estádios sintomáticos e assintomáticos ($AUC = 0,67$), valor inferior ao reportado na maioria dos estudos prévios (Chanmongkolpanit et al., 2024).

Tendo em conta os resultados obtidos, o papel distinto, mas complementar do NT-proBNP e do miR-146a reforça a utilidade clínica da sua combinação. Enquanto o NT-proBNP atua como biomarcador sensível à sobrecarga miocárdica e às alterações hemodinâmicas precoces, o miR-146a poderá fornecer informação adicional sobre alterações moleculares e estruturais, nomeadamente processos inflamatórios e de remodelação cardíaca, característicos dos estadios mais avançados. Estes achados sugerem que, em conjunto, estes biomarcadores podem oferecer uma visão mais abrangente da progressão da DMVM.

Apesar da utilidade reconhecida do NT-proBNP, os seus níveis podem ser influenciados por variáveis não cardíacas, como a função renal, idade ou terapêutica, o que limita a sua especificidade clínica (Sjöstrand et al., 2014; Wall et al., 2018). Neste estudo, apenas uma parte dos cães foi submetida à quantificação plasmática deste marcador, resultando numa amostra particularmente reduzida, sobretudo no grupo sintomático (estadio C). Esta limitação poderá ter comprometido a robustez das análises comparativas entre biomarcadores, nomeadamente na avaliação da capacidade discriminatória do NT-proBNP e na comparação entre as AUC dos biomarcadores. Por este motivo, os resultados obtidos devem ser considerados exploratórios, carecendo de validação futura em amostras maiores. Em paralelo, apesar do cuidado em não incluir animais com doenças inflamatórias ativas, os resultados obtidos para o miR-146a revelaram variabilidade intra-grupo, que poderá estar associada a fatores inflamatórios sistémicos não diretamente relacionados com a DMVM. A origem da sua expressão plasmática poderá não ser exclusivamente cardíaca, uma vez que os miRNAs circulantes podem derivar de múltiplos tecidos e refletem também os efeitos sistémicos da doença. De facto, a discrepância entre perfis teciduais e plasmáticos, descrita em estudos prévios, reforça a importância de estudos que integrem a expressão tecidular e a caracterização funcional deste miRNA (Yang et al., 2017; Yang et al., 2018). Ainda assim, os dados aqui obtidos sustentam a utilidade potencial do miR-146a como marcador de remodelação cardíaca avançada, sobretudo quando combinado com outros parâmetros clínicos, ecocardiográficos ou moleculares.

Ainda assim, importa reconhecer que a utilização clínica dos miRNAs como biomarcadores enfrenta diversos desafios. Um dos principais entraves é a ausência de uma estratégia universal de normalização, o que compromete a comparabilidade entre estudos e limita a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a inexistência de unidades de medida absolutas e de valores de referência específicos para diferentes amostras, quer em condições fisiológicas, quer em contexto patológico, dificulta a interpretação da origem da expressão e impede a caracterização de doenças com base em concentrações plasmáticas. A variabilidade individual e a baixa expressão de certos miRNAs no plasma representam obstáculos técnicos relevantes à sua deteção e quantificação fiável. Estes constrangimentos reforçam a necessidade de estudos multicêntricos e longitudinais, que permitam

validar de forma robusta o potencial diagnóstico, prognóstico e terapêutico dos miRNAs na prática clínica veterinária (Bagardi et al., 2022; Hulanicka et al., 2014; Jung & Bohan, 2018).

De forma integrada, os resultados deste estudo apontam para o potencial benefício de uma avaliação combinada entre parâmetros ecocardiográficos e biomarcadores funcionais e moleculares, permitindo uma caracterização mais abrangente da DMVM. Embora o NT-proBNP se mantenha como um biomarcador robusto e útil na prática clínica, os dados obtidos sugerem que a inclusão de moléculas como o miR-146a pode acrescentar valor na estratificação de risco, particularmente em fases sintomáticas, onde a remodelação e inflamação são mais marcadas. A complementaridade entre ambos os biomarcadores pode, assim, abrir caminho para abordagens diagnósticas mais precisas e personalizadas na prática da cardiologia veterinária.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a expressão plasmática do miR-146a se encontra aumentada em cães com DMVM, particularmente em estádios mais avançados da doença. Verificou-se uma associação significativa entre a expressão deste miRNA e parâmetros ecocardiográficos de remodelação cardíaca, nomeadamente o índice AE/Ao, indicador reconhecido da progressão estrutural da doença. Além disso, o miR-146a revelou boa capacidade discriminatória entre cães sintomáticos (estadio C) e assintomáticos (estadio B1 e B2), contrastando com o NT-proBNP, que demonstrou melhor desempenho na distinção entre animais saudáveis e doentes. Este padrão sugere que o miR-146a poderá refletir alterações moleculares associadas a fases mais avançadas da DMVM, como inflamação e fibrose, enquanto o NT-proBNP permanece mais sensível a alterações funcionais e hemodinâmicas precoces. Assim, os dois biomarcadores parecem fornecer informação complementar sobre diferentes dimensões da doença.

