

ADRIANA ARÊS MESSIAS

**MiR-146a COMO POTENCIAL BIOMARCADOR NA
DOENÇA DEGENERATIVA MIXOMATOSA DA
VÁLVULA MITRAL DO CÃO – DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL**

Orientador: Professor Doutor Luís Lima Lobo

**Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2023

ADRIANA ARÊS MESSIAS

**MiR-146a COMO POTENCIAL BIOMARCADOR NA
DOENÇA DEGENERATIVA MIXOMATOSA DA
VÁLVULA MITRAL DO CÃO – DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL**

Dissertação defendida para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, no dia 02 de março de 2023, com o Despacho de Nomeação Nº 150/2023, de 06 de fevereiro de 2023, com a seguinte composição do júri:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves, por delegação da Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Ana Patrícia Fontes

Orientador: Professor Doutor Luís Lima Lobo

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

À Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, pela possibilidade de frequentar e concluir o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, como sempre sonhei. E a todos os docentes da Faculdade de Medicina Veterinária, por tudo o que me ensinaram durante estes seis anos.

Ao Professor Doutor Luís Lobo, meu orientador, por tudo o que me ensinou, por ser um exemplo de excelência a seguir e por toda a ajuda e orientação na realização desta dissertação. Foi um prazer trabalhar consigo!

À Doutora Ana Reis, pela disponibilidade e ajuda sempre demonstradas, por me ensinar tanto e por me dar a oportunidade de fazer parte deste projeto. Eternamente grata!

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Porto – Dr. Luís, Dr. Amândio, Dr. Nuno, Dr. Gonçalo, Dra. Joana, Dr. Paulo, Dra. Ana, Dra. Sara, Dr. João, Dr. Vítor, Dra. Inês, Enf.º Luís, Enf.ª Helena, Enf.ª Alexandra, Enf.ª Sara, Graciete, Mónica, Odette, Sandrinha, Raquel, Teófilo, Ana, Nati. Não tenho palavras para vos agradecer. Tudo o que sei devo-o a eles. Recordarei sempre esta minha passagem pelo Porto com um enorme carinho. Guardo-os a todos no meu coração.

Ao Marco, pela total disponibilidade e ajuda, imprescindíveis para a realização desta dissertação. Estou-lhe imensamente agradecida.

Aos meus pais e à Anaísa, por me apoiarem e acreditarem em mim, incondicionalmente. Estou-vos eternamente grata por tornarem o meu sonho possível.

A toda a minha família, por estarem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Ao Francisco, por ter sido absolutamente incansável, pelo apoio e companheirismo, por me amparar quando precisei e por acreditar em mim, sempre. Desde o sol até à lua.

Ao João, por chegarmos aqui juntos.

À Bê, por não me largar nunca e por ser sempre a minha voz da razão. My person.

À Marta, Gonçalo, Madalena, Martim, Rita, Leonor, Mónica e Benedita, por tornarem estes seis anos inesquecíveis. Um agradecimento especial à Catarina, por tudo, sem ti não tinha conseguido. Adoro-vos.

À Alice, Maria, Carol, Caiado e Tomás, por serem de sempre e para sempre.

À Lex, Mags, Nuno, João e Inês – por tornarem o Porto a minha segunda casa. Obrigada por tudo o que me ensinaram, pelas noites de jogos, pela ida ao cinema e por todo o apoio. Sem vocês teria sido tudo mais difícil.

Ao Boxy, Benny, Beja, Blackie e Daisy, por serem o motivo de tudo isto.

A todos, muito obrigada!

Resumo

Delineamento experimental para a extração e medição da concentração de microRNA através de amostras de sangue.

A doença degenerativa mixomatosa da válvula mitral é a doença cardiovascular adquirida mais comum em cães, sendo também a causa mais frequente de insuficiência cardíaca. Esta patologia apresenta várias semelhanças com o prolapso da válvula mitral em humanos. Como os meios de diagnóstico necessários nem sempre estão disponíveis, biomarcadores como os microRNA são cada vez mais estudados como potenciais novas formas de diagnóstico e terapêutica.

Este trabalho propôs-se a desenvolver um delineamento experimental para a extração e medição da concentração de microRNA, neste caso o miR-146a, através de amostras de sangue, que pudesse ser utilizado noutras investigações que tenham como propósito a análise de microRNA no sangue.

Para tal, procedeu-se à recolha de amostras de sangue de 47 cães e à realização de exames ecocardiográficos, após os quais foi possível dividir os animais em quatro grupos, o grupo de controlo, estágio B1, B2 e C. As amostras foram recolhidas em duas fases, a primeira foi desenvolvida entre 2020/2021 e a segunda entre 2021/2022.

Até à data, não foi possível obter os resultados da concentração do miR-146a das amostras recolhidas durante a segunda fase, no entanto, as amostras da primeira fase do estudo revelaram pela primeira vez uma relação entre este microRNA e a doença degenerativa mixomatosa da válvula mitral em cães. Espera-se que os resultados da segunda fase corroborem os da primeira.

Palavras-chave: doença mixomatosa da válvula mitral; protocolo experimental; biomarcadores; miR-146a.

Abstract

Trial design for extraction and measurement of microRNA concentration in blood samples.

Myxomatous mitral valve disease is the most common acquired cardiovascular disease in dogs and the most frequent cause of heart failure.

This pathology has various similarities with mitral valve prolapse in humans. And since complementary means of diagnosis aren't always available, biomarkers like microRNA have started to be studied as a new potential way of diagnosing and treating these diseases.

This project proposed to develop a trial design for extraction and measurement of microRNA concentrations, in this case miR-146a, using only blood samples, that could be used in future investigations that aim to analyze microRNA in blood samples.

To this end, blood samples were collected, and echocardiographic examinations performed to 47 dogs that were then divided in four groups: control group, stage B1, B2 and C. The study was divided in two phases, the first phase took place between 2020/2021 and the second phase in 2021/2022.

Till this date it was not yet possible to acquire miR-146a concentration results from the second phase samples, however the samples from the first phase of this study revealed for the first time a relation between this microRNA and myxomatous mitral valve disease in dogs. It is expected that the second phase results corroborate the first phase.

Palavras-chave: Myxomatous mitral valve disease; trial design; biomarkers; miR-146a.

Lista de Abreviaturas

bpm – Batimentos por minuto

CRI – Infusão contínua (do inglês, *Continuous rate infusion*)

DLST - Dihidrolipoamida succinil transferase

DDMVM – Doença degenerativa mixomatosa da válvula mitral

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FMUP – Faculdade de medicina da universidade do porto

gradMR – Gradiente de pressão da regurgitação mitral

gradTR - Gradiente de pressão da regurgitação tricúspide

HVP – Hospital Veterinário do Porto

ICC – Insuficiência cardíaca congestiva

IECA - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina

AE:AO – Rácio átrio esquerdo:aorta

LVIDDN – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado para o peso corporal (do inglês, *left ventricular end-diastolic internal diameter normalized for body weight*)

miRNA – MicroRNA

MRV – Velocidade máxima de regurgitação mitral

NF-kB - Fator nuclear kappa B

NT-ProPNB - porção aminoterminal do peptídeo natriurético tipo-B

PNB - Peptídeo natriurético tipo-B

PO – Pela boca (da locução latina, *Per os*)

RISC - Complexo indutor do silenciamento do RNA

RNA - Ácido ribonucleico

TRV - Velocidade máxima de regurgitação tricúspide

Lista de Unidades e Símbolos

ml – Mililitros

mg – Miligramas

IM - Intramuscular

IV – Intravenoso

Kg – Quilograma

G – Gauge

µg – Micrograma

°C – Graus celsius

% - Percentagem

® - Marca registada

> - superior a

< - inferior a

Índice Geral

Parte 1 – Casuística e Descrição do Estágio Curricular	12
Parte 2 – Introdução	15
1. Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral	15
1.1. Etiologia	15
1.2. Incidência e Fisiopatologia	16
1.3. Classificação	19
1.4. Diagnóstico	20
1.4.1. Biomarcadores	22
1.5. Tratamento	23
1.5.1. Estádio A	24
1.5.2. Estádio B1	24
1.5.3. Estádio B2	24
1.5.4. Estádio C	24
1.5.5. Estádio C – Tratamento Hospitalar	25
1.5.6. Estádio C – Tratamento Crónico	26
1.5.7. Estádio D	27
1.5.8. Estádio D – Tratamento Hospitalar	27
1.5.9. Estádio D – Tratamento Crónico	28
2. MicroRNA	31
2.1. MiR-146a	34
3. Objetivos	36
Parte 3 – MiR-146a Como Potencial Biomarcador na Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral do Cão – Delineamento Experimental	37
1. Materiais e Métodos	37
1.1. Recrutamento da amostra do estudo	37
1.1.1. Critérios de inclusão	37
1.1.2. Critérios de exclusão	37
1.1.3. Consentimento informado	38
1.1.4. Grupo de controlo	38
1.2. Amostras, processamento e armazenamento	38
1.3. Exame ecocardiográfico	39

1.3.1. Cálculos e medições	40
1.4. Técnica de extração de RNA	41
1.5. Análise estatística	41
2. Resultados	42
2.1. Descrição da amostra	42
2.2. Ecocardiografia	45
3. Discussão	53
4. Conclusão	57
5. Referências bibliográficas	58

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tabela resumo da classificação dos estádios da Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral	19
Tabela 2 - Tabela resumo do diagnóstico de Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral nos diferentes estádios	21
Tabela 3 - Tabela resumo do tratamento recomendado para cada estágio da Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral	29
Tabela 4 - Estatística descritiva por idade e por estágio	43
Tabela 5 - Resultados dos testes de Bonferroni - Idade vs Estádio	43
Tabela 6 - Estatística descritiva por peso e por estágio	44
Tabela 7 - Estatística descritiva por resultados do rácio AE/Ao por estágio	45
Tabela 8 - Resultados dos testes de Bonferroni - Valores rácio AE/Ao vs Estádio	46
Tabela 9 - Estatística descritiva por resultados do LVIDdN por estágio	47
Tabela 10 - Resultados dos testes de Bonferroni – Valores LVIDdN vs Estádio	47
Tabela 11 - Estatística descritiva por resultados da MRV por estágio	48
Tabela 12 -Estatística descritiva por resultados do gradiente de pressão da regurgitação mitral por estágio	49
Tabela 13 - Estatística descritiva por resultados da TRV por estágio	50
Tabela 14 - Resultados dos testes de Dunnett T3 – Valores TRV vs Estádio	51
Tabela 15 - Estatística descritiva por resultados do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide por estágio	51
Tabela 16 - Resultados dos testes de Dunnett T3 – Valores do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide vs Estádio	52

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Casuística das diferentes patologias médicas em percentagem.....	13
Gráfico 2- Casuística dos diferentes exames realizados em percentagem.....	13

Gráfico 3 - Casuística das cirurgias observadas em percentagem.....	14
Gráfico 4 - Idades observadas por grupos de acordo com o estágio.....	42
Gráfico 5 - Pesos observados por grupo de acordo com o estágio	44
Gráfico 6 - Valores do Rácio AE/Ao observados por grupo de acordo com o estágio	45
Gráfico 7 - Valores do cálculo do LVIDdN observados por grupo de acordo com o estágio	46
Gráfico 8 - Valores da MRV observados por grupo de acordo com o estágio	48
Gráfico 9 - Valores do gradiente de pressão da regurgitação mitral observados por grupo de acordo com o estágio	49
Gráfico 10 - Valores da TRV observados por grupo de acordo com o estágio	50
Gráfico 11 - Valores do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide observados por grupo de acordo com o estágio	51

Parte 1 – Casuística e Descrição do Estágio Curricular

Com vista à conclusão do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, a autora realizou o estágio curricular no Hospital Veterinário do Porto (HVP), sob a orientação do Professor Doutor Luís Lobo, entre 20 de Setembro de 2021 e 20 de Março de 2022.

Durante este período, a autora teve a oportunidade de trabalhar em regime de rotação, acompanhando médicos, enfermeiros e auxiliares nas suas mais variadas funções, prestando auxílio em consultas, internamento, cirurgias e anestesia. Os turnos realizados obedeceram às 40 horas semanais, divididas em turnos diurnos, noturnos e fins-de-semana.

Ao longo destes seis meses, foi possível adquirir novos conhecimentos e consolidar muitas das competências teóricas e práticas aprendidas previamente ao longo dos cinco anos de formação académica.

Durante as semanas de rotação nas consultas, foi possível acompanhar os médicos veterinários do HVP nas mais diversas áreas, assistindo às consultas e ajudando na realização de exames complementares de diagnóstico, como exames ecográficos; radiográficos; recolhas de sangue para a realização de análises sanguíneas e em muitas outras tarefas como preparação e administração de fármacos. Algumas semanas de consultas eram exclusivamente destinadas à área de cardiologia.

Nas semanas de rotação no internamento, a autora prestou assistência aos médicos, enfermeiros e auxiliares do internamento nas suas tarefas diárias. Estas consistiam na realização de exames físicos aos animais internados; recolha de sangue e processamento das respetivas análises laboratoriais; realização de meios complementares de diagnóstico para monitorização da evolução dos pacientes; preparação e administração de medicação e ainda, internamento de novos animais e colocação de cateteres.

A casuística das áreas abrangidas durante as semanas de internamento e consulta está dividida em patologias médicas de cardiologia; dermatologia; doenças do sistema respiratório; doenças infecciosas; doenças músculo-esqueléticas; endocrinologia; gastroenterologia e glândulas anexas; hematologia; imunologia/alergologia; neurologia; odontoestomatologia; oftalmologia; oncologia; otorrinolaringologia; reprodução/ginecologia/andrologia; toxicologia; urologia e medicina preventiva apresentando-se discriminada no gráfico a baixo com a frequência relativa de animais vistos (Gráfico 1).

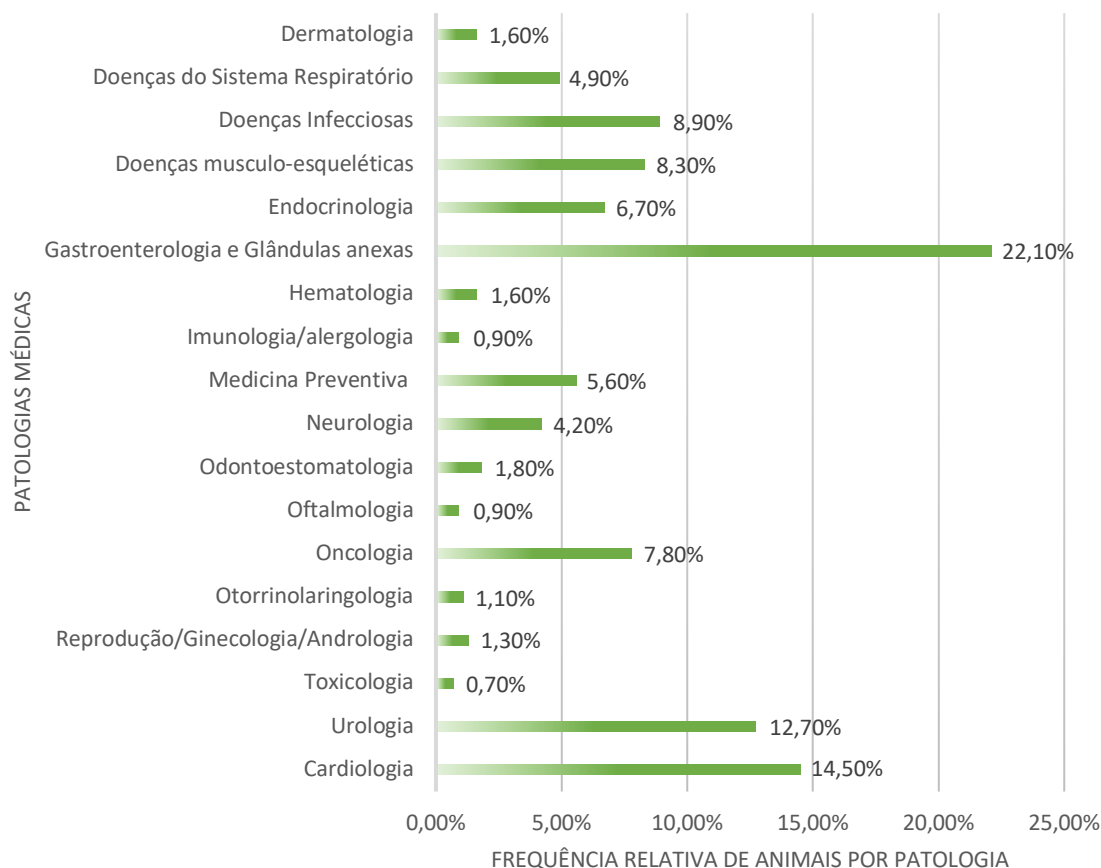


Gráfico 1 - Casuística das diferentes patologias médicas, em percentagem

Relativamente aos meios complementares de diagnóstico, os exames realizados consistiram em exames radiográficos; endoscópicos; ecográficos; ecocardiográficos; tomografias computadorizadas e ressonâncias magnéticas. A frequência relativa da realização destes exames está presente no gráfico abaixo apresentado (Gráfico 2).

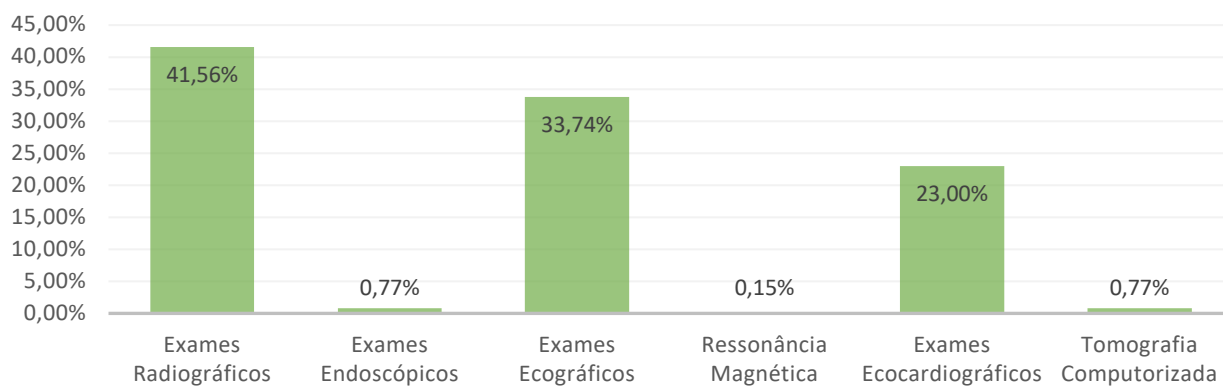


Gráfico 2 - Casuística dos diferentes exames realizados, em percentagem

Nas rotações de cirurgia e anestesia, a autora pôde participar em diferentes cirurgias como ajudante do cirurgião e/ou como ajudante do médico anestesista em todo o processo de preparação do animal, preparação e execução do protocolo anestésico, entubação e monitorização do animal durante a cirurgia. Por fim, foi possível auxiliar durante o período de recobro do paciente.