Ainda que preliminares, os dados aqui apresentados sustentam o potencial do miR-146a como biomarcador complementar na avaliação clínica da DMVM. A sua inclusão poderá contribuir para uma estratificação de risco mais precisa e para o acompanhamento de fases assintomáticas da doença, nomeadamente em associação com marcadores ecocardiográficos e bioquímicos já estabelecidos.

Em suma, este estudo reforça a importância de uma abordagem integrativa, combinando indicadores morfológicos, funcionais e moleculares, para uma caracterização mais abrangente e precisa da progressão da DMVM. Investigações futuras, com maior dimensão amostral, abordagem longitudinal e validação funcional do papel biológico do miR-146a serão fundamentais para consolidar o papel clínico do miR-146a e explorar o seu potencial terapêutico na cardiologia veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardinal, A. P., Wiyono, A. V., & Estiko, R. I. (2024). Unveiling the therapeutic potential of miR-146a: Targeting innate inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 28(19). <https://doi.org/10.1111/jcmm.70121>
- Arroyo, A. B., Aguila, S., Fernandez-Perez, M. P., Reyes-Garcia, A. M. L., Reguilon-Gallego, L., Zapata-Martinez, L., Zapata-Martinez, L., Vicente, V., Martinez, C., & Gonzalez-Conejero, R. (2021). miR-146a in Cardiovascular Diseases and Sepsis: An Additional Burden in the Inflammatory Balance? *Thrombosis and Haemostasis*, 121(9), 1138-1150. <https://doi.org/10.1055/a-1342-3648>
- Arroyo, A. B., de Los Reyes-Garcia, A. M., Rivera-Caravaca, J. M., Valledor, P., Garcia-Barbera, N., Roldan, V., Roldan, V., Vicente, V., Martinez, C., & Gonzalez-Conejero, R. (2018). MiR-146a Regulates Neutrophil Extracellular Trap Formation That Predicts Adverse Cardiovascular Events in Patients With Atrial Fibrillation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38(4), 892-902. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310597>
- Asgarpour, K., Shojaei, Z., Amiri, F., Ai, J., Mahjoubin-Tehran, M., Ghasemi, F., Ghasemi, F., ArefNezhad, R., Hamblin, M. R., & Mirzaei, H. (2020). Exosomal microRNAs derived from mesenchymal stem cells: cell-to-cell messages. *Cell Communication and Signaling*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00650-6>
- Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Haggstrom, J., Hamlin, R., Keene, B., Luis-Fuentes, V., & Stepien, R. (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(6). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x>
- Aupperle, H., Marz, I., Thielebein, J., & Schoon, H. A. (2008). Expression of transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol*, 139(2-3), 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.05.007>
- Axelsson, E., Ljungvall, I., Bhoumik, P., Conn, L. B., Muren, E., Ohlsson, Å., Olsen, L. H., Engdahl, K., Hagman, R., Hanson, J., Kryvokhyzha, D., Pettersson, M., Grenet, O., Moggs, J., Del Rio-Espinola, A., Epe, C., Taillon, B., Tawari, N., Mane, S., Hawkins, T., Hedhammar, Å., Gruet, P., Häggström, J., & Lindblad-Toh, K. (2021). The genetic consequences of dog breed formation—Accumulation of deleterious genetic variation and fixation of mutations associated with myxomatous mitral valve disease in cavalier King Charles spaniels. *PLOS Genetics*, 17(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009726>
- Bagardi, M., Ghilardi, S., Zamarian, V., Ceciliani, F., Brambilla, P. G., & Lecchi, C. (2022). Circulating MiR-30b-5p is upregulated in Cavalier King Charles Spaniels affected by early myxomatous mitral valve disease. *PLOS ONE*, 17(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266208>
- Baltimore, D., Boldin, M. P., O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Taganov, K. D. (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology*, 9(8). <https://doi.org/10.1038/ni.f.209>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bellingham, S. A., Shambrook, M., & Hill, A. F. (2017). Quantitative Analysis of Exosomal miRNA via qPCR and Digital PCR. *Methods in molecular biology*, 1545. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_5
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2). <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>

- Borgarelli, M., & Buchanan, J. W. (2012). Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2012.01.011>
- Borgarelli, M., Ferasin, L., Lamb, K., Bussadori, C., Chiavegato, D., D'Agnolo, G., Migliorini, F., Poggi, M., Santilli, R. A., Guillot, E., Garelli-Paar, C., Toschi, C. R., Farina, F., Zani, A., Dirven, M., Smets, P., Guglielmini, C., Oliveira, P., Di, M.M., Porciello, F., Crosara, S., Ciaramella, P., Piantedosi, D., Smith, S., Vannini, S., Dall'Aglio, E., Savarino, P., Quintavalla, C., Patteson, M., Silva, J., Locatelli, C., & Baron Toaldo, M. (2020). DELAY of Appearance of sYmptoms of Canine Degenerative Mitral Valve Disease Treated with Spironolactone and Benazepril: the DELAY Study. *Journal of veterinary cardiology*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2019.12.002>
- Borgarelli, M., Ferasin, L., Lamb, K., Chiavegato, D., Bussadori, C., D'Agnolo, G., Migliorini, F., Poggi, M., Santilli, R. A., Guillot, E., Garelli-Paar, C., Cornelian, R. T., Farina, F., Zani, A., Dirven, M., Smets, P., Guglielmini, C., Oliveira, P., Di Marcello, M., Porciello, F., Crosara, S., Ciaramella, P., Piantedosi, D., Smith, S., Vannini, S., Dall'Aglio, E., Savarino, P., Quintavalla, C., Patteson, M., Silva, J., Locatelli, C., & Baron Toaldo M. (2021). The predictive value of clinical, radiographic, echocardiographic variables and cardiac biomarkers for assessing risk of the onset of heart failure or cardiac death in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease enrolled in the DELAY study. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2021.04.009>
- Borgarelli, M., Tarducci, A., Zanatta, R., & Haggstrom, J. (2007). Decreased Systolic Function and Inadequate Hypertrophy in Large and Small Breed Dogs with Chronic Mitral Valve Insufficiency. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02929.x>
- Borgarelli, M., Zini, E., D'Agnolo, G., Tarducci, A., Santilli, R. A., Chiavegato, D., Tursi, M., Prunotto, M., & Häggström, J. (2004). Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *Journal of Veterinary Cardiology*, 6(2). [https://doi.org/10.1016/S1760-2734\(06\)70055-8](https://doi.org/10.1016/S1760-2734(06)70055-8)
- Boswood, A., Attree, S., & Page, K. (2003). Clinical validation of a proANP 31-67 fragment ELISA in the diagnosis of heart failure in the dog. *The Journal of small animal practice*, 44(3). <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2003.tb00128.x>
- Boswood, A., Gordon, S. G., Haggstrom, J., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., Keene, B. M., 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, J. 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., Schummer, C., & Watson, P. (2018). Longitudinal Analysis of Quality of Life, Clinical, Radiographic, Echocardiographic, and Laboratory Variables in Dogs with Preclinical Myxomatous Mitral Valve Disease Receiving Pimobendan or Placebo: The EPIC Study. *J Vet Intern Med*, 32(1), 72-85. <https://doi.org/10.1111/jvim.14885>
- Boswood, A., Häggström, J., Gordon, S. G., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., Keene, B. M., 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, J. 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. (2016). 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*, 30(6). <https://doi.org/10.1111/jvim.14586>

- Brložnik, M., Pečjak, A., Nemec Svete, A., & Domanjko Petrič, A. (2023). Selected hematological, biochemical, and echocardiographic variables as predictors of survival in canine patients with myxomatous mitral valve disease and congestive heart failure. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2023.03.001>
- Bronze-da-Rocha, E. (2014). MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *BioMed research international*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/985408>
- Cakmak, H. A., & Demir, M. (2020). MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balkan Med J*, 37(2), 60-71. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.1.94>
- Chan, I., Wu, S., Chang, C., & Chen, W. (2019). Serial measurements of cardiac troponin I in heart failure secondary to canine mitral valve disease. *The Veterinary record*, 185(11). <https://doi.org/10.1136/vr.105265>
- Chanmongkolpanit, K., Riengvirodkij, N., Channgam, P., Kaenchan, P., Buayam, W., Janhirun, Y., Phonarknguen, R., Tansakul, M., Sakcamduang, W. (2024). How accurate are NT-proBNP, ANP, and cTnI levels in diagnosing dogs with myxomatous mitral valve disease? *Open Vet J*, 14(6), 1426-1441. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i6.10>
- Chetboul, V., Pouchelon, J. L., Menard, J., Blanc, J., Desquilbet, L., Petit, A., Rougier, S., Lucats, L., & Woehrle, F. (2017). Short-Term Efficacy and Safety of Torasemide and Furosemide in 366 Dogs with Degenerative Mitral Valve Disease: The TEST Study. *Journal of veterinary internal medicine*, 31(6). <https://doi.org/10.1111/jvim.14841>
- Dave, V. P., Ngo, T. A., Pernestig, A. K., Tilevik, D., Kant, K., Nguyen, T., Wolf, A., & Bang, D. D. (2019). MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 99(4). <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0143-3>
- de Lima, G. V., & Ferreira, F. D. S. (2017). N-terminal-pro brain natriuretic peptides in dogs and cats: A technical and clinical review. *Vet World*, 10(9), 1072-1082. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1072-1082>
- Duisters, R. F., Tijssen, A. J., Schroen, B., Leenders, J. J., Lentink, V., van der Made, I., Herias, V., van Leeuwen, R. E., Schellings, M. W., Barenbrug, P., Maessen, J. G., Heymans, S., Pinto, Y. M., & Creemers, E. E. (2009). miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circulation Research*, 104(2), 170-178. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182535>
- Eriksson, A. S., Häggström, J., Pedersen, H. D., Hansson, K., Järvinen, A. K., Haukka, J., & Kvart, C. (2014). Increased NT-proANP predicts risk of congestive heart failure in Cavalier King Charles spaniels with mitral regurgitation caused by myxomatous valve disease - PubMed. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*, 16(3). <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2014.05.001>
- Feng, B., Chen, S., Gordon, A. D., & Chakrabarti, S. (2017). miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2017.03.002>
- Ferasin, L., Crews, L., Biller, D. S., Lamb, K. E., & Borgarelli, M. (2013). Risk Factors for Coughing in Dogs with Naturally Acquired Myxomatous Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(2). <https://doi.org/10.1111/jvim.12039>
- Ferasin, L., & Linney, C. (2019). Coughing in dogs: what is the evidence for and against a cardiac cough? *The Journal of small animal practice*, 60(3). <https://doi.org/10.1111/jsap.12976>