A autora, durante estas rotações, participou ou assistiu a diferentes tipos de cirurgia, como cirurgias ortopédicas, cirurgias de tecidos moles, cirurgias oftalmológicas, cirurgias minimamente invasivas e cirurgias cardiotorácicas. No gráfico seguinte é possível ver a casuística das diferentes cirurgias observadas com a sua respetiva frequência relativa (Gráfico 3).

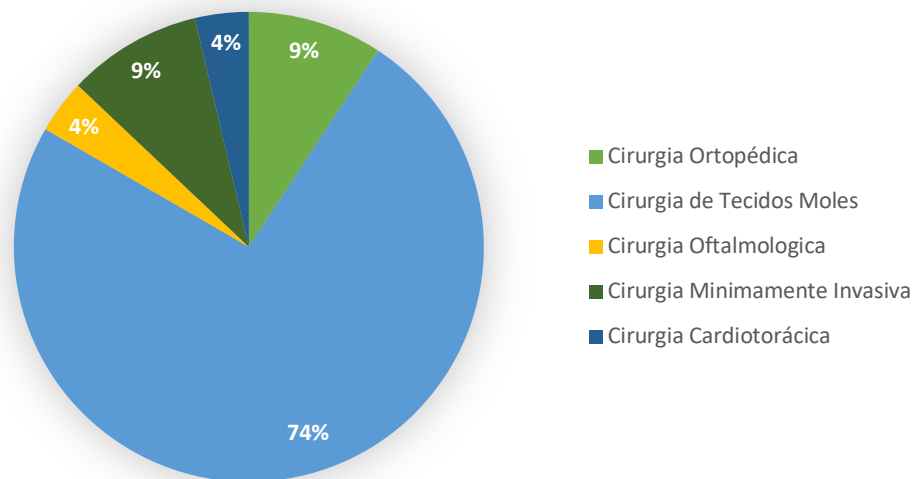


Gráfico 3 - Casuística das cirurgias observadas, em percentagem

No total, a autora pôde acompanhar 489 animais em todas as rotações acima mencionadas entre cães, gatos e exóticos.

Parte 2 – Introdução

1. Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral

Segundo Borgarelli e Haggstrom (2010), Bionda et al. (2020) e Bagardi et al. (2022), a doença degenerativa mixomatosa da válvula mitral (DDMVM), como resultado da degeneração mixomatosa, é a doença cardiovascular adquirida mais comum em cães, representando 75% das doenças cardiovasculares. Esta doença é também a causa mais frequente de insuficiência cardíaca congestiva em cães (Chetboul et al., 2017; Lam et al., 2021; O'Brien et al., 2021). A DDMVM é uma doença particularmente prevalente em raças pequenas e em animais de idade mais avançada (Bionda et al., 2020). Ainda que seja mais frequente em raças pequenas, também pode afetar raças grandes (Borgarelli & Haggstrom, 2010).

Esta é uma doença caracterizada por um longo período pré-clínico, e muitos dos animais acabam por falecer por outros motivos, sem nunca avançarem para insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Borgarelli & Haggstrom, 2010). O tempo de sobrevivência dos animais que progridem para ICC está relacionado com vários fatores, como a adesão à terapêutica por parte do tutor, a terapêutica em si, outras complicações cardiovasculares (hipertensão pulmonar ou rutura das cordas tendíneas) e ainda a existência de doenças concomitantes (Borgarelli & Haggstrom, 2010).

Estudos sugerem, que cães com ICC severa a moderada, causada por DDMVM, podem ter uma esperança média de vida relativamente longa com manejo médico (Borgarelli & Haggstrom, 2010).

1.1. Etiologia

Segundo Smith et al. (2016) e Keene et al. (2019), a causa da DDMVM continua a ser desconhecida, no entanto, a doença tem uma componente hereditária em algumas raças. A raça Cavalier King Charles Spaniel tem uma predisposição para o desenvolvimento de DDMVM em animais mais jovens, sem que a progressão da doença seja diferente da que acontece noutras raças pequenas (Keene et al., 2019; Meurs et al., 2019; Bionda et al., 2020). Estima-se que 90% dos animais desta raça desenvolvam DDMVM até aos 10 anos de idade (Parker & Kilroy-Glynn, 2012). Segundo um estudo de Menciotti et al (2018), existem várias diferenças estruturais entre a válvula mitral de cães da raça Cavalier King Charles e cães de outras raças, o que pode explicar a maior incidência de DDMVM nestes animais. É assim, a raça com mais problemas de bem-estar relacionados com a DDMVM (O'Brien et al., 2021).

Numa recente avaliação do genoma da raça Cavalier King Charles Spaniel, foi possível identificar duas regiões cromossômicas associadas à DDMVM, no entanto, não se conseguiu especificar quais são os genes envolvidos (Smith et al., 2016).

É frequente o diagnóstico de DDMVM em raças condrodistróficas, sendo comumente diagnosticada em animais com doenças como a broncomalácia e doenças dos discos intervertebrais, o que sugere que a DDMVM poderá ser uma expressão de uma doença sistêmica dos tecidos, no entanto esta relação ainda não foi provada (Smith et al., 2016).

Investigações recentes sobre a biologia molecular da doença e a sua biomecânica sugerem que existe uma interação complexa entre o stress mecânico e as cadeias de sinalização celular. Estas levam a alterações da expressão genética e à indução de fatores de crescimento, no entanto, ainda não foi possível encontrar uma explicação quanto à degenerescência mixomatosa que ocorre na válvula (Smith et al., 2016).

As evidências sugerem que a existente predisposição genética não se trata apenas de uma simples herança mendeliana, mas sim de uma característica poligénica ou monogénica sujeita a alterações por parte de fatores genéticos e/ou ambientais (Smith et al., 2016; Meurs et al., 2019; Bionda et al., 2020).

Assim sendo, o estudo e a aplicação de tecnologia genética avançada, com o objetivo de esclarecer os mecanismos patogénicos e a identificação do *locus* da predisposição genética, terão um papel importante no futuro, fornecendo informações que podem ter impacto no tratamento, prevalência e severidade da DDMVM (O'Brien et al., 2021).

1.2. Incidência e Fisiopatologia

A DDMVM é uma doença crónica cuja apresentação é variável. Alguns doentes são completamente assintomáticos, enquanto outros desenvolvem edema pulmonar (Borgarelli & Haggstrom, 2010). A DDMVM afeta mais comumente a válvula mitral, no entanto, em pelo menos 30% dos casos também afeta a válvula tricúspide (Keene et al., 2019).

A doença é aproximadamente 1,5 vezes mais prevalente em machos do que em fêmeas e também mais prevalente em animais com menos de 20 quilogramas (kg) (Keene et al., 2019). Ainda assim, animais com mais de 20 kg podem ser afetados, e quando o são, normalmente apresentam uma progressão de doença mais rápida com mais disfunção do miocárdio, tendo um prognóstico mais reservado (Keene et al., 2019).

A prevalência da DDMVM aumenta significativamente com o avanço da idade em animais de raças pequenas, sendo que 85% dos cães a partir dos 13 anos têm sinais de lesão valvular (Keene et al., 2019). A maioria dos animais com DDMVM apresenta um sopro anos antes de desenvolver insuficiência cardíaca (Keene et al., 2019).

Relativamente à válvula mitral, esta é constituída por seis componentes que garantem o seu funcionamento: a parte posterior esquerda da parede atrial; o anel fibroso; os folhetos da válvula mitral; as cordas tendíneas; os músculos papilares do ventrículo esquerdo, assim como as paredes do ventrículo esquerdo (Fox, 2012). A válvula é uma estrutura dinâmica cujo tamanho e formato muda ao longo do ciclo cardíaco (Fox, 2012).

A válvula mitral normal assegura que todo o sangue que se encontra dentro do ventrículo esquerdo é expelido através da aorta, no entanto, quando a válvula está incompetente, uma fração deste volume de sangue (fração de regurgitação) passa pelo orifício da válvula até ao átrio esquerdo (Smith et al., 2016).

A doença começa com a formação de pequenos nódulos nos folhetos valvulares, que vão aumentando progressivamente de tamanho, até se começarem a agregar e a envolver as cordas tendíneas, finalizando com a deformação dos folhetos e com espessamento, ou eventualmente, rutura das cordas tendíneas (Markby et al., 2017). A incompetência da válvula acontece devido a mudanças nos constituintes celulares, assim como na matriz intercelular do aparelho valvular, incluindo os folhetos valvulares e as cordas tendíneas (Keene et al., 2019). As alterações envolvem não só o alinhamento das fibras de colagénio da válvula, como também o conteúdo do colagénio (Keene et al., 2019). A expansão da camada esponjosa da válvula é caracterizada por alterações a nível dos proteoglicanos, que constituem esta mesma camada (Keene et al., 2019). A desregulação da matriz extracelular parece ser a causa de todas as alterações acima mencionadas (Keene et al., 2019). O que também pode influenciar a progressão da lesão valvular são as catecolaminas endógenas, bem como as citocinas inflamatórias, levando a subsequente remodelação do miocárdio e disfunção ventricular (Keene et al., 2019).

Sequencialmente, começa a haver uma deformação da estrutura valvular acabando por haver regurgitação, que progressivamente aumenta o débito cardíaco resultando em remodelação ventricular, neste caso, hipertrofia excêntrica do ventrículo e átrio esquerdos, culminando em disfunção ventricular (Keene et al., 2019). À medida que a regurgitação da válvula progride, a remodelação estrutural e funcional do coração descrita anteriormente leva a

um aumento da sobrecarga de volume, culminando em insuficiência cardíaca congestiva (Jung & Bohan, 2018).

A severidade da regurgitação mitral é determinada principalmente pelo tamanho do orifício de regurgitação e pela relação entre a pressão sistólica do átrio e do ventrículo esquerdo (Smith et al., 2016). A longo prazo, a regurgitação mitral aumenta a pressão no átrio esquerdo, o que faz com que este acabe por dilatar (Smith et al., 2016). A regurgitação mitral severa pode aumentar a pressão de enchimento do ventrículo esquerdo, que por sua vez se irá refletir num aumento da pressão da veia pulmonar, podendo dar início ao desenvolvimento de edema pulmonar (Smith et al., 2016).

A tosse, como consequência do edema pulmonar, é um possível sinal de ICC, no entanto, é também um sinal geral de doença respiratória e a sua presença num animal com sopro não deve ser um motivo para se iniciar qualquer terapia para ICC (Borgarelli & Haggstrom, 2010). Cães geriátricos de raça pequena apresentam comumente doenças traqueobrônquicas concomitantes com a DDMVM, sendo que nestes, a tosse deve-se à doença respiratória primária e não à doença cardíaca (Borgarelli & Haggstrom, 2010). Por isto, todos os animais que apresentem tosse e sopro típico de DDMVM ou sinais de ICC, devem realizar uma radiografia torácica (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Keene et al., 2019). Em animais com DDMVM, a tosse pode ser provocada por compressão do brônquio primário esquerdo, devido ao aumento do átrio esquerdo (Borgarelli & Haggstrom, 2010).

Segundo Keene et al. (2019), a progressão de alargamento do coração, o aumento da velocidade do sangue na onda E transmitral, o aumento da concentração sérica da porção aminoterminal do peptídeo natriurético tipo-B e o aumento da frequência cardíaca em descanso são fatores que antevêm o nível de progressão da doença, conseguindo identificar cães em risco de insuficiência cardíaca. O grau de mudança nas variáveis dos exames ecocardiográficos e radiográficos pode também permitir identificar animais em risco de insuficiência cardíaca ou morte por causa cardíaca (Keene et al., 2019).

Apesar das interações de todos os fatores acima mencionados, assim como o impacto das alterações na geometria anular da válvula mitral e o stress mecânico, a patogenia e progressão da DDMVM ainda não é completamente compreendida (Keene et al., 2019).

1.3. Classificação

Em 2009, o painel de médicos veterinários pertencentes ao *consensus* do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária, criou uma classificação para a DDMVM que continua a ser utilizada nos dias de hoje, apenas com algumas alterações.

Segundo Keene et al. (2019), esta classificação tem vários objetivos, como a realização de exames imagiológicos a animais com alto risco de desenvolvimento de DDMVM; a implementação de intervenções que diminuam o risco do desenvolvimento e/ou progressão da doença; identificação precoce dos animais assintomáticos e sintomáticos, para que haja um melhor manejo clínico.

De acordo com esta abordagem, é expectável que os doentes passem de um estágio para o estágio seguinte, à medida que a doença evolui, sem que voltem a ser classificados com o estágio anterior, independentemente da sua resposta à terapêutica implementada (Keene et al., 2019).

A tabela 1 descreve os quatro estádios de doença, segundo Keene et al. (2019).

Tabela 1 - Tabela resumo da classificação dos estádios da Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral. DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral. (Adaptado de Keene et al. (2019)).

Estádio A	Cães com maior risco de desenvolver DDMVM, mas que ainda não têm alterações estruturais identificáveis.		
Estádio B	Cães com alterações estruturais compatíveis com DDMVM, mas que não apresentam sinais clínicos.	Estádio B1	Cães assintomáticos, sem evidência radiográfica ou ecocardiográfica de remodelação cardíaca.
		Estádio B2	Cães assintomáticos com regurgitação mitral e que apresentam sinais de remodelação cardíaca.
Estádio C	Cães que apresentam, ou já apresentaram sinais de insuficiência cardíaca causados por DDMVM.		
Estádio D	Cães em estágio terminal de DDMVM em que a insuficiência cardíaca é refratária ao tratamento standard.		

1.4. Diagnóstico

Segundo Borgarelli e Haggstrom (2010), pode-se suspeitar de DDMVM quando à auscultação é audível um sopro sistólico de maior intensidade no ápex cardíaco esquerdo, resultante da regurgitação da válvula mitral. Em raças pequenas, segundo Ljungvall et al. (2014), a maior intensidade do sopro não é proporcional à severidade da doença, mas sopros de baixa intensidade são altamente sugestivos de doença ligeira. Em raças grandes/gigantes, nenhuma das relações anteriores prevalece, pois nestas a DDMVM está associada a fibrilhação atrial e enfarte do miocárdio, sendo que ambas as condições podem afetar a intensidade do sopro (Borgarelli e Haggstrom, 2010).

Em casos mais severos, o sopro é audível no hemitórax direito e na base cardíaca esquerda, como consequência do aumento do átrio e ventrículo esquerdo e, em alguns pacientes, há presença de regurgitação da tricúspide (Borgarelli e Haggstrom, 2010).

Ainda que a presença de um sopro sistólico apical esquerdo em raças tipicamente afetadas pela doença seja altamente sugestivo de DDMVM, é necessária a confirmação do diagnóstico por exame ecocardiográfico para descartar a presença de outras doenças cardiovasculares que levam ao desenvolvimento de regurgitação mitral, como a displasia da válvula mitral (Borgarelli e Haggstrom, 2010). O exame ecocardiográfico deve ser feito para responder a questões relativas à causa do sopro de regurgitação mitral e para verificar se existe ou não aumento das câmaras cardíacas (Borgarelli e Haggstrom, 2010).

Os achados ecocardiográficos compatíveis com DDMVM incluem o prolapso ou o aumento da espessura de um ou mais folhetos da válvula mitral (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Keene et al., 2019). A ecocardiografia pode ainda fornecer informações importantes relativas à severidade da doença, tais como, o grau de aumento das câmaras cardíacas, a presença de disfunção sistólica ou diastólica e ainda o diagnóstico de hipertensão pulmonar (Borgarelli & Haggstrom, 2010). Recorrendo às medições realizadas no exame ecocardiográfico, são executados vários cálculos, entre eles, o rácio átrio esquerdo/aorta, que deve ser inferior a 1,6; quando é igual ou superior indica-nos que o átrio esquerdo está aumentado (Baron Toaldo et al., 2016; Smith et al., 2016; Keene et al., 2019). Outro cálculo efetuado é o diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado para o peso corporal (LVIDDN). Este cálculo é importante devido à heterogeneidade da população canina, sendo uma maneira de ter as diferenças de tamanho dos animais em consideração (Smith et al., 2016). Quando o LVIDDN

é superior a 1,7 indica-nos que o ventrículo esquerdo está aumentado (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Em suma, o exame ecocardiográfico com vista ao diagnóstico e avaliação da severidade da DDMVM é baseado na remodelação cardíaca, na quantificação da regurgitação mitral e na pressão de enchimento ventricular (pressão diastólica) (O'Brien et al., 2021; Vezzosi et al., 2021).

É ainda recomendado fazer radiografias torácicas para avaliar a significância hemodinâmica da regurgitação mitral, e para obter uma imagem de referência de quando os animais ainda são assintomáticos (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Keene et al., 2019).

Ainda que se recomende a ecocardiografia como meio de diagnóstico definitivo e de estadiamento, esta não está disponível nem é monetariamente acessível a todos os animais, principalmente em clínicas generalistas (Lam et al., 2021). Por isso, é recomendado o uso de radiografias torácicas nestes casos, recorrendo à medição do índice cardíaco vertebral para identificar animais no estágio B2 (Lam et al., 2021).

Segundo Keene et al. (2019), as recomendações de diagnóstico variam consoante o estágio da doença, podendo ser resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela resumo do diagnóstico de Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral nos diferentes estádios.
DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral; AE:AO – Rácio Ário Esquerdo:Aorta; LVIDDN – Diâmetro Interno do Ventrículo Esquerdo em Diástole Normalizado para o peso corporal; NT-proBNP – porção aminoterminal dos peptídeos natriuréticos tipo-B (Adaptado de Keene et al. (2019)).