- Fiedler, J., Batkai, S., & Thum, T. (2014). MicroRNA-based therapy in cardiology. *Herz*, 39(2), 194-200. <https://doi.org/10.1007/s00059-013-4047-0>
- Fine, D., DeClue, A., & Reinero, C. (2008). Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(11). <https://doi.org/10.2460/javma.232.11.1674>
- Fox, P. R. (2012). Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. *Journal of Veterinary Cardiology*, 14(1), 103-126. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2012.02.001>
- Franchini, A., Borgarelli, M., Abbott, J. A., Menciotti, G., Crosara, S., Häggström, J., Lahmers, S., Rosenthal, S., & Tyrrell, W. (2022). The longitudinal outcome of canine (K9) myxomatous mitral valve disease (LOOK-Mitral) registry: Baseline treatment characteristics. *Journal of Veterinary Cardiology*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2022.02.001>
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1). <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Gao, M., Wang, X., Zhang, X., Ha, T., Ma, H., Liu, L., Halbfleisch, J. H., Gao, X., Kao, R. L., Williams, D. L., & Li, C. (2015). Attenuation of Cardiac Dysfunction in Polymicrobial Sepsis by MicroRNA-146a Is Mediated via Targeting of IRAK1 and TRAF6 Expression. *The Journal of Immunology*, 195(2). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403155>
- Gavazza, A., Fruganti, A., Turinelli, V., Marchegiani, A., Spaterna, A., Tesei, B., Rosi, G., & Cerquetella, M. (2020). Canine Traditional Laboratory Tests and Cardiac Biomarkers. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00320>
- Gelzer, A. R., Kraus, M. S., Rishniw, M., Moïse, N. S., Pariaut, R., Jesty, S. A., & Hemsley, S. A. (2009). Combination therapy with digoxin and diltiazem controls ventricular rate in chronic atrial fibrillation in dogs better than digoxin or diltiazem monotherapy: a randomized crossover study in 18 dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(3). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0301.x>
- Gilyazova, I., Asadullina, D., Kagirowa, E., Sikka, R., Mustafin, A., Ivanova, E., Bakhtiyarova, K., Gilyazova, G., Gupta, S., Khusnutdinova, E., Gupta, H., & Pavlov, V. (2023). MiRNA-146a-A Key Player in Immunity and Diseases. *Int J Mol Sci*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/ijms241612767>
- Ha, M., Kim, V. N., Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014 15:8, 15(8). <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Habibullah, A. A., Villarreal, D., Freeman, R. H., Dietz, J. R., Vesley, D. L., & Simmons, J. C. (1995). Atrial natriuretic peptide fragments in dogs with experimental heart failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 22(2). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb01969.x>
- He, J., Lu, Y., Song, X., Gong, X., & Li, Y. (2019). Inhibition of microRNA-146a attenuated heart failure in myocardial infarction rats. *Bioscience Reports*, 39(12). <https://doi.org/10.1042/BSR20191732>
- He, X. Y., Tang, R., Sun, Y., Wang, Y. G., Zhen, K. Y., Zhang, D. M., & Pan, W. Q. (2016). MicroR-146 blocks the activation of M1 macrophage by targeting signal transducer and activator of transcription 1 in hepatic schistosomiasis. *EBioMedicine*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.024>
- Heggermont, W. A., Papageorgiou, A. P., Quaegebeur, A., Deckx, S., Carai, P., Verhesen, W., Eelen, G., Schoors, S., van Leeuwen, R., Alekseev, S., Elzenaar, I., Vinckier, S., Pokreisz, P., Walravens, A. S., Gijssbers, R., Van Den Haute, C., Nickel, A., Schroen, B., van Bilsen, M., Janssens, S., Maack, C., Pinto, Y., Carmeliet, P., & Heymans, S. (2017). Inhibition of MicroRNA-146a and