Estádio A		Animais com predisposição genética para o desenvolvimento de DDMVM devem fazer exames cardíacos anuais.	
Estádio B	Auscultação de sopros cardíacos; Realização de radiografia torácica;	Estádio B1	Cães sem alterações nas dimensões das câmaras cardíacas e índice cardíaco vertebral normal; Cães com aumentos das câmaras cardíacas esquerdas, mas inferiores ao estágio B2.
	Medição da pressão arterial; Realização de exame ecocardiográfico;	Estádio B2	Sopros cardíacos de grau superior ou igual a três em seis; Rácio AE:AO no início da diástole superior ou igual a 1,6;

	LVIDDN superior ou igual a 1,7; Índice cardíaco vertebral superior a 10,5;
Estádio C	Sintomatologia clínica compatível com insuficiência cardíaca esquerda como: taquipneia, intolerância ao exercício, dificuldade respiratória e tosse; Realização de hemograma, análises bioquímicas e à urina para avaliar a função renal; Ecocardiografia com Doppler; Concentração sérica de NT-proBNP; Medição da pressão arterial.
Estádio D	É recomendado o mesmo processo de diagnóstico que no estágio C, sendo necessário começar o tratamento para perceber que o doente não responde à terapêutica, avançando assim para o estágio D.

1.4.1. Biomarcadores

Os biomarcadores são características objetivas que podem ter um papel importante no diagnóstico, quantificação de risco, avaliação da progressão da doença e responsividade do doente à terapêutica implementada (Smith et al., 2016).

Ao longo dos anos tem-se vindo a investigar a relação entre vários biomarcadores sanguíneos como a endotelina, a troponina I, peptídeos natriuréticos atriais, o peptídeo natriurético tipo-B (PNB) e a doença mitral ou a insuficiência cardíaca nos cães (Smith et al., 2016).

O PNB é libertado pelos cardiomiócitos atriais e ventriculares em resposta ao aumento da pressão de enchimento dos ventrículos (Smith et al., 2016). São, por isso, biomarcadores importantes para a avaliação da presença e severidade da insuficiência cardíaca (Smith et al., 2016). Para além disso, a concentração do PNB está relacionada com a presença e severidade da DDMVM (Smith et al., 2016). A diminuição da concentração do PNB em animais já medicados para a DDMVM é preditivo da eficácia do tratamento (Smith et al., 2016). O aumento da concentração de PNB distingue também os animais com dificuldade respiratória causada por insuficiência cardíaca, dos animais com dificuldade respiratória causada por

doenças do trato respiratório com uma sensibilidade e especificidade superiores a 80% (Smith et al., 2016).

Também tem sido estudado a relação entre o PNB e o prognóstico, existindo uma relação não só relativamente à severidade da doença, como também entre a concentração da porção aminoterminal do peptídeo natriurético tipo-B (NT-ProPNB) e a mortalidade do animal (Smith et al., 2016).

Em humanos, o PNB têm sido considerados não só um excelente biomarcador para identificar a presença de ICC, como também para identificar doentes em risco de desenvolvimento de ICC ou morte (Borgarelli & Haggstrom, 2010). Estudos provaram que a NT-proBNP está relacionada com a severidade da regurgitação mitral (Borgarelli & Haggstrom, 2010). Isto acontece porque o aumento da sobrecarga de volume (relacionada com a severidade da regurgitação) provoca tensão na parede do miocárdio, que por sua vez aumenta a produção de PNB nos cardiomiócitos (Jung & Bohan, 2018).

A troponina I é uma proteína reguladora do miocárdio que é libertada aquando de lesão nos cardiomiócitos (Smith et al., 2016). O aumento da sua concentração no sangue é normalmente um indicador de necrose (Smith et al., 2016).

No entanto, por vezes, outras doenças sistémicas podem afetar a produção e excreção destes biomarcadores (troponina I e NT-proBNP), resultando em falsos positivos ou falsos negativos diagnósticos de ICC (Jung & Bohan, 2018). Por este motivo, biomarcadores específicos de cada estágio da doença cardíaca são necessários para determinar o estágio de DDMVM do animal, aumentar a precisão do diagnóstico e prever mais fielmente o prognóstico (Jung & Bohan, 2018).

Os microRNA são conhecidos como reguladores cruciais da expressão genética, tanto no desenvolvimento do coração como nas patologias cardíacas (Jung & Bohan, 2018). Estes são extremamente resistentes e circulam no sangue, o que sugere que possam ser excelentes biomarcadores para várias doenças cardíacas (Jung & Bohan, 2018).

1.5. Tratamento

Segundo Keene et al. (2019), as recomendações de tratamento para a DDMVM variam consoante o estágio, devendo ser ajustadas a cada caso. Nos estádios C e D, as recomendações dividem-se em tratamento hospitalar, para situações agudas, e em tratamento crónico, que é feito em casa (Keene et al., 2019; Bagardi et al., 2022).

1.5.1. Estádio A

Para este estágio, não está recomendado nenhum tratamento farmacológico ou dietético, recomendando-se apenas, que estes animais não sejam utilizados como reprodutores, caso apresentem evidências de sopro ou regurgitação mitral detetada ecocardiograficamente (Keene et al., 2019).

1.5.2. Estádio B1

Não é recomendado nenhum tipo de tratamento, uma vez que não existe evidência de que seja eficaz neste estágio, mas recomenda-se a repetição do exame ecocardiográfico em 6 a 12 meses (Keene et al., 2019).

1.5.3. Estádio B2

Para este estágio, os especialistas recomendam terapia farmacológica com pimobendan (0,25 - 0,3 mg/Kg PO q12h) (Keene et al., 2019). O tratamento com pimobendan vai atrasar o desenvolvimento de ICC, e reduzir a taxa de mortalidade (Häggström et al., 2013; Boswood et al., 2016; Lam et al., 2021). Ainda que não seja consensual, alguns especialistas recomendam adicionalmente a administração de IECAS (inibidores da enzima de conversão da angiotensina) (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019). A utilização de espironolactona por rotina, não está recomendada para atrasar a insuficiência cardíaca (Keene et al., 2019). Em casos mais avançados, e em circunstâncias específicas, alguns especialistas recomendam a utilização de amlodipina e beta-bloqueadores (Keene et al., 2019; Bagardi et al., 2022).

Como tratamento dietético, está recomendado uma ligeira redução do sódio, oferecendo ao animal uma alimentação bastante palatável para manter a condição corporal (Keene et al., 2019).

Alguns especialistas recomendam a utilização de antitússicos quando os doentes apresentam tosse causada pela pressão que a cardiomegalia inflige sobre os brônquios (Keene et al., 2019).

1.5.4. Estádio C

Segundo Keene et al. (2019), para o estágio C existe a recomendação de tratamento dietético. A caquexia cardíaca é definida como a perda de músculo ou massa magra, associada à insuficiência cardíaca (Keene et al., 2019). Tem um mau prognóstico, sendo mais fácil de prevenir do que de tratar (Keene et al., 2019). Por isso, para prevenir a perda de peso, deve-se

manter um consumo calórico adequado, que neste estágio deverá ser cerca de 60 kcal/kg por dia (Keene et al., 2019). Para aumentar o apetite, devem ser aplicadas estratégias como: aquecer a comida, oferecer ração húmida juntamente com ração seca e variar de alimentação (Keene et al., 2019). Deve-se ainda assegurar que o animal ingere uma quantidade apropriada de proteína, evitando rações com baixo teor proteico, comumente utilizadas no tratamento da insuficiência renal (Keene et al., 2019). O consumo de sódio deve ser reduzido em todos os alimentos oferecidos ao animal (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Caso o doente sofra de anorexia, devem ser feitos esforços para tratar todas as causas que a possam estar a provocar (Keene et al., 2019). Nas consultas, deve ser mantido um registo da condição corporal e peso do animal, por forma a monitorizar e avaliar possíveis causas para alterações significativas em ambos os indicadores (Keene et al., 2019).

Em todos os doentes com diminuição de apetite, perda de músculo ou arritmias, deve-se considerar a suplementação com ácidos gordos ómega-3 (Keene et al., 2019; Nasciutti et al., 2021).

1.5.5. Estádio C – Tratamento Hospitalar

O tratamento para a insuficiência cardíaca aguda que acontece neste estágio, tem como principais objetivos: regularização da oxigenação dos tecidos e regularização do estado hemodinâmico do doente (Keene et al., 2019). Com estes objetivos, devemos monitorizar e otimizar a pré-carga, a pós-carga, a frequência cardíaca, a contratilidade e a oxigenação (Keene et al., 2019).

Para o tratamento agudo/hospitalar dos animais no estágio C, os especialistas recomendam furosemida (2 mg/kg IV ou IM) de hora a hora, até melhoria da sintomatologia respiratória, ou até 8 mg/kg ao fim de quatro horas (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Em casos de edema pulmonar associados a dispneia severa, recomenda-se iniciar infusão contínua (CRI) de furosemida (0,66 - 1 mg/kg/hora), após o bólus inicial (Keene et al., 2019). Durante o tratamento com furosemida, o animal deve ter sempre água à sua disposição (Keene et al., 2019).

Está recomendada a administração de pimobendan (0,25 - 0,3 mg/kg PO q12h) (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Para animais que não respondam adequadamente aos diuréticos, nem ao pimobendan, recomenda-se a adição de dobutamina (2,5 - 10 µg/Kg/minuto) em infusão contínua, com

aumento progressivo da dose, para melhorar a função do ventrículo esquerdo (Keene et al., 2019). Durante a infusão, recomenda-se a monitorização do paciente, recorrendo a um eletrocardiograma (Keene et al., 2019). A dose de dobutamina deve ser reduzida caso se verifique taquicardia ou batimentos ectópicos (Keene et al., 2019).

Alguns especialistas recomendam adicionalmente a administração de IECAs, como o enalapril ou o benazepril (0,5 mg/kg PO q12h) no tratamento agudo, ainda que, a sua evidência científica remeta ao tratamento crónico da doença (Keene et al., 2019).

Caso seja necessário sedação em animais dispneicos, para melhor controlo da sua sintomatologia, os especialistas recomendam a utilização de butorfanol (0,2 - 0,25 mg/kg IM ou IV) (Keene et al., 2019).

Para auxiliar na diminuição de efusões que estejam a causar dificuldade respiratória e desconforto, recomenda-se a realização de toracocentese e/ou abdominocentese (Keene et al., 2019).

1.5.6. Estádio C – Tratamento Crónico

Para o tratamento crónico de cães em estágio C, os especialistas recomendam a junção de quatro fármacos: furosemida/torasemida, espironolactona, IECA e pimobendan.

Recomenda-se a administração de furosemida (2 mg/Kg PO q12h), ou a dose necessária para manter o doente confortável (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019; Bagardi et al., 2022). Alguns especialistas preferem substituir a furosemida por torasemida (0,1 – 0,3 mg/Kg PO q24h ou aproximadamente 5 a 10 % da dose de furosemida) (Chetboul et al., 2017; Keene et al., 2019; Besche et al., 2020).

No entanto, um animal que necessite de fazer uma dose de furosemida superior ou igual a 8 mg/Kg PO em 24h (ou o equivalente em torasemida) para se manter confortável, mesmo com doses apropriadas dos restantes três fármacos (pimobendan, IECAs e espironolactona), indica progressão da doença para o estágio D (Keene et al., 2019).

Os especialistas recomendam a administração de enalapril ou benazepril (0,5 mg/Kg PO q12h), espironolactona (2 mg/Kg PO q12/24h) e pimobendan (0,25 – 0,30 mg/Kg PO q12h) (Keene et al., 2019; Guillot et al., 2021; Bagardi et al., 2022).

Recomenda-se a realização de ionograma e a medição da creatinina e ureia séricas entre 3 a 14 dias após o início do tratamento (Keene et al., 2019; Besche et al., 2020).

É muito importante que os tutores realizem em casa medições regulares da frequência respiratória em repouso, pois o aumento da mesma pode significar a descompensação do doente (Keene et al., 2019).

Em casos em que haja presença de fibrilhação atrial, recomenda-se a administração de diltiazem, muitas vezes em combinação com digoxina (Keene et al., 2019; Bagardi et al., 2022). A dose de diltiazem deve ser a menor possível, devendo ser ajustada gradualmente até ao controlo da frequência cardíaca (Keene et al., 2019). A digoxina deve ser administrada oralmente, a cada 12 horas, numa dose de 0,0025 a 0,005 mg/kg (Keene et al., 2019).

Pode ser necessário a utilização de antitússicos ou broncodilatadores (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

1.5.7. Estádio D

Devido aos poucos ensaios clínicos e à diversidade de sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes deste estágio, é difícil apresentar indicações terapêuticas específicas (Keene et al., 2019).

O estágio D requer uma dose diária de furosemida superior a 8 mg/kg, ou o equivalente em torasemida, para controlo dos sinais clínicos, associados à insuficiência cardíaca, em conjunto com: enalapril ou benazepril (0,5 mg/Kg PO q12h), espironolactona (2 mg/Kg PO q12/24h) e pimobendan (0,25 – 0,30 mg/Kg PO q12h) (Keene et al., 2019; Guillot et al., 2021).

1.5.8. Estádio D – Tratamento Hospitalar

Para os doentes no estágio D em tratamento hospitalar que estejam dispneicos, pode ser administrada mais furosemida, começando com bólus de 2 mg/kg IV, seguido de mais doses de bólus ou uma infusão contínua de 0,66 a 1 mg/kg/h até normalização da frequência respiratória, ou até um máximo de quatro horas (Keene et al., 2019). É importante ter em atenção a função renal destes animais (Besche et al., 2020).

Doentes que já não são responsivos à furosemida devem passar para torasemida (0,1 – 0,2 mg/Kg q12/24h), uma vez que a diurese induzida pela torasemida provoca menor ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, comparativamente com mais doses de furosemida (Keene et al., 2019). Após a diurese começar é importante que o animal tenha acesso livre a água (Keene et al., 2019).

Neste estágio, recomenda-se a redução da pós-carga, recorrendo a fármacos como a amlodipina (0,05 - 0,1 mg/kg até efeito desejado PO) (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Quando o animal não está estável o suficiente para conseguir esperar pelos efeitos da medicação oral, recomenda-se iniciar infusão contínua de dobutamina, começando numa dose de 1 µg/kg/minuto, e aumentado gradualmente a cada 15 a 30 minutos, até obter o melhor resultado com a mínima dose possível, num máximo de 10 a 15 µg/kg/minuto (Keene et al., 2019). As doses podem ser mantidas durante 12 a 48 horas (Keene et al., 2019).

Recomenda-se a administração destes fármacos em associação com pimobendan e benazepril/enalapril, sendo que, a dose de pimobendan pode ser aumentada, passando a 0,3 mg/kg q8h PO (Keene et al., 2019). Alguns especialistas recomendam ainda uma dose adicional de pimobendan no momento de admissão do doente, independentemente da hora a que o animal tenha feito a última dose (Keene et al., 2019).

Em animais que apresentem sinais clínicos de hipertensão pulmonar, recomenda-se sildenafil (1 – 2 mg/Kg PO q8h) (Brown et al., 2010; Keene et al., 2019).

Devem ser realizadas técnicas de abdominocenteses e/ou toracocenteses, sempre que necessário, para diminuir o desconforto e o stress respiratório (Keene et al., 2019).

Broncodilatadores podem ser necessários (Keene et al., 2019).

Recomenda-se, por fim, a medição da concentração de creatinina sérica, no máximo até 72 horas após o início do tratamento (Keene et al., 2019).

1.5.9. Estádio D – Tratamento Crónico

No tratamento crónico do estágio D, a dose de furosemida/torasemida deve aumentar progressivamente, até ao necessário para diminuir a acumulação de líquido, monitorizando a ureia e creatinina 12 a 48 horas após o aumento da dose para avaliar a função renal (Keene et al., 2019). Como no estágio C, animais não responsivos a furosemida devem substituir a mesma por torasemida (Keene et al., 2019; Besche et al., 2020).

Recomenda-se a administração de espironolactona, para o tratamento de doentes crónicos (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019; Guillot et al., 2021; Bagardi et al., 2022).

Alguns especialistas recomendam também o aumento da dose de pimobendan (0,3 mg/kg PO TID) (Keene et al., 2019).

Para redução da pós carga, recomenda-se a utilização de amlodipina, que pode ter benefícios hemodinâmicos, e ainda ajuda a reduzir a frequência da tosse que os animais possam apresentar (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Em caso de fibrilhação atrial, alguns especialistas recomendam a administração de digoxina (0,0025 – 0,005 mg/Kg PO q12h), assim como acontece no estágio C (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Em animais com sinais clínicos de esforço físico e ascite provocados por hipertensão pulmonar, recomenda-se sildenafil (1-2 mg/Kg PO q8h) (Brown et al., 2010; Keene et al., 2019).

Assim como no estágio C, alguns especialistas recomendam iniciar antitússicos e broncodilatadores para a tosse crónica, que está muitas vezes presente em animais deste estágio (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

Relativamente ao tratamento dietético, devem ser tidas em conta as mesmas recomendações descritas no estágio C (Keene et al., 2019).

A tabela 3 apresentada em baixo, contempla um resumo das recomendações terapêuticas, para cada estágio, desenvolvido pelo *consensus* do Colégio Americano De Medicina Interna Veterinária em 2019.

Tabela 3 - Tabela resumo do tratamento recomendado para cada estágio da Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral. CRI – Infusão contínua; IECAS - Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina; mg – miligrama; Kg – quilograma; PO – administração oral; IV – intravenoso; IM – intramuscular; q – a cada; h – hora; µg – micrograma. (Adaptado de Keene et al. (2019)).

Estádio A Não é recomendado nenhum tipo de tratamento.	
Estádio B	Estádio B1 Não é recomendado nenhum tipo de tratamento; Repetição do exame ecocardiográfico em 6 a 12 meses.
	Estádio B2 Pimobendan (0,25 - 0,3 mg/Kg PO q12h); Metade do painel de especialistas recomenda utilização de IECAS; A utilização de espironolactona e betabloquadores por rotina não é recomendada; Alguns especialistas utilizam amlodipina em casos específicos; Alguns especialistas recomendam a utilização de antitússicos.

Estádio C	Furosemida (2 mg/kg IV ou IM) de hora a hora, até melhoria dos sinais respiratórios, ou até se atingir 8 mg/kg em quatro horas; Pimobendan (0,25 - 0,3 mg/kg PO q12h); CRI de dobutamina (2,5 a 10 µg/Kg/minuto); IECAs (0,5 mg/kg PO q12h); Caso seja necessário sedação, usar butorfanol (0,2 - 0,25 mg/kg IM ou IV); Tratamento Hospitalar Acesso livre a água; Oxigenoterapia, quando necessário; Colocar o animal em decúbito external, com a cabeça elevada com almofadas; Toracocentese e/ou abdominocentese, para ajudar a diminuir efusões; Monitorização do ritmo cardíaco, recorrendo a um eletrocardiograma.
	Furosemida (2 mg/Kg PO q12h) ou torasemida (0,1 – 0,3 mg/Kg PO q24h ou aproximadamente 5 a 10 % da dose de furosemida); Enalapril ou benazepril (0,5 mg/Kg PO q12h); Espironolactona (2 mg/Kg PO q12/24h); Pimobendan (0,25 - 0,3 PO q12h); Recomenda-se a realização de análises sanguíneas, 3 a 14 dias após o início do tratamento; Medição da frequência respiratória em repouso; Se houver fibrilhação atrial, administrar diltiazem e digoxina (0,0025 – 0,005 mg/Kg PO q12h); Pode ser necessário a utilização de antitússicos ou broncodilatadores. Tratamento Crónico
Estádio D	Tratamento Hospitalar Em pacientes dispneicos pode ser administrado mais furosemida, começando com bólus de 2 mg/kg IV, seguido de mais doses de bólus, ou uma infusão continua de 0,66 a 1 mg/kg/h;

	Doentes não responsivos à furosemida devem passar para torasemida; Redução da pós-carga recorrendo a amlodipina (0,05 - 0,1 mg/kg até efeito desejado PO), ou uma infusão continua de dobutamina, começando com 1 µg/kg/minuto, e aumentando a cada 15 a 30 minutos num máximo de 10 a 15 µg/kg/minuto; A dose de pimobendan pode ser aumentada (0,3 mg/kg PO q8h); Recomenda-se sildenafil (2 mg/kg PO q8h) para hipertensão pulmonar; Abdominocentese e/ou toracocentese sempre que necessário; Oxigenoterapia; Broncodilatores podem ser necessários; Medição da concentração de creatinina sérica; Acesso livre a água.
Tratamento Crónico	A dose de furosemida/torasemida deve aumentar progressivamente, até ao necessário para diminuir a acumulação de líquido; Recomenda-se a administração de espironolactona; Recomenda-se o aumento da dose de pimobendan para 0,3 mg/kg q8h; Para redução da pós carga usar amlodipina; Em caso de fibrilhação atrial, recomenda-se a administração de digoxina (0,0025 - 0,005 mg/kg PO q12h); Iniciar antitússicos e broncodilatadores se necessário.

2. MicroRNA

Nos humanos, apenas 1 a 2% do genoma codifica proteínas, a restante e maior parte dá origem ao ácido ribonucleico (RNA) não codificante, do qual faz parte o microRNA (miRNA)

(Condorelli et al., 2014; Siddeek et al., 2018). Estima-se que mais de 60% dos genes codificadores de proteínas sejam regulados por miRNAs em humanos, no entanto, até à data, apenas 453 foram identificados em cães (Li et al., 2015; Jung & Bohan, 2018).

Os miRNAs são pequenos RNA reguladores não codificantes, constituídos por 19 a 24 nucleótidos, que se ligam ao RNA inibindo ou regulando a sua expressão (Maegdefessel, 2014; Li et al., 2015; Beg et al., 2017; Jung & Bohan, 2018; Siddeek et al., 2018; Ro et al., 2021). Foram descobertos em 1993, e nessa altura, pensava-se que só tinham uma função relevante noutras espécies que não em mamíferos (Pillai, 2005; Van Rooij, 2011). Nesse projeto foi descrito o primeiro miRNA, o *lin-4* que controlava o desenvolvimento do nematode *C. elegans* (Azevedo & E. Sunkel, 2012). A descoberta destes miRNAs mudou a perceção que se tinha do desenvolvimento de doenças, especialmente das doenças cardiovasculares (Fiedler et al., 2018).

Existem várias vias de formação dos miRNA maduros, no entanto, a mais conhecida é a que está dependente da Drosha (Azevedo & E. Sunkel, 2012). A formação dos miRNA começa com a transcrição de uma sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA), que por ação da RNA polimerase II forma um transcrito primário: pri-miRNA; por sua vez, o pri-miRNA passa por um processo de clivagem composto por dois principais componentes, a Drosha (uma endorribonuclease) e a DGCR8/Pasha (uma proteína de dupla cadeia de ligação a RNA), dando origem ao pre-miRNA. Seguidamente, o pre-miRNA passa para o citoplasma através da exportina-5, onde é clivado pela Dicer (uma endorribonuclease), transformando-se por fim em miRNA maduro (Azevedo & E. Sunkel, 2012; Siddeek et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, os miRNA vão inibir ou regular a expressão do RNA, e isto acontece através de um mecanismo chamado silenciamento pós-transcricional (Azevedo & E. Sunkel, 2012). Estes vão causar a degradação ou reprimir a tradução dos mRNA, podendo somente um miRNA afetar vários mRNA (Azevedo & E. Sunkel, 2012). Este processo acontece quando há associação de uma cadeia de miRNA com uma proteína da família argonauta, formando o complexo enzimático ao qual se dá o nome de complexo indutor do silenciamento do RNA (RISC) (Azevedo & E. Sunkel, 2012). Após a formação do complexo, o miRNA vai emparelhar com a sequência complementar no mRNA alvo, provocando assim a degradação desse mesmo mRNA, ou inibindo a sua tradução (Azevedo & E. Sunkel, 2012).

Ainda que a maior parte do miRNA se encontre no interior do citoplasma, este pode sair das células, podendo ser encontrado no sangue, plasma, urina e na saliva (Min & Chan, 2015; Sanchis-Gomar et al., 2021). O miRNA pode sair das células ativamente, através de exossomas,

ou de forma passiva quando os tecidos sofrem danos, quando há morte celular ou durante processos inflamatórios (Beg et al., 2017; Dlouha et al., 2021). Contrariamente aos miRNAs que circulam livremente, os miRNAs que se encontram em exossomas são normalmente libertados para atuarem num órgão específico (Beg et al., 2017).

Em estudos recentes, os miRNAs em circulação extracelular têm sido descritos como muito estáveis, e por isso podem ser considerados potenciais biomarcadores sanguíneos de doenças, incluindo as doenças cardíacas (Li et al., 2015; Min & Chan, 2015; Beg et al., 2017; Jung & Bohan, 2018; Siddeek et al., 2018; Dlouha et al., 2021). Estes conseguem suplantar condições extremas como: ebulição, meios com pH ácido ou básico, armazenamento à temperatura ambiente por longos períodos de tempo e vários ciclos de congelação/descongelação (Min & Chan, 2015; Reis-Ferreira et al., 2022). A sua resistência deve-se ao facto de se ligarem a moléculas, (por vezes, proteínas) que lhes concedem proteção contra fatores de degradação (Min & Chan, 2015; Reis-Ferreira et al., 2022).

Em humanos, muitos miRNAs têm como função o desenvolvimento e funcionamento do coração e dos vasos sanguíneos, promovendo ou inibindo a proliferação de células sanguíneas (Zidar et al., 2011; Min & Chan, 2015; Siddeek et al., 2018; Çakmak & Demir, 2020). Isto acontece, dado o facto de os miRNAs terem como função regular a expressão genética (Siddeek et al., 2018). O papel dos miRNAs no desenvolvimento do miocárdio foi primeiramente descrito em drosófilas, nas quais foi identificado o miR-1, agora conhecido como um dos miRNA mais expressados pela musculatura cardíaca (Condorelli et al., 2014).

Outros estudos mostram que os miRNA estão envolvidos não só no desenvolvimento cardíaco, como também têm um papel crucial na fisiopatologia das doenças cardiovasculares (Zidar et al., 2011; Min & Chan, 2015; Arroyo et al., 2018; Siddeek et al., 2018; Ro et al., 2021). Em 2006 foi publicado o primeiro estudo que correlacionava a alteração da concentração de miRNAs com a remodelação cardíaca em ratos e em humanos (Van Rooij, 2011).

Até à data, vários estudos mostram que cães com DDMVM apresentam uma alteração da concentração dos miRNAs circulantes no sangue (Ro et al., 2021). O mesmo não se verifica em animais com cardiomiopatia dilatada (Ro et al., 2021). No entanto, só existe um estudo que relaciona miRNAs com a cardiomiopatia dilata em cães, e a ausência de significância estatística pode dever-se ao número reduzido da amostra (apenas oito animais) (Steudemann et al., 2013).

As alterações que ocorrem na expressão dos genes e dos miRNAs em animais em estádios avançados da doença são a chave para melhor se compreender a patogenia da DDMVM

(O'Brien et al., 2021). Até ao momento, vários genes e miRNAs têm sido identificados com expressões diferentes em animais saudáveis e animais com DDMVM (O'Brien et al., 2021). Também têm sido identificadas alterações nas concentrações de miRNAs nos músculos do átrio e do ventrículo antes e depois do animal desenvolver ICC, como por exemplo, o aumento da concentração do miR-21 e do miR-146b (Yang et al., 2017). Segundo o estudo realizado por Yang et al. (2017), a desregulação de dois miRNAs específicos, o miR-9 e o miR-599 precede a insuficiência cardíaca. Segundo Yang et al. (2017), alguns miRNAs vão diminuindo a sua concentração com o avançar da idade, o que pode ter implicações no desenvolvimento da DDMVM, uma vez que esta é uma doença cuja prevalência aumenta com o aumento da idade dos animais.

Para além do seu importante papel no desenvolvimento cardíaco e na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, como descrito anteriormente, os miRNA podem ainda ser importantes agentes terapêuticos, podendo afetar vários genes ao mesmo tempo (Siddeek et al., 2018; Çakmak & Demir, 2020). A sua utilização no tratamento pode acontecer de duas formas: administrando miRNAs por forma a diminuir a expressão de outros miRNAs; administrando miRNAs exógenos para aumentar a expressão de miRNAs cuja concentração está diminuída (Condorelli et al., 2014; Çakmak & Demir, 2020). Investigar o potencial terapêutico dos miRNA é extremamente importante na DDMVM, dada a elevada taxa de mortalidade que a doença apresenta em animais idosos e em animais que desenvolveram ICC com a terapêutica convencional (Yang et al., 2017).

2.5. MiR-146a

Em humanos, à família do miR-146 pertencem dois genes, o miR-146a e o miR-146b, que estão localizados em cromossomas diferentes, e na maioria dos casos regulam processos diferentes (Paterson & Kriegel, 2017). No entanto, estes têm sequências praticamente iguais, e por isso, pensa-se que tenham os mesmos genes alvo (Paterson & Kriegel, 2017).

Os pri-miRNA são transcritos de 2 genes, o MIR146A e o MIR146B, sendo que em humanos, o 146a está localizado no MIR3142HG, que por sua vez se localiza no cromossoma 5q33.3 (Paterson & Kriegel, 2017). A forma madura dos miR-146 a/b mantém-se constante entre as diferentes espécies (Paterson & Kriegel, 2017). Ainda que seja possível encontrar o miR-146a em várias células cardíacas, este parece ser mais frequente nas células endoteliais, sendo que vários estudos sugerem que pode ser transmitido entre células através de exossomas (Demkes & van Rooij, 2017).

Em animais, o miR-146 foi descrito pela primeira vez em 2002, no tecido cardíaco de ratos; em humanos só foi descrito quatro anos depois, tendo sido possível descrever pela primeira vez a sua localização genómica (Paterson & Kriegel, 2017). Nesta altura, a família miR-146 foi identificada como um regulador da resposta imunitária e inflamatória controlada pelos recetores do tipo Toll (Wang et al., 2012; Arroyo et al., 2018).

A maioria da literatura escrita sobre os miR-146 está centrada no papel destes na regulação do sistema imunitário e na resposta inflamatória, no entanto, começa a haver cada vez mais artigos que demonstram o papel do miR-146 na doença cardiovascular e renal (Paterson & Kriegel, 2017).

Um dos primeiros estudos que relacionavam o miR-146 e patologias cardíacas descrevia o aumento de ambos os miR-146 a e b em doentes com doença arterial coronária (Paterson & Kriegel, 2017). Uma meta-análise realizada em humanos sugere que o polimorfismo no miR-146a está associado ao risco de desenvolvimento de doenças coronárias (Siddeek et al., 2018).

Alguns estudos demonstram que parece haver uma relação direta entre o enfarte do miocárdio e a expressão do miR-146a, havendo um aumento deste miRNA no tecido cardíaco de doentes autopsiados com enfarte do miocárdio (Paterson & Kriegel, 2017). No entanto, não se sabe o mecanismo que leva ao seu aumento, nem se o facto do miRNA estar aumentado tem como propósito proteger o coração ou se é prejudicial para o mesmo (Paterson & Kriegel, 2017). Existem, porém, estudos que comprovam que a resposta inflamatória e imunitária mediada pelos recetores tipo Toll, controlados pelos miR-146, têm um papel ativo no mecanismo fisiopatológico da lesão de isquemia/reperfusão do miocárdio (Wang et al., 2012). Segundo Wang et al. (2012) e Ntelios et al. (2021), o aumento do miR-146a exerce um papel de proteção do miocárdio, reduzindo significativamente a área de enfarte e melhorando a função cardíaca após lesão de isquemia/reperfusão. Parece ainda haver um aumento crónico do miR-146a no tecido cardíaco de doentes com hipóxia crónica, o que sugere novamente que este miRNA pode ter um papel cardioprotetor (Paterson & Kriegel, 2017).

Outros estudos examinam o potencial da utilização da concentração sérica do miR-146a como biomarcador preditivo da remodelação do ventrículo esquerdo, como consequência de enfarte do miocárdio (Paterson & Kriegel, 2017; He et al., 2019). Estes estudos provam que há um aumento da concentração do miR-146a em circulação em doentes com sinais de remodelação do ventrículo esquerdo, comparativamente com doentes sem remodelação, mostrando que o miR-146a poderá constituir um fator preditivo independente de remodelação

do ventrículo esquerdo (Paterson & Kriegel, 2017; He et al., 2019). Segundo Demkes e van Rooij (2017), o miR-146a regula a expressão da dihidrolipoamida succinil transferase (DLST), uma proteína mitocondrial tendo por isso um efeito no metabolismo de energia dos cardiomiócitos, o que afeta a hipertrofia e a disfunção na insuficiência cardíaca. Os resultados de He et al. (2019) e de Ntelios et al. (2021), demonstram que o miR-146a induz a remodelação cardíaca e que a sua inibição atenua a mesma remodelação em ratos com insuficiência cardíaca.

Segundo Wang et al. (2012) e Paterson e Kriegel (2017), o aumento do miR-146a inibe o fator nuclear kappa B (NF-kB) de mediar a expressão de citocinas inflamatórias e infiltrados de células pró-inflamatórias dentro do miocárdio. Sendo que o NF-kB parece ter um papel na patologia da hipertrofia e insuficiência cardíaca, suspeita-se que exista então uma relação importante entre o miR-146a e a insuficiência cardíaca (Paterson & Kriegel, 2017).

3. Objetivos

A DDMVM é a doença cardiovascular adquirida mais comum em cães. Ainda que o seu diagnóstico seja possível com base em exames ecocardiográficos e radiográficos, os biomarcadores podem ser uma ajuda preciosa em situações onde os exames convencionais não são suficientes ou não estão disponíveis.

Os miRNA, nomeadamente o miR-146a, são muito estáveis em circulação extracelular, sendo fácil a sua análise através de amostras de sangue, o que os torna particularmente interessantes como biomarcadores sanguíneos. O miR-146a foi identificado com concentrações alteradas em várias patologias cardiovasculares, inclusive parece aumentar a sua concentração sérica aquando da remodelação ventricular em doentes humanos com enfarte do miocárdio.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo apresentar um delineamento experimental que permita a implementação de um projeto de investigação, com o propósito de identificar se existem alterações na concentração sérica deste miRNA em cães com DDMVM nos seus diferentes estádios, comparativamente com um grupo de controlo e relacionando o possível aumento do miR-146a com a remodelação do ventrículo esquerdo.

Parte 3 – MiR-146a Como Potencial Biomarcador na Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral do Cão – Delineamento Experimental

1. Materiais e Métodos

Este estudo dividiu-se em duas fases. Na primeira fase, foi feito um estudo preliminar, desenvolvido entre novembro de 2020 e abril de 2021, onde foi possível identificar pela primeira vez o aumento do miR-146a em cães com DDMVM. Na segunda fase, as amostras foram colhidas entre dezembro de 2021 e maio de 2022, não tendo sido possível, até à data, realizar a técnica de extração de RNA e, consequentemente, aferir relativamente ao miR-146a.

Esta dissertação foca o trabalho realizado durante a segunda fase do projeto, onde foi possível o desenvolvimento de um delineamento experimental para a extração e medição da concentração de miRNA, neste caso o miR-146a, através de amostras de sangue.

Para a realização deste projeto, foram feitos exames ecocardiográficos e recolhidas amostras de sangue dos mesmos animais. O trabalho foi realizado no Hospital Veterinário do Porto, sendo que as amostras foram congeladas em azoto líquido e armazenadas no Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP) até à sua análise. A cada amostra foi atribuído um número e foi preenchida uma tabela no programa Microsoft Excel® com informações relativas ao animal.

1.1. Recrutamento da amostra do estudo

1.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos os animais que vieram à consulta de cardiologia no HVP, tendo sido selecionados por apresentarem alterações na válvula mitral visíveis no exame ecocardiográfico e compatíveis com DDMVM em qualquer um dos seus estádios, previamente diagnosticada ou não.

Para serem incluídos, os animais teriam de ser cães em idade adulta (mais de dois anos de idade), sem doenças concomitantes ou doentes crónicos diagnosticados e estáveis.

1.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos os animais que tivessem neoplasias diagnosticadas, patologias em tratamento não estáveis, animais com defeitos cardíacos congénitos e/ou sujeitos a cirurgias cardíacas prévias.