- Overexpression of Its Target Dihydrolipoyl Succinyltransferase Protect Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction. *Circulation*, 136(8). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024171>
- Hezzell, M., Block, C., Laughlin, D., & Oyama, M. (2018). Effect of prespecified therapy escalation on plasma NT-proBNP concentrations in dogs with stable congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5). <https://doi.org/10.1111/jvim.15228>
- Hezzell, M. J., Boswood, A., López-Alvarez, J., Lötter, N., & Elliott, J. (2017). Treatment of dogs with compensated myxomatous mitral valve disease with spironolactone-a pilot study. *Journal of veterinary cardiology*, 19(4). <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2017.06.001>
- Hori, Y., Iguchi, M., Hirakawa, A., Kamiya, Z., Yamano, S., Ibaragi, T., Isayama, N., Yamashita, Y., Iwasa, N., Inaba, H., Heishima, Y., & Yuki, M. (2020). 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*, 256(3). <https://doi.org/10.2460/javma.256.3.340>
- Huang, C., Liu, X. J., QunZhou, N., Xie, J., Ma, T. T., Meng, X. M., & Li, J. (2016). MiR-146a modulates macrophage polarization by inhibiting Notch1 pathway in RAW264.7 macrophages. *International immunopharmacology*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.009>
- Huang, P., He, X. Y., & Xu, M. (2020). The Role of miRNA-146a and Proinflammatory Cytokines in Carotid Atherosclerosis. *Biomed Res Int*, 6657734. <https://doi.org/10.1155/2020/6657734>
- Huang, W., Tian, S. S., Hang, P. Z., Sun, C., Guo, J., & Du, Z. M. (2016). Combination of microRNA-21 and microRNA-146a Attenuates Cardiac Dysfunction and Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in Mice. *Molecular Therapy- Nucleic Acids*, 5(3). <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.12>
- Hulanicka, M., Garncarz, M., Parzeniecka-Jaworska, M., & Jank, M. (2014). Plasma miRNAs as potential biomarkers of chronic degenerative valvular disease in Dachshunds. *BMC Veterinary Research*. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0205-8>
- Hutvágner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531). <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Islas, J. F., & Moreno-Cuevas, J. E. (2018). A MicroRNA Perspective on Cardiovascular Development and Diseases: An Update. *International journal of molecular sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072075>
- Jung, S., & Bohan, A. (2018). 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*, 79(2). <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.2.163>
- Kamal, N. N. S. B. N. M., & Shahidan, W. N. S. (2020). Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Frontiers in pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01500>
- Keene, B. W., Atkins, C. E., Bonagura, J. D., Fox, P. R., Haggstrom, J., Fuentes, V. L., Oyama, M. A., Rush, J. E., Stepien, R., & Uechi, M. (2019). ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1127-1140. <https://doi.org/10.1111/jvim.15488>

- Kim, J. H., & Park, H. M. (2015). Usefulness of conventional and tissue Doppler echocardiography to predict congestive heart failure in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 29(1). <https://doi.org/10.1111/jvim.12466>
- Lancellotti, P., Donal, E., Magne, J., O'Connor, K., Moonen, M., Cosyns, B., & Pierard, L. (2010). Impact of global left ventricular afterload on left ventricular function in asymptomatic severe aortic stenosis: a two-dimensional speckle-tracking study. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology*, 11(6). <https://doi.org/10.1093/ejechocard/jeq014>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S., & Kim, V. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Li, Q., Freeman, L. M., Rush, J. E., & Laflamme, D. P. (2015). Expression Profiling of Circulating MicroRNAs in Canine Myxomatous Mitral Valve Disease. *Int J Mol Sci*, 16(6), 14098-14108. <https://doi.org/10.3390/ijms160614098>
- Liu, X., Dong, Y., Chen, S., Zhang, G., Zhang, M., Gong, Y., & Li, X. (2015). Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology*, 132(4). <https://doi.org/10.1159/000437090>
- Ljungvall, I., & Häggström, J. (2023). Myxomatous Mitral Valve Disease. In Bussadori, C. (Eds.), *Textbook of Cardiovascular Medicine in Dogs and Cats* (pp. 638-690). Edra Publishing US LLC.
- Ljungvall, I., Höglund, K., Tidholm, A., Olsen, L., Borgarelli, M., Venge, P., & Häggström, J. (2010). Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 24(1). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0428.x>
- Ljungvall, I., Rishniw, M., Porciello, F., Ferasin, L., & Ohad, D. G. (2014). Murmur intensity in small-breed dogs with myxomatous mitral valve disease reflects disease severity. *The Journal of small animal practice*, 55(11). <https://doi.org/10.1111/jsap.12265>
- Lu, C. C., Liu, M. M., Culshaw, G., Clinton, M., Argyle, D. J., & Corcoran, B. M. (2015). Gene network and canonical pathway analysis in canine myxomatous mitral valve disease: a microarray study. *Vet J*, 204(1), 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.021>
- 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. (2011). Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *The Journal of Heredity*, 102. <https://doi.org/10.1093/jhered/esr041>
- Magne, J., Mahjoub, H., Pierard, L., O'Connor, K., Pirlet, C., Pibarot, P., & Lancellotti, P. (2012). Prognostic importance of brain natriuretic peptide and left ventricular longitudinal function in asymptomatic degenerative mitral regurgitation. *Heart (British Cardiac Society)*, 98(7). <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2011-301128>
- Malcolm, E. L., Visser, L. C., Phillips, K. L., & Johnson, L. R. (2018). 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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 253(8). <https://doi.org/10.2460/javma.253.8.1038>
- Mavropoulou, A., Oliveira, P., & Willis, R. (2021). Holter monitoring in dogs: 24 h vs. 48 h. *Veterinary journal*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105628>