1.1.3. Consentimento informado

Para participarem no estudo, os tutores dos animais leram e assinaram um consentimento informado (Anexo A) declarando que consentiam que os dados dos seus animais fossem recolhidos e utilizados numa base de dados informática para posterior tratamento estatístico. Os tutores confiaram os seus animais voluntariamente sem que lhes fosse cobrado qualquer valor adicional ao da respetiva consulta de cardiologia e ecocardiografia. Foram ainda informados de que a sua participação no estudo poderia ser interrompida, por sua vontade, em qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Adicionalmente ao consentimento informado, foi pedido aos tutores que respondessem a um breve questionário relativamente aos seus animais com as seguintes questões: motivo da consulta; data de diagnóstico da patologia cardíaca; medicações atuais; última vacinação; última desparasitação interna e externa; contacto com outros animais; contacto com animais doentes; tipologia de habitação; hábitos de vida; tipologia de alimentação; destino de viagens e a sua frequência (Anexo B).

1.1.4. Grupo de Controlo

Para o grupo de controlo, foram selecionados animais que se apresentassem na consulta de cardiologia para a realização de ecocardiografia, mas que não tivessem evidências ecocardiográficas de alterações na válvula mitral, nomeadamente DDMVM, ou outras patologias cardíacas. Para que a sua inclusão no estudo fosse válida, os animais escolhidos estavam em conformidade com os critérios de inclusão do estudo, e os seus tutores tiveram de assinar e responder às questões do consentimento informado.

1.2. Amostras, processamento e armazenamento

Para a realização do estudo foram feitas colheitas de sangue a todos os animais incluídos. As colheitas de sangue foram feitas a partir das veias jugulares, com agulhas de 25 ou 23 gauge (G) e seringas de 5 mililitros (mL).

Foram feitas recolhas de 5 mL por animal dos quais 0,5 mL foram colocados num tubo de heparina para a realização de análises bioquímicas, como a ureia e creatinina. Este tubo foi centrifugado na centrífugadora angular digital 2615/1 Nahita® Blue, a 3500 rotações por minuto durante cinco minutos e em seguida foi colocado na máquina de análises bioquímicas, DRI-CHEM NX500i da Fujifilm®, com as disquetes de ureia e creatinina. Outros 0,5 mL foram

recolhidos para um tubo de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a realização de um hemograma, na máquina de hemograma BC-5000 Vet da Mindray®.

Dos restantes quatro mL de sangue foram colocados um mL em quatro tubos de EDTA diferentes que foram centrifugados na mesma centrífuga a 3500 rotações por minuto, durante cinco minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação foi recolhido 0,25 mL do plasma.

Os 0,25 mL por tubo foram armazenados em 4 microtubos *ependorf* criogénicos estéreis de 2mL de capacidade da ClearLine®, já previamente identificados com a sigla MIRVET, seguida do respetivo número da amostra. Os tubos foram identificados com uma caneta de acetato e cobertos com fita-cola. Em seguida foram colocados em pequenos contentores cheios de azoto líquido fornecidos pelo Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da FMUP. Estes contentores eram recolhidos de manhã no departamento e voltavam a ser devolvidos ao departamento ao final do dia. Os microtubos *ependorf* criogénicos foram posteriormente armazenados no Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da FMUP até à sua análise.

Por fim, 0,5 mL de plasma foram recolhidos e colocados em microtubos *ependorf* igualmente identificados, mas armazenados no congelador do HVP a -20 graus Celsius (°C).

1.3. Exame ecocardiográfico

Todos os animais incluídos neste projeto foram sujeitos a um exame ecocardiográfico completo no Hospital Veterinário do Porto realizado pela Doutora Ana Reis ou pelo Professor Doutor Luís Lobo. O ecógrafo utilizado foi o *MyLabX8 VET* da Esaote® com a sonda P 2-9 de frequência variável também da marca Esaote® em todos os exames efetuados.

Antes da realização do exame, todos os animais fizeram tricotomia da região torácica em ambos os lados, desde o quarto espaço intercostal até ao sexto espaço intercostal (Boon, 2011). A área de tricotomia deve ser estendida desde a junção costondral até ao externo (Boon, 2011). Para melhorar a transmissão dos ultrassons, foi aplicado álcool e gel na zona do exame (Boon, 2011).

Os exames foram realizados numa mesa de ecocardiografia veterinária, e os animais foram colocados primeiro em decúbito lateral direito, com a zona da tricotomia posicionada sob a secção recortada da mesa (Boon, 2011). A contenção dos animais foi realizada por

enfermeiros e auxiliares veterinários, que se posicionaram atrás do paciente, colocando os braços por cima das ancas e do pescoço, agarrando nos membros (Boon, 2011).

As imagens foram obtidas colocando a sonda por baixo da mesa em contacto com a zona exposta, de forma a obter melhores imagens e minimizando interferências, uma vez que o coração tomba para o lado do decúbito em direção à parede torácica (Boon, 2011).

Os exames ecocardiográficos foram realizados nos modos M, Doppler e Bidimensional, tendo sido realizados vários cortes sequenciais e várias medições finalizando com a redação de um relatório de ecocardiografia.

1.3.1. Cálculos e medições

O diagnóstico da DDMVM foi feito com base no exame clínico e nos critérios ecocardiográficos descritos em seguida. Todas as ecocardiografias foram realizadas com a mesma técnica, o que é importante para que as mesmas imagens sejam obtidas com a mesma sequência nos diferentes animais (Smith et al., 2016).

Os exames foram iniciados na vista paraesternal direita em modo bidimensional com o objetivo de avaliar o espessamento e/ou prolapso da válvula mitral (Baron Toaldo et al., 2016). De seguida, numa projeção de eixo curto ao nível da válvula aórtica no início da diástole procedeu-se à medição do diâmetro do átrio esquerdo e da aorta (Baron Toaldo et al., 2016; Smith et al., 2016). Com as medições do diâmetro foi calculado o rácio átrio esquerdo/aorta. Ainda na projeção de eixo curto, ao nível dos músculos papilares e em modo-M fez-se a medição do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole, medido no início do complexo QRS e com este valor procedeu-se ao cálculo do LVIDDN com a fórmula demonstrada em baixo (Baron Toaldo et al., 2016; Smith et al., 2016).

$$LVIDDN = \frac{\text{Diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (cm)}}{\text{Peso corporal (Kg)}^{0,294}}$$

Em seguida, no acesso paraesternal esquerdo, na vista de quatro câmaras, utilizando o Doppler espectral, foram medidas as velocidades máximas de regurgitação mitral e tricúspide e calculados os respetivos gradientes de pressão (Bodegård-Westling et al., 2017). Através da velocidade de regurgitação tricúspide foi possível estimar a pressão sistólica da artéria pulmonar que nos indica se existe ou não hipertensão pulmonar (Chiavegato et al., 2009; Menciotti et al., 2021). A severidade da regurgitação mitral foi estimada através do rácio área do jato de regurgitação/área do átrio esquerdo e considerada ligeira quando rácio < 30%,

moderada quando o rácio está entre 30-50% e severa quando o rácio é $> 50\%$ (Bodegård-Westling et al., 2017).

Com todos estes cálculos e medições foi possível atribuir um estágio de doença a cada animal de acordo com o estadiamento definido pelo *consensus* do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (Keene et al., 2019).

1.4. Técnica de extração de RNA

Como já foi referido anteriormente, até ao momento da realização desta dissertação não foi possível executar a técnica de extração de RNA e respetiva análise laboratorial às amostras recolhidas durante a segunda fase do estudo. No entanto, para esta etapa recomenda-se a utilização do *Kit miRNeasy Serum/Plasma* da Qiagen® seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante (Yang et al., 2017). Este Kit foi identificado por vários estudos como o mais eficiente do mercado, conseguindo uma melhor qualidade e maior quantidade de miRNA mesmo com quantidades reduzidas de plasma (Wong et al., 2009; Sriram et al., 2021).

1.5. Análise estatística

Procedeu-se a um estudo exploratório, transversal, descritivo e correlacional. Em termos de dados descritivos calcularam-se valores médios e respetivos desvios padrão. Em termos da análise correlacional, por forma a provar eventuais diferenças entre grupos em estudo, foram aplicados testes ANOVA e testes post-hoc de Bonferroni, para os casos em que existem variâncias homogéneas, e testes post-hoc Dunnett T3 para os restantes casos.

A opção recaiu sobre testes paramétricos, após os resultados dos testes Shapiro-Wilk e observância visual dos gráficos de distribuição, demonstrarem que as distribuições eram normais (Ghasemi & Zahediasl, 2012).

Para efetuar as várias análises estatísticas foi utilizado o software IBM SPSS na sua versão 28®.

2. Resultados

2.1. Descrição da amostra

Como explanado nos materiais e métodos, o projeto dividiu-se em duas fases. A primeira fase contou com o envolvimento de 24 cães. Na segunda fase também estiveram envolvidos 24 cães, sendo que um dos animais teve de ser excluído por não cumprir com os critérios de inclusão definidos para o estudo. A amostra total incluída neste projeto foi de 47 animais ($n = 47$) divididos em quatro grupos: um grupo de controlo composto por 8 animais; estágio B1 por 23 animais; estágio B2 por 7 animais; estágio C por 9 animais. Relativamente ao sexo dos animais, 19 eram machos (5 machos castrados e 14 machos inteiros) e 28 eram fêmeas (19 esterilizadas e 9 inteiras).

A média de idades da amostra foi de 11 (4 - 17) anos, e a média de pesos da amostra foi de 13,46 (2 - 38) kg. No que diz respeito às idades observadas nos quatro grupos, apresentam-se os dados no Gráfico e Tabela 4.

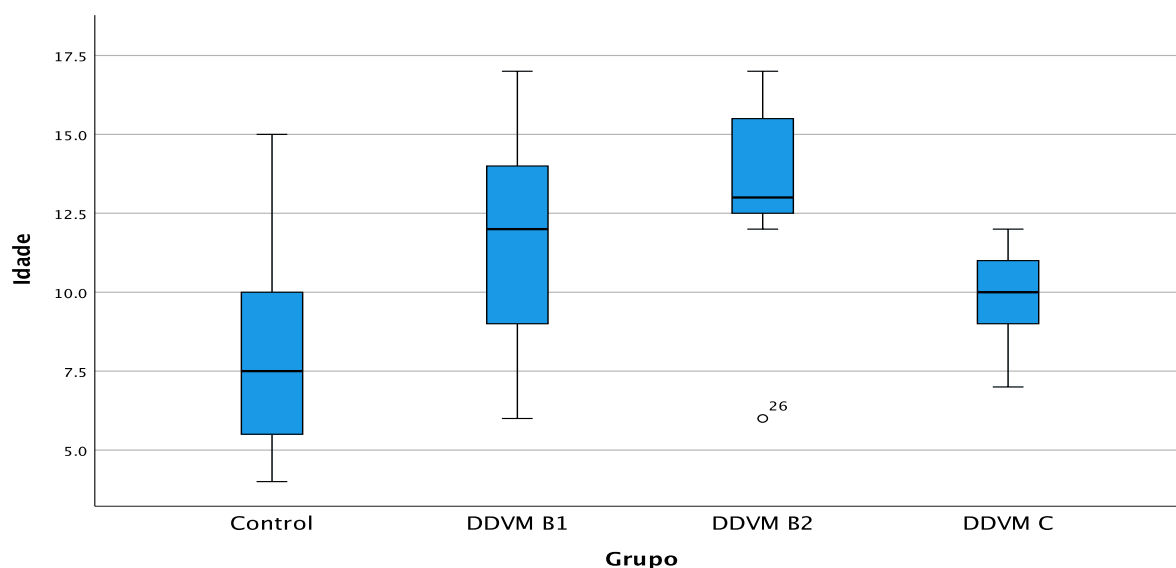


Gráfico 4 - Diagramas de caixa - Idades observadas por grupos de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa representam os outliers e os seus respetivos números sequenciais. DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 4 - Estatística descritiva por idade e por estádio. n – Número de cães; M – idade média; DP – desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
Controlo	8	8.13	3.563
DDMVM B1	23	11.65	2.886
DDMVM B2	7	13.14	3.625
DDMVM C	9	9.56	1.740
Total	47	10.87	3.301

Como se pode observar no Gráfico 4 e na Tabela 4, as idades médias por estádio são crescentes, com exceção dos cães que se encontram no estádio C, em que a idade média mostra um valor relativamente baixo.

Conforme apresentado no subcapítulo “Análise estatística”, foi efetuado o teste ANOVA para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre idades dos grupos, sendo que o valor de teste evidenciou a existência dessas diferenças ($p=.006$).

Como igualmente apresentado no subcapítulo acima identificado, procedeu-se a testes post-hoc, para encontrar os pares onde essas diferenças estatisticamente significativas se verificavam, sendo que no caso da idade foi aplicado o teste Bonferroni, uma vez que se verificou homogeneidade das variâncias. Os resultados dos testes Bonferroni são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes de Bonferroni - Idade vs Estádio. p – Valor teste para significância estatística; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

(I) Grupo	(J) Grupo	p
Controlo	DDMVM B1	.034
	DDMVM B2	.012
	DDMVM C	1.000
DDMVM B1	Controlo	.034
	DDMVM B2	1.000
	DDMVM C	.468
DDMVM B2	Controlo	.012
	DDMVM B1	1.000
	DDMVM C	.122
DDMVM C	Controlo	1.000
	DDMVM B1	.468
	DDMVM B2	.122

Quanto aos pesos por grupo, apresentam-se os resultados no Gráfico 5 e na Tabela 6.

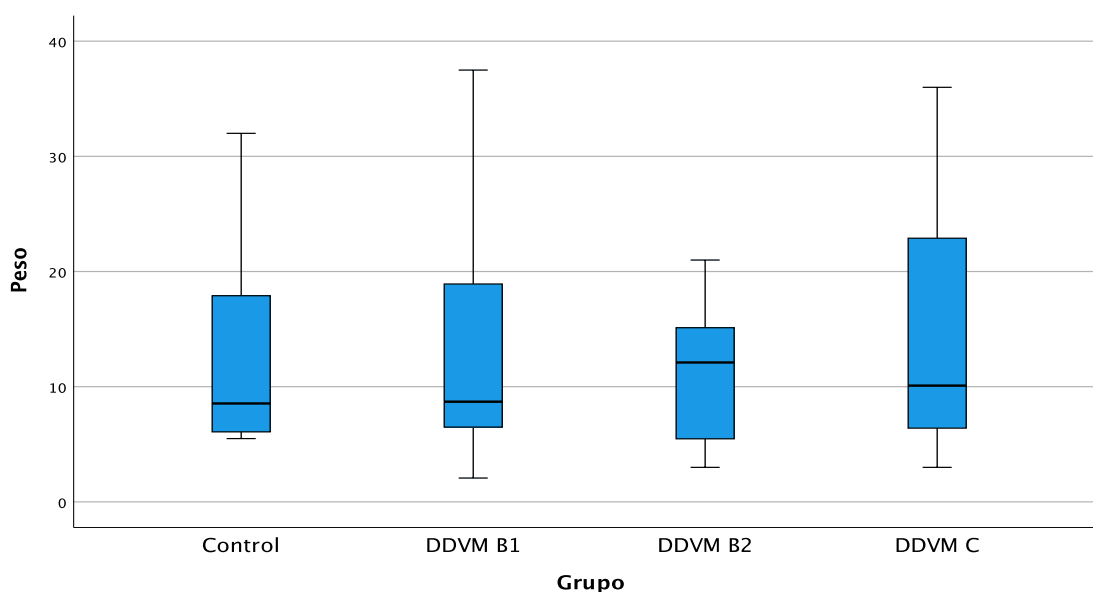


Gráfico 5 - Diagramas de caixa - Pesos observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 6 - Estatística descritiva por peso e por estágio. n - Número de animais; M - Peso médio; DP - Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
Controlo	8	12.82	10.042
DDMVM B1	23	13.86	10.653
DDMVM B2	7	11.04	6.604
DDMVM C	9	14.89	10.990
Total	47	13.46	9.887

Não se observam grandes diferenças entre os vários estádios, sendo que o teste ANOVA provou não existirem diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao peso por estágio ($p \geq 0.05$).

Relativamente às raças dos animais incluídos na amostra, a maioria eram cães sem raça definida ($n = 24$), 6 animais eram da raça Yorkshire Terrier, 2 eram da raça Pincher Miniatura, 2 Pastor Alemão e 2 da raça Caniche miniatura. Todas as restantes raças enumeradas em seguida tinham apenas um elemento: Pug, Bull Terrier, Cavalier King Charles, Galgo Inglês, Schnauzer, Chihuahua, Shih-tzu, Doberman Pincher, Bulldog Inglês, Cocker Spaniel e Serra da Estrela.

2.2. Ecocardiografia

De seguida apresentaremos os dados relativamente às várias ecocardiografias realizadas nos cães da amostra, começando pelo rácio entre o átrio esquerdo e a aorta (AE/Ao). No Gráfico 6 e Tabela 7, são apresentados os resultados.

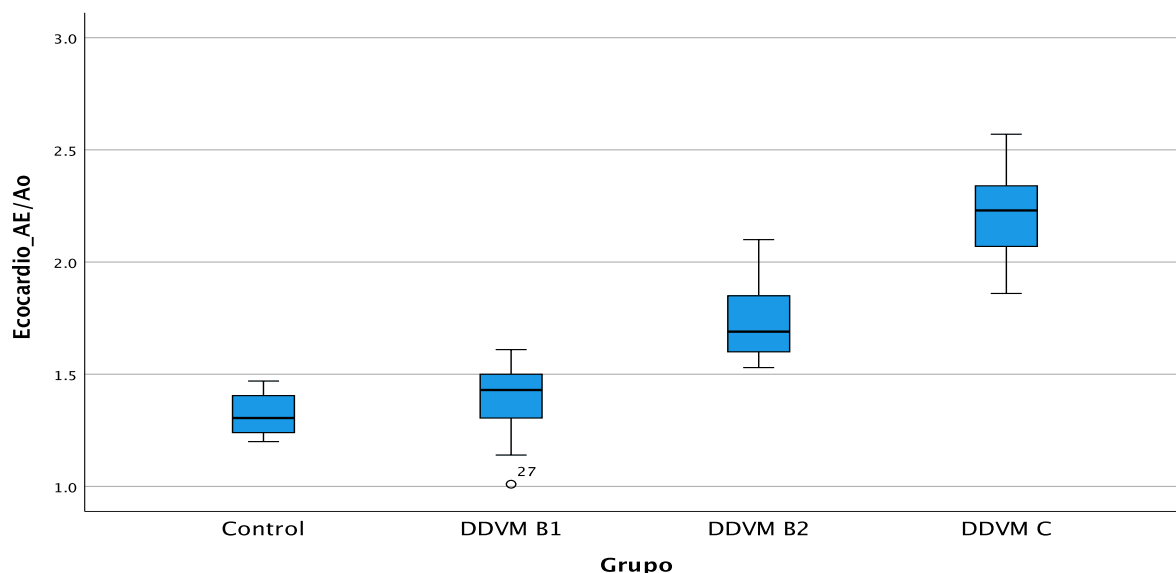


Gráfico 6 - Diagramas de caixa - Valores do Rácio AE/Ao observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa, representam os outliers e os seus respetivos números sequenciais. Ecocardio_AE/Ao – Rácio átrio esquerdo/aorta; DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 7 - Estatística descritiva por resultados do rácio AE/Ao por estágio. n- Número de cães; M – Valor médio; DP – Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
Controlo	8	1.32	.098
DDMVM B1	23	1.40	.149
DDMVM B2	7	1.75	.205
DDMVM C	9	2.20	.227
Total	47	1.59	.366

Observa-se um aumento do valor médio do rácio AE/Ao, conforme o agravamento do estágio, sendo que estas diferenças são estatisticamente significativas entre o grupo de Controlo e os estádios B2 e C ($p < .001$) e entre os vários estádios, B1, B2 e C ($p < .001$), conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados dos testes de Bonferroni - Valores rácio AE/Ao vs Estádio. *p* – Valor teste para significância estatística; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

(I) Grupo	(J) Grupo	p
Controlo	DDMVM B1	1.000
	DDMVM B2	<.001
	DDMVM C	<.001
DDMVM B1	Controlo	1.000
	DDMVM B2	<.001
	DDMVM C	<.001
DDMVM B2	Controlo	<.001
	DDMVM B1	<.001
	DDMVM C	<.001
DDMVM C	Controlo	<.001
	DDMVM B1	<.001
	DDMVM B2	<.001

A segunda medição da qual apresentamos resultados, observáveis no Gráfico 7 e Tabela 9, compara o diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado para o peso corporal (LVIDdN).

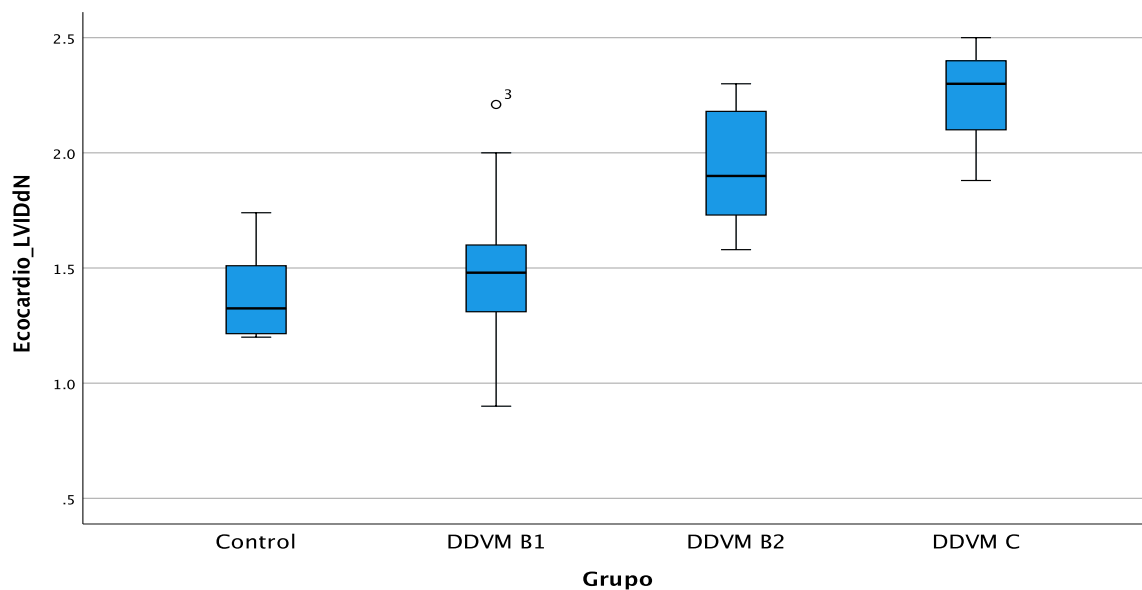


Gráfico 7 - Diagramas de caixa – Valores do cálculo do LVIDdN observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa, representam os outliers e os seus respetivos números sequenciais. Ecocardio_LVIDdN – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado para o peso corporal; DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 9 - Estatística descritiva por resultados do LVIDdN por estádio. n – Número de animais; M – Média; DP – Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
Controlo	8	1.38	.201
DDMVM B1	23	1.46	.282
DDMVM B2	7	1.94	.282
DDMVM C	9	2.26	.195
Total	47	1.67	.420

Demonstram os dados apresentados no Gráfico 7 e na Tabela 9 que os valores médios aumentam de acordo com o estádio. Para efetuar a prova se essas diferenças eram ou não estatisticamente significativas, procedeu-se aos testes post-hoc de Bonferroni, sendo os resultados destes testes apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados dos testes de Bonferroni – Valores LVIDdN vs Estádio. p – Valor teste para significância estatística; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

(I) Grupo	(J) Grupo	p
Controlo	DDMVM B1	1.000
	DDMVM B2	<.001
	DDMVM C	<.001
DDMVM B1	Controlo	1.000
	DDMVM B2	<.001
	DDMVM C	<.001
DDMVM B2	Controlo	<.001
	DDMVM B1	<.001
	DDMVM C	.118
DDMVM C	Controlo	<.001
	DDMVM B1	<.001
	DDMVM B2	.118

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas para os valores médios do LVIDdN entre o grupo de Controlo e os estádios B2 e C e entre o estádio B1 e os estádios B2 e C, não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre os estádios B2 e C.

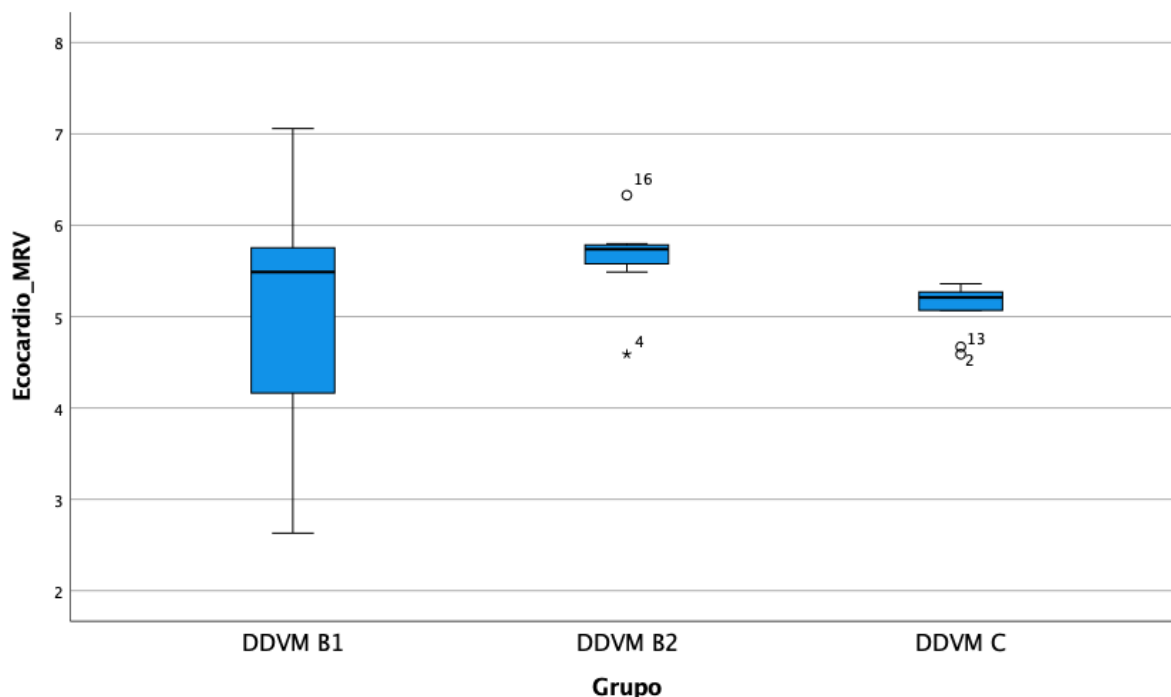


Gráfico 8 - Diagramas de caixa – Valores da MRV observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa, representam os outliers e os seus respectivos números sequenciais. Ecocardio_MRV – Velocidade Máxima de Regurgitação Mitral; DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

A velocidade máxima de regurgitação mitral (MRV) foi o teste que se seguiu. Os dados descritivos apresentam-se no Gráfico 8 e na Tabela 11.

Tabela 11 - Estatística descritiva por resultados da MRV por estágio. n – Número de animais; M – Média; DP – Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
DDMVM B1	23	5.07	1.113
DDMVM B2	7	5.63	.525
DDMVM C	9	5.09	.278
Total	47	4.29	2.132

Não obstante as diferenças observadas entre os grupos, em especial entre o grupo no estágio B2 e os restantes dois grupos, as diferenças, de acordo com os resultados dos testes ANOVA, estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p \geq .05$).

No que diz respeito aos resultados do gradiente de pressão da regurgitação mitral (gradMR), os resultados são apresentados no Gráfico 9 e na Tabela 12 notando-se, tal como nos resultados da medição da velocidade máxima de regurgitação mitral, diferenças entre o grupo no estágio B2 e os restantes dois grupos, mas, tal como nesse caso, as diferenças de acordo com os resultados dos testes ANOVA, também aqui não são estatisticamente significativas ($p \geq .05$).

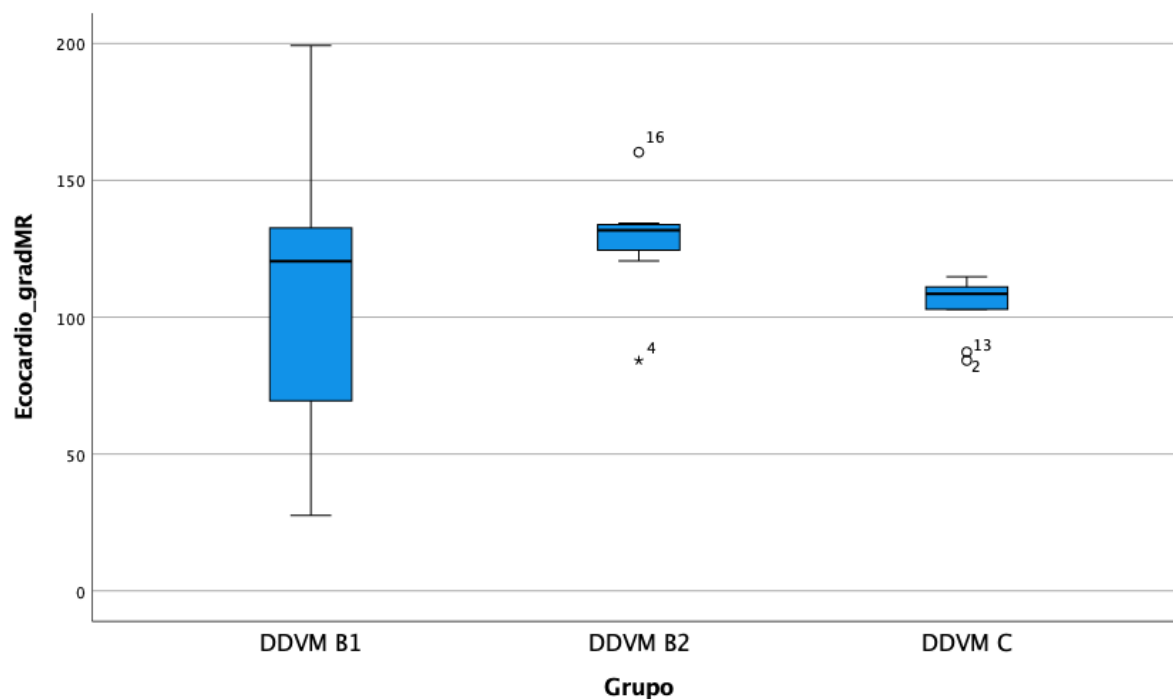


Gráfico 9 - Diagramas de caixa – Valores do gradiente de pressão da regurgitação mitral observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa, representam os outliers e os seus respetivos números sequenciais. Ecocardio_gradMR – Gradiente de pressão da regurgitação mitral; DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 12 -Estatística descritiva por resultados do gradiente de pressão da regurgitação mitral por estágio. n – Número de animais; M – média; DP – Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
DDMVM B1	23	107.47	44.282
DDMVM B2	7	127.59	22.730
DDMVM C	9	104.08	11.038
Total	47	91.52	53.282

De seguida apresentam-se os resultados descritivos da velocidade máxima de regurgitação tricúspide (TRV), no Gráfico 10 e na Tabela 13.

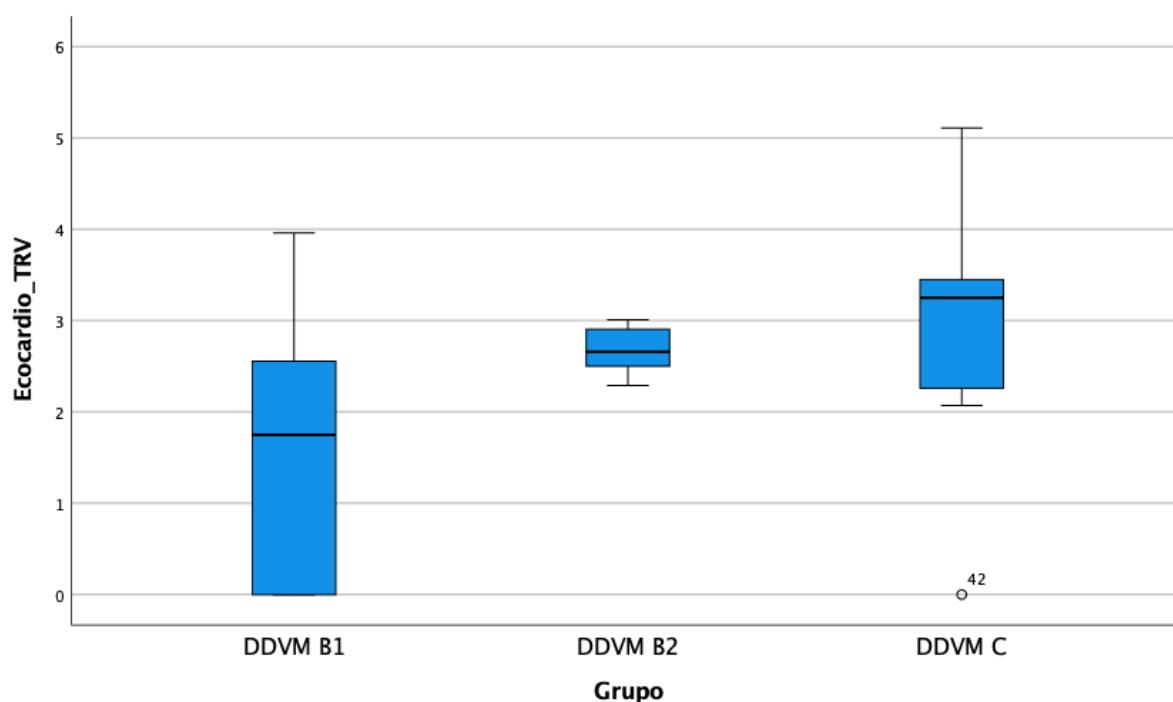


Gráfico 10 - Diagramas de caixa – Valores da TRV observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa, representam os outliers e os seus respetivos números sequenciais. Ecocardio_TRV – Velocidade máxima de regurgitação tricúspide; DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 13 - Estatística descritiva por resultados da TRV por estágio. n – Número de animais; M – Média; DP – Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
DDMVM B1	23	1.59	1.224
DDMVM B2	7	2.68	.269
DDMVM C	9	2.86	1.390
Total	47	1.72	1.407

Denota-se um valor médio crescente, conforme a gravidade do estágio sendo que os testes ANOVA confirmaram a existência de diferenças estatisticamente significativas entre grupos e os testes post-hoc, desta feita aplicando-se testes Dunnett T3, uma vez que não se verificou homogeneidade das variâncias. Confirmou-se existirem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos B1 e B2 ($p=.001$), sendo que os resultados dos testes Dunnett T3 são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados dos testes de Dunnett T3 – Valores TRV vs Estádio. *p* – Valor teste para significância estatística; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

(I) Grupo	(J) Grupo	p
DDMVM B1	DDMVM B2	.001
	DDMVM C	.088
DDMVM B2	DDMVM B1	.001
	DDMVM C	.974
DDMVM C	DDMVM B1	.088
	DDMVM B2	.974

O último cálculo que se aplicou aos animais da amostra foi a avaliação do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide (gradTR), sendo os resultados da análise descritiva apresentados no Gráfico 11 e na Tabela 15.

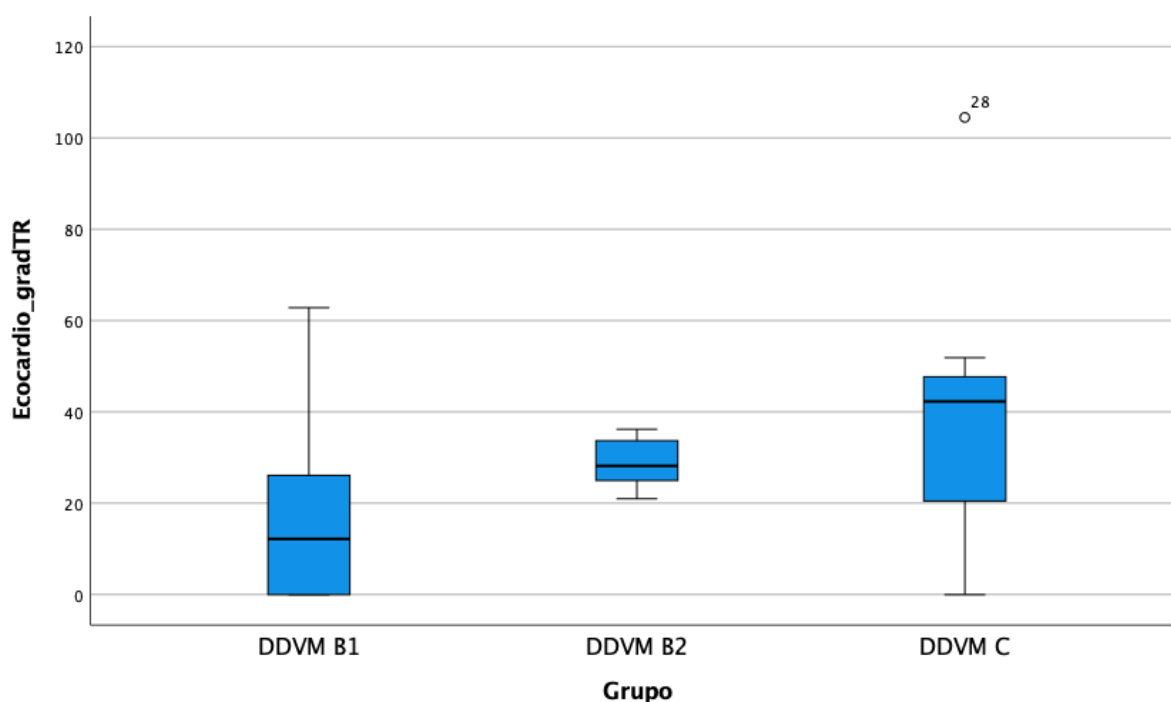


Gráfico 11 - Diagramas de caixa – Valores do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide observados por grupo de acordo com o estágio, apresentando o valor mínimo, máximo e a mediana. Os símbolos com número apresentados abaixo e/ou acima dos diagramas de caixa, representam os outliers e os seus respetivos números sequenciais. Ecocardio_gradTR – Gradiente de pressão da regurgitação tricúspide; DDVM – Doença Degenerativa da Válvula Mitral.