- Menciotti, G., Borgarelli, M., Aherne, m., Wesselowski, S., Häggström, J., Ljungvall, I., Lahmers, S. M., & Abbott, J. A. (2017). Mitral valve morphology assessed by three-dimensional transthoracic echocardiography in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 19(2). <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2017.01.002>
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., Mattick, J. S., Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics*, 10(3). <https://doi.org/10.1038/nrg2521>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Mobasheri, A., & Cassidy, J. P. (2010). Biomarkers in veterinary medicine: Towards targeted, individualised therapies for companion animals. *The Veterinary Journal*, 185(1). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.003>
- Moonarmart, W., Boswood, A., Luis Fuentes, V., Brodbelt, D., Souttar, K., & Elliott, J. (2010). N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *Journal of Small Animal Practice*, 51(2). <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00889.x>
- Nicolle, A., Chetboul, V., Allerheiligen, T., Pouchelon, J., Gouni, V., Tessier-Vetzel, D., Sampedrano, C. C., & Lefebvre, H. P. (2007). Azotemia and Glomerular Filtration Rate in Dogs with Chronic Valvular Disease. *J Vet Intern Med*. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21)
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Obayashi, K., Miyagawa-Tomita, S., Matsumoto, H., Koyama, H., Nakanishi, T., & Hirose, H. (2011). Effects of transforming growth factor- β 3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *American journal of veterinary research*, 72(2). <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.2.194>
- Ogawa, M., Hori, Y., Kanno, N., Iwasa, N., Toyofuku, T., Isayama, N., Yoshikawa, A., Akabane, R., Sakatani, A., Miyakawa, H., Hsu, H. H., Miyagawa, Y., & Takemura, N. (2021). Comparison of N-terminal pro-atrial natriuretic peptide and three cardiac biomarkers for discriminatory ability of clinical stage in dogs with myxomatous mitral valve disease. *J Vet Med Sci*, 83(4), 705-715. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0629>
- Oh, J. G., Watanabe, S., Lee, A., Gorski, P. A., Lee, P., Jeong, D., Liang, L., Liang, Y., Baccarini, A., Sahoo, S., Brown, B. D., Hajjar, R. J., & Kho, C. (2018). miR-146a Suppresses SUMO1 Expression and Induces Cardiac Dysfunction in Maladaptive Hypertrophy. *Circulation Research*, 123(6). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312751>
- Oyama, M., Rush, J., Rozanski, E., Fox, P., Reynolds, C., Gordon, S., Bulmer, B. J., Lefbom, B. K., Brown, B. A., Lehmkuhl, L. B., Prosek, R., Lesser, M. B., Kraus, M. S., Bossbaly, M. J., Rapoport, G. S., & Boileau, J. (2009). Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(11). <https://doi.org/10.2460/javma.235.11.1319>

- Oyama, M. A. (2009). Neurohormonal activation in canine degenerative mitral valve disease: implications on pathophysiology and treatment. *J Small Anim Pract*, 1, 3-11. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00801.x>
- Oyama, M. A. (2015). Using Cardiac Biomarkers in Veterinary Practice. *Clin Lab Med*, 35(3), 555-566. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.05.005>
- Oyama, M. A., Elliott, C., Loughran, K. A., Kossar, A. P., Castellero, E., Levy, R. J., & Ferrari, G. (2020). Comparative pathology of human and canine myxomatous mitral valve degeneration: 5HT and TGF-beta mechanisms. *Cardiovasc Pathol*, 46, 107196. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2019.107196>
- Oyama, M. A., & Singletary, G. E. (2010). The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(4), 545-558. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.03.004>
- Osuga, T., Morita, T., Sasaki, N., Morishita, K., Ohta, H., & Takiguchi, M. (2021). Echocardiographic estimation of left ventricular-arterial coupling in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 35(1). <https://doi.org/10.1111/jvim.16028>
- Palomer, X., Capdevila-Busquets, E., Botteri, G., Davidson, M. M., Rodríguez, C., Martínez-González, J., Vidal, F., Barroso, E., Chan, T. O., Feldman, A. M., & Vázquez- Carrera, M. (2015). miR-146a targets Fos expression in human cardiac cells. *Disease Models & Mechanisms*, 8(9). <https://doi.org/10.1242/dmm.020768>
- Paterson, M. R., & Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiological Genomics*, 49(4). <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00133.2016>
- Piantedosi, D., Musco, N., Palatucci, A. T., Carriero, F., Rubino, V., Pizzo, F., Nasir, S., Molinaro, G., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Lombardi, P., & Cortese, L. (2022). Pro-Inflammatory and Immunological Profile of Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. *Vet Sci*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/vetsci9070326>
- Porciello, F., Rishniw, M., Ljungvall, I., Ferasin, L., Haggstrom, J., & Ohad, D. G. (2016). Sleeping and resting respiratory rates in dogs and cats with medically-controlled left-sided congestive heart failure. *The Veterinary Journal*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.017>
- Potter, B. M., Orton, E. C., Scansen, B. A., Abbott-Johnson, K. M., Visser, L. C., Chi, I.-J. B., Ross, E. S., Del Nero, B., Tantisuwat, L., Krause, E. T., Rezende, M. L., & Mama, K. (2024). Clinical feasibility study of transcatheter edge-to-edge mitral valve repair in dogs with the canine V-Clamp device. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1448828. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1448828>
- Rangaswami, J., Bhalla, V., Blair, J., Chang, T., Costa, S., Lentine, K., Lerma, E. V., Mezue, K., Molitch, M., Mullens, W., Ronco, C., Tang, W. H. W., & McCullough, P. (2019). Cardiorenal Syndrome: Classification, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Strategies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 139(16). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000664>
- Reinero, C., Visser, L. C., Kellihan, H. B., Masseau, I., Rozanski, E., Clercx, C., Williams, K., Abbott, J., Borgarelli, M., & Scansen, B. A. (2020). ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 34(2). <https://doi.org/10.1111/jvim.15725>
- Riengvirodkij, N., & Sakcamduang, W. (2021). Assessment of Two New Commercial Rapid Tests for Canine N-terminal Pro-B-type Natriuretic Peptide to Distinguish the Severity of Mitral Valve Disease in Dogs. *Journal of Applied Animal Science*.

- Ro, W. B., Kang, M. H., Song, D. W., Kim, H. S., Lee, G. W., & Park, H. M. (2021). Identification and Characterization of Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers in Dogs With Heart Diseases. *Frontiers in veterinary science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.729929>
- Saba, R., Sorensen, D. L., & Booth, S. A. (2014). MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00578>
- Salguero, X. S., Prandi, D., Llabrés-Díaz, F., Manzanilla, E. G., & Bussadori, C. (2018). A radiographic measurement of left atrial size in dogs. *Irish veterinary journal*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s13620-018-0137-x>
- Sayed, D., & Abdellatif, M. (2011). MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews*, 91(3). <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2010>
- Schmidt, M. K., Reynolds, C. A., Estrada, A. H., Prošek, R., Maisenbacher, H. W., Sleeper, M. M., & Oyama, M. A. (2009). Effect of azotemia on serum N-terminal proBNP concentration in dogs with normal cardiac function: A pilot study. *Journal of Veterinary Cardiology*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2009.02.001>
- Schober, K. E., Hart, T. M., Stern, J. A., Li, X., Samii, V. F., Zekas, L. J., Scansen, B. A., & Bonagura, J. D. (2010). Detection of congestive heart failure in dogs by Doppler echocardiography. *Journal of veterinary internal medicine*, 24(6). <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0592.x>
- Sjöstrand, K., Wess, G., Ljungvall, I., Häggström, J., Merveille, A. C., Wiberg, M., Gouni, V., Willesen, J. L., Hanås, S., Lequarré, A-S., Sørensen, L. M., Wolf, J., Tired, L., Kierczak, M., Forsberg, S., McEntee, K., Battaille, G., Seppälä, E., Lindblad-Toh, K., Georges, M., Lohi, H., Chetboul, V., Fredholm, M., & Höglund, K. (2014). Breed Differences in Natriuretic Peptides in Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2). <https://doi.org/10.1111/jvim.12310>
- Songia, P., Chiesa, M., Alfieri, V., Massaiu, I., Moschetta, D., Myasoedova, V., Valerio, V., Fusini, L., Gripari, P., Zanobini, M., & Poggio, P. (2021). Putative Circulating MicroRNAs Are Able to Identify Patients with Mitral Valve Prolapse and Severe Regurgitation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/ijms22042102>
- Swift, S., Baldin, A., & Cripps, P. (2017). Degenerative Valvular Disease in the Cavalier King Charles Spaniel: Results of the UK Breed Scheme. *Journal of veterinary internal medicine*, 31(1). <https://doi.org/10.1111/jvim.14619>
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12481-12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>
- Tilley, L. P., Smith, F. W. K., Sleeper, M. M., & Oyama, M. A. (2016). Acquired Valvular Disease. In Tilley, L. P., Smith, F. W. K., Sleeper, M. M., & Oyama, M. A. (Eds.), *Manual of canine and feline cardiology* (pp. 111-140). Elsevier.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- Uechi, M. (2012). Mitral valve repair in dogs. *Journal of veterinary cardiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2012.01.004>
- van der Laarse, A. (2002). Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. *Cardiovascular research*, 56(1). [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00534-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00534-5)