Tabela 15 - Estatística descritiva por resultados do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide por estágio. *n* – Número de animais; *M* – Média; *DP* – Desvio padrão; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

	n	M	DP
DDMVM B1	23	15.82	15.872
DDMVM B2	7	28.97	5.721
DDMVM C	9	39.60	29.539
Total	47	19.64	21.026

Verifica-se, conforme observado na Tabela 15, um valor médio dos resultados do gradTR acentuadamente crescente entre os vários estádios.

Na Tabela 16 são apresentados os resultados dos testes post-hoc de Dunnett T3, uma vez que os testes ANOVA demonstraram existir diferenças entre grupos.

Tabela 16 – Resultados dos testes de Dunnett T3 – Valores do gradiente de pressão da regurgitação tricúspide vs Estádio. _p –

Valor teste para significância estatística; DDMVM – Doença Degenerativa Mixomatosa da Válvula Mitral.

(I) Grupo	(J) Grupo	p
DDMVM B1	DDMVM B2	.008
	DDMVM C	.123
DDMVM B2	DDMVM B1	.008
	DDMVM C	.659
DDMVM C	DDMVM B1	.123
	DDMVM B2	.659

Conforme observável na Tabela 16, verifica-se que as diferenças entre os resultados do grupo B1 e B2 são estatisticamente significativas ($p=.008$).

3. Discussão

Nesta dissertação desenvolveu-se um protocolo experimental para a avaliação do miR-146a como potencial biomarcador na DDMVM. Isto porque, o miR-146a é muito estável na circulação sanguínea e aparenta estar alterado em animais com patologias cardíacas, características que tornam cientificamente interessante o seu estudo enquanto potencial biomarcador cardíaco (Paterson & Kriegel, 2017; Dlouha et al., 2021).

O delineamento experimental teve por base o protocolo utilizado na primeira fase do estudo. Este demonstrou ser eficaz, tendo sido possível obter resultados com boa quantidade e qualidade de miR-146a. Comparativamente com outros protocolos de recolha e extração de miRNA, é possível verificar que as colheitas de sangue também foram realizadas utilizando tubos com EDTA, uma vez que este pode ser utilizado para prevenir a degradação do RNA (Wong et al., 2009; Sriram et al., 2021). No estudo de Steudemann et al. (2013), também foram recolhidos cinco ml de sangue da veia jugular externa. Esta quantidade de sangue foi suficiente para obter boas concentrações de miRNA, sem provocar efeitos adversos, mesmo em animais mais pequenos. Relativamente ao processo de centrifugação, não parece existir um número de rotações por minuto ou tempo de centrifugação mais utilizado, dado que diferentes estudos utilizam rotações e tempos de centrifugação diferentes obtendo todos bons resultados de extração. No protocolo de Sriram et al. (2021), foi utilizado 0,2 ml de plasma armazenados em criotubos de 2 ml para a extração com o *kit miRNeasy Serum/Plasma* da Qiagen®, tendo sido possível obter uma boa quantidade e qualidade de miRNA. Comparando com os cerca de 0,25 ml utilizados neste protocolo, prevê-se que também seja possível obter resultados igualmente satisfatórios. É ainda importante referir que a maioria dos protocolos referenciados foram utilizados em medicina humana, e por isso prevê-se que o protocolo experimental desenvolvido neste estudo possa ser transposto para outros estudos, que tenham como objetivo a extração de miRNA do sangue, em humanos.

Passando para a amostra em estudo, ainda que segundo a bibliografia a DDMVM seja 1,5 vezes mais prevalente em machos do que em fêmeas, o mesmo não se verificou, o que pode ser explicado devido ao tamanho reduzido da amostra e à sua limitação geográfica à cidade do Porto.

Como é possível observar na Tabela 5, os animais nos estádios B1 e B2 são significativamente mais velhos que os animais do grupo de controlo, o que vai de encontro à

bibliografia, pois a prevalência de DDMVM aumenta com o avançar da idade (Keene et al., 2019; Bionda et al., 2020).

A maioria dos animais incluídos no estudo não tinha raça definida, e a raça com maior número de animais foi a Yorkshire Terrier, tal como descrito na bibliografia. A prevalência da DDMVM varia consoante as raças, sendo o Cavalier King Charles, o Poodle miniatura, o Dachshund e o Yorkshire Terrier as raças com mais casos reportados (Meurs et al., 2019). Todas as raças acima nomeadas estão presentes no estudo, com exceção do Dachshund, que pode ser explicado devido ao tamanho reduzido da amostra e à limitação geográfica do estudo.

Relativamente aos resultados obtidos através do exame ecocardiográfico, podemos constatar que o aumento do estágio da DDMVM é acompanhado pelo aumento do átrio e ventrículo esquerdo, como é observável nos Gráficos 6 e 7 e nas Tabelas 7 e 9. Este aumento era expectável, uma vez que à medida que a doença avança há um aumento da sobrecarga de volume, que por sua vez leva a uma progressiva remodelação cardíaca. Assim, quanto maior o estágio, maior a remodelação sofrida pelas câmaras cardíacas (Bagardi et al., 2022).

Quanto ao rácio átrio esquerdo/aorta, foi possível verificar na Tabela 8 que não houve diferenças significativas entre o grupo de controlo e o grupo B1, o que seria presumível. O que caracteriza o grupo B1 é o facto de os animais terem alterações estruturais compatíveis com DDMVM, mas sem alterações nas dimensões das câmaras cardíacas nem no índice cardíaco vertebral (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019). No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de controlo/B1 e os grupos B2 e C, com o rácio destes últimos a ser mais elevado do que o dos dois primeiros grupos. Esta diferença também seria previsível, uma vez que a partir do grupo B2 os animais começam a apresentar cardiomegalia e remodelação cardíaca. Estas alterações acontecem devido ao aumento progressivo da regurgitação mitral, que aumenta a pressão no átrio esquerdo e obriga a um aumento do débito cardíaco, provocando o alargamento das câmaras cardíacas do lado esquerdo, nomeadamente o átrio esquerdo, como mecanismo de compensação (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019).

No que concerne ao LVIDDN, constatamos que vai aumentando à medida que os estádios aumentam (Gráfico 7 e Tabela 9). Recorrendo à tabela 10, é possível verificar que não houve diferença estatística significativa entre o grupo de controlo e o grupo B1, o que é, mais uma vez, expectável tendo em consideração as características que definem o grupo B1. Verificaram-se diferenças significativas entre os grupos controlo/B1 e os grupos B2 e C, devido à hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo que se verifica nestes últimos grupos. Este

mecanismo compensatório deve-se à pressão exercida pelo aumento do volume resultante da regurgitação mitral (Smith et al., 2016; Keene et al., 2019). Contrariamente ao que seria esperado, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo B2 e o grupo C, o que pode ser explicado dada a reduzida amostra em estudo.

Dos 47 animais incluídos no estudo, 23 apresentavam doença degenerativa mixomatosa da tricúspide concomitante, o que vai de encontro com a bibliografia, que diz que pelo menos 30% dos animais com DDMVM também apresentam doença degenerativa mixomatosa da válvula tricúspide (Keene et al., 2019). Como é possível observar na Tabela 14, houve diferenças estatisticamente significativas entre as velocidades máximas de regurgitação tricúspide entre o grupo B1 e o grupo B2, o que é verosímil, uma vez que há medida que a regurgitação vai piorando, também a sua velocidade deverá aumentar. Também o gradiente de pressão da regurgitação tricúspide apresentou diferenças significativas entre o grupo B1 e B2 justificáveis pelo mesmo princípio de que, à medida que a regurgitação piora também o seu gradiente de pressão aumenta (Tabela 16).

Por último, constata-se que 8 dos 47 animais em estudo apresentavam hipertensão pulmonar. A hipertensão pulmonar pode ter várias causas, sendo a DDMVM a mais comum, devido ao aumento de pressão do átrio esquerdo, que congestiona a veia pulmonar (Chiavegato et al., 2009; Borgarelli et al., 2015; Menciotti et al., 2021; Suzuki et al., 2021). No entanto, é possível que esteja subdiagnosticada, pois a avaliação com Doppler espectral da pressão sistólica da artéria pulmonar é considerada imprecisa, e muitas vezes difere das medições de pressão invasivas (Menciotti et al., 2021).

Ao finalizar o projeto é possível identificar várias limitações, sendo a mais evidente o facto de não ter sido possível, até à data, obter os resultados das concentrações do miR-146a das amostras recolhidas durante a segunda fase, limitando esta dissertação a um protocolo experimental. Acresce ainda a limitação de tempo disponível para o desenvolvimento do estudo, assim como a limitação geográfica do mesmo. Por consequência, a amostra obtida é pequena e muito heterogénea, com idades compreendidas entre os 4 e os 17 anos; pesos entre 2 e 38 Kg; várias raças diferentes, mas poucos exemplares da mesma raça, o que não permite identificar quais as mais prevalentes. Devido a esta heterogeneidade, a amostra acaba por ser pouco representativa da população, o que pode inclusive originar erros estatísticos ou conclusões que não sejam transponíveis para a realidade. Para melhorar este aspeto, seria importante aumentar

a amostra de animais e considerar animais de outras zonas do país, para que se tornasse um estudo mais abrangente, consequentemente, cientificamente mais significativo.

Para além das limitações acima mencionadas, é também importante reconhecer que o miR-146a não está associado exclusivamente a patologias cardiovasculares. A maior parte da bibliografia disponível sobre este miRNA remete ao seu papel no sistema imunitário e no processo inflamatório, pelo que o aumento da sua concentração é influenciado por vários fatores, não podendo ser categoricamente associado apenas a patologias cardíacas ou à DDMVM. Ainda assim, existem também cada vez mais estudos que provam que o aumento deste miRNA em circulação está associado a patologias cardíacas e à insuficiência cardíaca. Uma possível solução para este problema pode passar pela medição da concentração do miR-146a presente nos cardiomiócitos de animais saudáveis, comparando com animais com DDMVM nos seus diferentes estádios.

Numa perspetiva futura, este biomarcador poderá ser uma mais-valia em clínicas ou hospitais que não tenham acesso a ecocardiografia, no entanto, ainda que seja um protocolo relativamente simples de executar, é importante considerar os custos de todos os materiais necessários e a formação técnica requerida para a realização e interpretação dos kits de extração de miRNA, o que torna a sua utilização na prática clínica veterinária diária ainda um grande desafio.

A DDMVM em cães apresenta muitas semelhanças funcionais e histológicas com o prolapso da válvula mitral em humanos (Yang et al., 2017; Reis-Ferreira et al., 2022). Esta doença afeta 3% da população adulta e tem uma elevada taxa de mortalidade em idosos, principalmente após desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (Yang et al., 2017). Vários esforços têm sido feitos na procura de novas formas terapêuticas que possam abrandar a progressão da doença ou a deterioração da função cardíaca (Yang et al., 2017). Devido às suas semelhanças com a DDMVM, os cães tornam-se bons modelos para ensaios pré-clínicos (Yang et al., 2017).

Na primeira fase deste estudo, foi possível identificar pela primeira vez a presença do miR-146a em circulação no sangue de animais com DDMVM, sendo expectável que os resultados da segunda fase vão ao encontro dos anteriores. Assim, podemos constatar o pioneirismo do trabalho realizado, que pode vir a ter implicações significativas no diagnóstico e até no tratamento, não só de cães com DDMVM, como também em pessoas com prolapso da válvula mitral.

4. Conclusão

Com a presente dissertação, foi possível estabelecer um delineamento experimental que pode ser facilmente aplicável a outros estudos que pretendam medir a concentração de miRNA na circulação sanguínea, cumprindo com os objetivos previamente estabelecidos.

Estes estudos são cada vez mais importantes, por apresentarem novas formas de diagnóstico e terapêuticas para as mais variadas patologias e principalmente, pelo facto de muitas clínicas e hospitais ainda não terem meios complementares de diagnóstico disponíveis ou terem falta de profissionais treinados nestas áreas capazes de realizar exames mais especializados. Esta necessidade, principalmente em regiões mais isoladas, dá ênfase à importância dos biomarcadores como uma nova forma de diagnóstico.

Para que o diagnóstico de patologias através de miRNAs seja uma realidade no futuro, é de elevada importância que sejam feitos mais estudos que correlacionem a concentração dos diferentes miRNA conhecidos e as mais variadas patologias.

Dando continuidade a este projeto científico que relaciona a concentração do miR-146a com a DDMVM, salienta-se a necessidade de aumentar a amostra de animais, abrangendo mais zonas geográficas para que a amostra seja mais representativa da realidade. Por fim, caso os resultados obtidos na primeira fase se verifiquem nesta segunda fase, em fases futuras deve ser analisada a aplicabilidade deste mesmo estudo e delineamento experimental na medicina humana.

Referências bibliográficas

1. Arroyo, A., de los Reyes-García, A., Rivera-Caravaca, J., Valledor, P., García-Barberá, N., & Roldán, V. et al. (2018). MiR-146a Regulates Neutrophil Extracellular Trap Formation That Predicts Adverse Cardiovascular Events in Patients With Atrial Fibrillation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, 38(4), 892-902. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.117.310597>;
2. Azevedo, C., & E. Sunkel, C. (2012). *Biologia Celular e Molecular* (5th ed., pp. 205-228). Lidel;
3. Bagardi, M., Zamboni, V., Locatelli, C., Galizzi, A., Ghilardi, S., & Brambilla, P. G. (2022). Management of chronic congestive heart failure caused by myxomatous mitral valve disease in dogs: A narrative review from 1970 to 2020. *Animals*, 12(2), 209. <https://doi.org/10.3390/ani12020209>;
4. Baron Toaldo, M., Poser, H., Mencioti, G., Battaia, S., Contiero, B., Cipone, M., Diana, A., Mazzotta, E., & Guglielmini, C. (2016). Utility of Tissue Doppler Imaging in the Echocardiographic Evaluation of Left and Right Ventricular Function in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease with or without Pulmonary Hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(3), 697-705. <https://doi.org/10.1111/jvim.13940>;
5. Beg, F., Wang, R., Saeed, Z., Devaraj, S., Masoor, K., & Nakshatri, H. (2017). Inflammation-associated microRNA changes in circulating exosomes of heart failure patients. *BMC Research Notes*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3090-y>;
6. Besche, B., Blondel, T., Guillot, E., Garelli-Paar, C., & Oyama, M. A. (2020). Efficacy of oral torasemide in dogs with degenerative mitral valve disease and new onset congestive heart failure: The carpodiem study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(5), 1746–1758. <https://doi.org/10.1111/jvim.15864>;
7. Bionda, A., Cortellari, M., Bagardi, M., Frattini, S., Negro, A., Locatelli, C., Brambilla, P. G., & Crepaldi, P. (2020). A genomic study of myxomatous mitral valve disease in cavalier king Charles Spaniels. *Animals*, 10(10), 1895. <https://doi.org/10.3390/ani10101895>;
8. Bodegård-Westling, A., Tidholm, A., & Häggström, J. (2017). Prevalence of mitral valve regurgitation in 79 asymptomatic Norfolk terriers. *Journal of Veterinary Cardiology*, 19(2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2016.12.003>;

9. Boon, J. A. (2011). Two-dimensional echocardiographic exam. Em J. A. Boon (Ed.), *Veterinary echocardiography* (2nd ed, pp. 37–38). Wiley-Blackwell;
10. Boswood, A., Häggström, J., Gordon, S. G., Wess, G., Stepien, R. L., Oyama, M. A., Keene, B. W., Bonagura, J., MacDonald, K. A., Patteson, M., Smith, S., Fox, P. R., Sanderson, K., Woolley, R., Szatmári, V., Menaut, P., Church, W. M., O'Sullivan, M. L., Jaudon, J. P., ... 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), 1765–1779. <https://doi.org/10.1111/jvim.14586>;
11. Borgarelli, M., Abbott, J., Braz-Ruivo, L., Chiavegato, D., Crosara, S., Lamb, K., Ljungvall, I., Poggi, M., Santilli, R. A., & Haggstrom, J. (2015). Prevalence and prognostic importance of pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 569–574. <https://doi.org/10.1111/jvim.12564>;
12. Borgarelli, M., & Haggstrom, J. (2010). Canine Degenerative Myxomatous Mitral Valve Disease: Natural History, Clinical Presentation and Therapy. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice*, 40(4), 651-663. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.03.008;
13. Brown, A., Davison, E., & Sleeper, M. (2010). Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 850–854. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0517.x>;
14. 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), 1629–1642. <https://doi.org/10.1111/jvim.14841>;
15. Chiavegato, D., Borgarelli, M., D'Agnolo, G., & Santilli, R. A. (2009). Pulmonary hypertension in dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 50(3), 253–258. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2009.01529.x>;
16. Condorelli, G., Latronico, M., & Cavarretta, E. (2014). *microRNAs in Cardiovascular Diseases*;
17. Çakmak, H., & Demir, M. (2020). MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balkan Medical Journal*. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.1.94>;