- Vezzosi, T., Puccinelli, C., Citi, S., & Tognetti, R. (2021). Two radiographic methods for assessing left atrial enlargement and cardiac remodeling in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2021.01.002>
- Wall, L., Mohr, A., Ripoli, F., Schulze, N., Penter, C., Hungerbuehler, S., Bach, J. P., Lucas, K., & Nolte, I. (2018). Clinical use of submaximal treadmill exercise testing and assessments of cardiac biomarkers NT-proBNP and cTnI in dogs with presymptomatic mitral regurgitation. *PLOS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199023>
- Wang, H., & Cai, J. (2017). The role of microRNAs in heart failure. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(8). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.034>
- Ware, W. A., Bonagura, J. D., & Scansen, B. A. (2022). Degenerative valvular disease of the dog. In Ware, W. A., Bonagura, J. D., & Scansen, B. A. (Eds.), *Cardiovascular disease in companion animals: Dog, cat, and horse* (2nd ed., pp. 569–606). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Wehbe, N., Nasser, S., Pintus, G., Badran, A., Eid, A., & Baydoun, E. (2019). MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy. *International journal of molecular sciences*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194714>
- Wolf, J., Gerlach, N., Weber, K., Klima, A., & Wess, G. (2013). The diagnostic relevance of NT-proBNP and proANP 31-67 measurements in staging of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Vet Clin Pathol*, 42(2), 196-206. <https://doi.org/10.1111/vcp.12044>
- Xiao, L., Gu, Y., Ren, G., Chen, L., Liu, L., Wang, X., & Gao, L. (2021). miRNA-146a Mimic Inhibits NOX4/P38 Signalling to Ameliorate Mouse Myocardial Ischaemia Reperfusion (I/R) Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 6366254. <https://doi.org/10.1155/2021/6366254>
- Yang, C., Zheng, S. D., Wu, H. J., & Chen, S. J. (2016). Regulatory Mechanisms of the Molecular Pathways in Fibrosis Induced by MicroRNAs. *Chinese medical journal*, 129(19). <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190677>
- Yang, V. K., Loughran, K. A., Meola, D. M., Jühr, C. M., Thane, K. E., Davis, A. M., & Hoffman, A. M. (2017). Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model. *J Extracell Vesicles*, 6(1), 1350088. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1350088>
- Yang, V. K., Tai, A. K., Huh, T. P., Meola, D. M., Jühr, C. M., Robinson, N. A., & Hoffman, A. M. (2018). Dysregulation of valvular interstitial cell let-7c, miR-17, miR-20a, and miR-30d in naturally occurring canine myxomatous mitral valve disease. *PLoS One*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188617>
- Zhang, T., Ma, Y., Gao, L., Mao, C., Zeng, H., Wang, X., Sun, Y., Gu, J., Wang, Y., Chen, K., Han, Z., Fan, Y., Gu, J., Zhang, J., & Wang, C. (2019). MicroRNA-146a protects against myocardial ischaemia reperfusion injury by targeting Med1. *Cell Mol Biol Lett*, 24, 62. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0186-5>
- Zheng, H., Jin, Y., Fu, Y., Zhao, R., Wang, X., & Wen, C. (2022). Experimental study: using the continuous wave Doppler spectrum technique to detect left atrial pressure. *Annals of translational medicine*, 10(2). <https://doi.org/10.21037/atm-21-6913>

miR-146a na doença mixomatosa da válvula mitral no cão: comparação com o biomarcador cardíaco NT-proBNP

Helena Coelho dos Santos Ferreira Pinho

ICBAS