18. Demkes, C., & van Rooij, E. (2017). MicroRNA-146a as a Regulator of Cardiac Energy Metabolism. *Circulation*, 136(8), 762-764.
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.029703>;
19. Dlouha, D., Ivak, P., Netuka, I., Novakova, S., Konarik, M., & Tucanova, Z. et al. (2021). The effect of long-term left ventricular assist device support on flow-sensitive plasma microRNA levels. *International Journal Of Cardiology*, 339, 138-143.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.06.050>;
20. Fiedler, J., Baker, A., Dimmeler, S., Heymans, S., Mayr, M., & Thum, T. (2018). Non-coding RNAs in vascular disease – from basic science to clinical applications: scientific update from the Working Group of Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*, 114(10), 1281-1286.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvy121>;
21. Fox, P. (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>;
22. Ghasemi, A., & Zahediasl, S. (2012). Normality tests for statistical analysis: A guide for non-statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10(2), 486–489.
<https://doi.org/10.5812/ijem.3505>;
23. Guillot, E., Blondel, T., Garelli-Paar, C., Feng, S., Heartsill, S., & Atkins, C. E. (2021). Clinical efficacy of a benazepril and spironolactone combination in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease: The bEnazepril Spironolactone Study (BESST). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(4), 1673–1687.
<https://doi.org/10.1111/jvim.16155>;
24. 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>;
25. Häggström, J., Boswood, A., O'Grady, M., Jöns, O., Smith, S., Swift, S., Borgarelli, M., Gavaghan, B., Kresken, J., Patteson, M., Åblad, B., Bussadori, C. M., Glaes, T., Kovačević, A., Rapp, M., Santilli, R. A., Tidholm, A., Eriksson, A., Belanger, M. C., ... DiFrancia, R. (2013). Longitudinal analysis of quality of life, clinical, radiographic, echocardiographic, and laboratory variables in dogs with myxomatous mitral valve disease receiving Pimobendan or benazepril: The quest study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1441–1451. <https://doi.org/10.1111/jvim.12181>;

26. 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), 163-169. <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.2.163>;
27. Keene, B., Atkins, C., Bonagura, J., Fox, P., Häggström, J., & Fuentes, V. et al. (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>;
28. Lam, C., Gavaghan, B., & Meyers, F. (2021). Radiographic quantification of left atrial size in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 35(2), 747-754. <https://doi.org/10.1111/jvim.16073>;
29. Li, Q., Freeman, L., Rush, J., & Laflamme, D. (2015). Expression Profiling of Circulating MicroRNAs in Canine Myxomatous Mitral Valve Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16(12), 14098-14108. <https://doi.org/10.3390/ijms160614098>;
30. 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. *Journal of Small Animal Practice*, 55(11), 545–550. <https://doi.org/10.1111/jsap.12265>;
31. Maegdefessel, L. (2014). The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. *Journal Of Internal Medicine*, 276(6), 633-644. <https://doi.org/10.1111/joim.12298>;
32. Markby, G., Summers, K. M., MacRae, V. E., Del-Pozo, J., & Corcoran, B. M. (2017). Myxomatous degeneration of the canine mitral valve: From gross changes to molecular events. *Journal of Comparative Pathology*, 156(4), 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.01.009>;
33. Menciotti, G., Abbott, J. A., Aherne, M., Lahmers, S. M., & Borgarelli, M. (2021). Accuracy of echocardiographically estimated pulmonary artery pressure in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology*, 35, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2021.03.003>;
34. Menciotti, G., Borgarelli, M., Aherne, M., Camacho, P., Häggström, J., Ljungvall, I., Lahmers, S., & Abbott, J. (2018). Comparison of the mitral valve morphologies of Cavalier King Charles Spaniels and dogs of other breeds using 3D transthoracic

- echocardiography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5), 1564–1569. <https://doi.org/10.1111/jvim.15252>;
35. Meurs, K. M., Adin, D., O'Donnell, K., Keene, B. W., Atkins, C. E., DeFrancesco, T., & Tou, S. (2019). Myxomatous mitral valve disease in the miniature poodle: A retrospective study. *The Veterinary Journal*, 244, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.019>;
 36. Min, P., & Chan, S. (2015). The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. *European Journal Of Clinical Investigation*, 45(8), 860-874. <https://doi.org/10.1111/eci.12475>;
 37. Nasciutti, P. R., Moraes, A. T., Santos, T. K., Gonçalves Queiroz, K. K., Costa, A. P., Amaral, A. R., Olivindo, R. F., Pontieri, C. F., Jeremias, J. T., Vendramini, T. H., Brunetto, M. A., & Carvalho, R. (2021). Protective effects of omega-3 fatty acids in dogs with myxomatous mitral valve disease stages B2 and C. *PloS ONE*, 16(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254887>;
 38. Ntelios, D., Efthimiadis, G., Zegkos, T., Didagelos, M., Katopodi, T., & Meditskou, S. et al. (2021). Correlation of miR-146a-5p plasma levels and rs2910164 polymorphism with left ventricle outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy. *Hellenic Journal Of Cardiology*, 62(5), 349-354. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2020.04.015>;
 39. O'Brien, M., Beijerink, N., & Wade, C. (2021). Genetics of canine myxomatous mitral valve disease. *Animal Genetics*, 52(4), 409-421. <https://doi.org/10.1111/age.13082>;
 40. Parker, H. G., & Kilroy-Glynn, P. (2012). Myxomatous mitral valve disease in dogs: Does size matter? *Journal of Veterinary Cardiology*, 14(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2012.01.006>;
 41. Paterson, M., & Kriegel, A. (2017). MiR-146a/b: A Family with Shared Seeds and Different Roots. *Physiological Genomics*, 49(4), 243-252. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00133.2016>;
 42. Pillai, R. (2005). MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11(12), 1753-1761. <https://doi.org/10.1261/rna.2248605>;
 43. Reis-Ferreira, A., Neto-Mendes, J., Brás-Silva, C., Lobo, L., & Fontes-Sousa, A. P. (2022). Emerging roles of Micrnas in Veterinary Cardiology. *Veterinary Sciences*, 9(10), 533. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100533>;

44. Ro, W., Kang, M., Song, D., Kim, H., Lee, G., & Park, H. (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>;
45. Sanchis-Gomar, F., Arnau-Moyano, M., Daimiel, L., Lippi, G., Leischik, R., & Vallecillo, N. et al. (2021). Circulating microRNAs fluctuations in exercise-induced cardiac remodeling: A systematic review. *American Journal Of Translational Research*, 13(12), 13298-13309;
46. Siddeek, B., Mauduit, C., Yzydorczyk, C., Benahmed, M., & Simeoni, U. (2018). At the heart of programming: the role of micro-RNAs. *Journal Of Developmental Origins Of Health And Disease*, 9(6), 615-631. <https://doi.org/10.1017/s2040174418000387>;
47. Smith, F., Tilley, L., Oyama, M., & Sleeper, M. (2016). *Manual of canine and feline cardiology* (5^a ed.). Elsevier;
48. Sriram, H., Deshpande, N., Tembhare, P. R., Hasan, S., Gujral, S., Subramanian, P. G., Patkar, N. V., Rajpal, S., Chatterjee, G., Ghogale, S., Tyagi, P., Kedia, S., & Khanka, T. (2021). Improved protocol for plasma microrna extraction and comparison of commercial kits. *Biochemia Medica*, 31(3), 467–475. <https://doi.org/10.11613/bm.2021.030705>;
49. Steudemann, C., Bauersachs, S., Weber, K., & Wess, G. (2013). Detection and comparison of microrna expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. *BMC Veterinary Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-12>;
50. Suzuki, R., Yuchi, Y., Kanno, H., Saito, T., Teshima, T., Matsumoto, H., & Koyama, H. (2021). Pulmonary vascular resistance estimated by echocardiography in dogs with myxomatous mitral valve disease and pulmonary hypertension probability. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.771726>;
51. Van Rooij, E. (2011). The Art of MicroRNA Research. *Circulation Research*, 108(2), 219-234. <https://doi.org/10.1161/circresaha.110.227496>;
52. Vezzosi, T., Grosso, G., Tognetti, R., Meucci, V., Patata, V., Marchesotti, F., & Domenech, O. (2021). The Mitral INsufficiency Echocardiographic score: A severity classification of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, 35(3), 1238-1244. <https://doi.org/10.1111/jvim.16131>;

53. Wang, X., Ha, T., Liu, L., Zou, J., Zhang, X., & Kalbfleisch, J. et al. (2012). Increased expression of microRNA-146a decreases myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 97(3), 432-442. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs356>;
54. Wong, R. K. Y., MacMahon, M., Woodside, J. V., & Simpson, D. A. (2019). A comparison of RNA extraction and sequencing protocols for detection of small RNAs in plasma. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5826-7>;
55. Yang, V., Loughran, K., Meola, D., Jühr, C., Thane, K., Davis, A., & Hoffman, A. (2017). Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model. *Journal Of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1350088. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1350088>;
56. Zidar, N., Boštjančič, E., Glavač, D., & Štajer, D. (2011). MicroRNAs, Innate Immunity and Ventricular Rupture in Human Myocardial Infarction. *Disease Markers*, 31(5), 259-265. <https://doi.org/10.1155/2011/247654>.

Anexo A

Consentimento informado assinado pelos tutores de todos os animais incluídos no estudo.

CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NUM PROJETO DE INVESTIGAÇÃO NO ÂMBITO DO DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Título do estudo: Novas perspetivas na doença mixomatosa da válvula mitral e na hipertensão pulmonar - da fisiopatologia ao diagnóstico

Enquadramento: A doença mixomatosa da válvula mitral (DMVM) e a hipertensão pulmonar (HP) são importantes causas de morbilidade e mortalidade no cão. O presente trabalho permitirá obter resultados científicos originais e com relevância clínica no âmbito destas doenças. O resultado da investigação, orientada pela Prof. Doutora Ana Patrícia Fontes de Sousa (Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP)), será apresentado no ICBAS-UP no final de 2024 podendo, se desejar, contactar a sua autora para se inteirar dos resultados obtidos.

Explicação do estudo: O trabalho de investigação tem como principal objetivo avaliar a prevalência, bem como identificar indicadores clínicos, ecocardiográficos, e de prognóstico na DMVM e na HP. Para o estudo será necessário o acesso aos dados que constam no processo clínico de cada cão. Os dados obtidos do processo clínico serão lançados numa base de dados informática para posterior tratamento estatístico.

Condições e financiamento: Estudo sem financiamento específico aprovado, cuja prossecução será possível no contexto de verbas individuais. A participação neste estudo é de carácter voluntário e não irá ser cobrado qualquer valor adicional, para além do já cobrado no contexto da avaliação cardíaca do cão. Não há qualquer prejuízo caso queira interromper a sua participação. O estudo mereceu o parecer favorável do ORBEA do ICBAS-UP.

Confidencialidade e anonimato: Todos os dados serão obtidos após prévia autorização dos tutores dos animais, sendo que a participação dos mesmos será voluntária. Os dados recolhidos durante este trabalho serão de uso exclusivo no presente estudo. Não há registo de dados de identificação pelo que é garantido o anonimato.

Agradecimentos e identificação da investigadora que pede o consentimento:

Em nome da Equipa de Investigação agradecemos a sua colaboração no presente estudo, cujos resultados serão um importante contributo para a caracterização da DMVM e da HP no cão.

Identificação do investigador responsável: Ana Sofia dos Reis Ferreira (Médica Veterinária - Hospital Veterinário do Porto)

Muito obrigada pela colaboração!

~~~~~  
*Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela/s pessoas/s que acima assina/m e que considero suficientes. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo/a investigador/a.*

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

ESTE DOCUMENTO, COMPOSTO DE 1 PÁGINA, É FEITO EM DUPLICADO: UMA VIA PARA O/A INVESTIGADOR/A, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE

Figura A 1 - Consentimento Informado, livre e esclarecido para a participação no projeto de investigação, assinado pelos tutores de todos os animais incluídos no estudo.

## Anexo B

### Questionário feito aos tutores de todos os animais incluídos no estudo.

AMOSTRA Nº: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ CLÍNICA/HOSPITAL: \_\_\_\_\_

|                                                                                                                                                                                                                       |  |                                                             |                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Identificação do animal</b>                                                                                                                                                                                     |  |                                                             |                                                                     |
| Nome: _____                                                                                                                                                                                                           |  | Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F | Esterilizado: <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N |
| Data de nascimento: ____/____/____                                                                                                                                                                                    |  |                                                             |                                                                     |
| Número de Identificação: _____                                                                                                                                                                                        |  |                                                             |                                                                     |
| Idade no dia da colheita: ____                                                                                                                                                                                        |  | Raça: _____                                                 | Peso: _____ (Kg) C.C.: _____                                        |
| <b>2. Anamnese</b>                                                                                                                                                                                                    |  |                                                             |                                                                     |
| Motivo da consulta: _____                                                                                                                                                                                             |  |                                                             |                                                                     |
| Data de diagnóstico (Problema cardíaco): _____                                                                                                                                                                        |  |                                                             |                                                                     |
| Medicações atuais: _____                                                                                                                                                                                              |  |                                                             |                                                                     |
| <b>3. História clínica</b>                                                                                                                                                                                            |  |                                                             |                                                                     |
| Vacinado <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S                                                                                                                                                        |  | Última vacina: ____/____/____                               |                                                                     |
| Nome comercial/laboratório: _____                                                                                                                                                                                     |  |                                                             |                                                                     |
| <b>Desparasitado</b>                                                                                                                                                                                                  |  |                                                             |                                                                     |
| - Internamente <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S                                                                                                                                                  |  | Há quanto tempo? _____                                      |                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                                       |  | Desparasitante: _____                                       |                                                                     |
| - Externamente <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S                                                                                                                                                  |  | Há quanto tempo? _____                                      |                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                                       |  | Desparasitante: _____                                       |                                                                     |
| Contacta com outros animais: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim                                                                                                                                |  |                                                             |                                                                     |
| Quais: _____                                                                                                                                                                                                          |  |                                                             |                                                                     |
| Animais com doença(s): <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim                                                                                                                                      |  |                                                             |                                                                     |
| Especificar: _____                                                                                                                                                                                                    |  |                                                             |                                                                     |
| <b>4. Tipo de habitação</b>                                                                                                                                                                                           |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Apartamento                                                                                                                                                                                  |  | <input type="checkbox"/> Quinta                             | <input type="checkbox"/> Vivenda com jardim                         |
| <input type="checkbox"/> Ambiente urbano                                                                                                                                                                              |  | <input type="checkbox"/> Ambiente rural                     | <input type="checkbox"/> Criador/Canil                              |
|                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> Outro                              | _____                                                               |
| <b>5. Hábitos de vida</b>                                                                                                                                                                                             |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Vive exclusivamente no exterior                                                                                                                                                              |  | <input type="checkbox"/> Vive exclusivamente dentro de casa |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Dentro de casa mas tem acesso ao exterior                                                                                                                                                    |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Animal errante                                                                                                                                                                               |  |                                                             |                                                                     |
| <b>6. Alimentação</b>                                                                                                                                                                                                 |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Caseira <input type="checkbox"/> Comercial seca <input type="checkbox"/> Comercial húmida                                                                                                    |  |                                                             |                                                                     |
| <b>7. Viagens</b>                                                                                                                                                                                                     |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Área de residência <input type="checkbox"/> Estrangeiro <input type="checkbox"/> Várias regiões dentro do país <input type="checkbox"/> Regiões em altitude |  |                                                             |                                                                     |
| Quais? Quando? _____                                                                                                                                                                                                  |  |                                                             |                                                                     |
| <b>8. Sintomatologia (se presente):</b>                                                                                                                                                                               |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Sopro Grau: ____                                                                                                                                                                             |  | <input type="checkbox"/> Sistólico                          | <input type="checkbox"/> Diastólico                                 |
|                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> Contínuo                           | <input type="checkbox"/> Arritmia Qual: _____                       |
| <input type="checkbox"/> Síncope                                                                                                                                                                                      |  | <input type="checkbox"/> Taquipneia                         | <input type="checkbox"/> Dispneia                                   |
| <input type="checkbox"/> Taquipneia prolongada após exercício                                                                                                                                                         |  | <input type="checkbox"/> Tosse                              | <input type="checkbox"/> Intolerância ao exercício                  |
| <input type="checkbox"/> Ascite                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> Edemas periféricos                 | <input type="checkbox"/> Febre                                      |
|                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> Mucosas Pálidas                    | <input type="checkbox"/> Linfadenopatias                            |
| <input type="checkbox"/> Letargia                                                                                                                                                                                     |  | <input type="checkbox"/> Anorexia                           | <input type="checkbox"/> Perda de Peso                              |
|                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> Pulso jugular                      |                                                                     |
| <b>Outras:</b> _____                                                                                                                                                                                                  |  |                                                             |                                                                     |
| <b>9. Insuficiência Cardíaca Congestiva</b> <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N / <input type="checkbox"/> Esquerda <input type="checkbox"/> Direita <input type="checkbox"/> Ambas                 |  |                                                             |                                                                     |
| <b>10. Alterações laboratoriais:</b>                                                                                                                                                                                  |  |                                                             |                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Desconhecidas                                                                                                                                                                                |  | <input type="checkbox"/> Anemia                             | <input type="checkbox"/> Leucocitose                                |
| <input type="checkbox"/> Azotémia                                                                                                                                                                                     |  | <input type="checkbox"/> Outros                             | <input type="checkbox"/> Hipocalemia                                |
|                                                                                                                                                                                                                       |  |                                                             | <input type="checkbox"/> ↑ Enz. Hepáticas                           |
| <b>11. Rx torácico:</b> _____                                                                                                                                                                                         |  |                                                             |                                                                     |
| <b>12. Pressão arterial:</b> _____                                                                                                                                                                                    |  |                                                             |                                                                     |
| <b>13. Ecocardiografia:</b> <input type="checkbox"/> DDVM <input type="checkbox"/> HP _____                                                                                                                           |  |                                                             |                                                                     |
| Classificação ACVIM: _____                                                                                                                                                                                            |  |                                                             |                                                                     |
| <b>14. Electrocardiografia:</b> <input type="checkbox"/> Sinusal FC: _____                                                                                                                                            |  |                                                             |                                                                     |
| <b>15. Outras informações relevantes:</b> _____                                                                                                                                                                       |  |                                                             |                                                                     |

Figura B 2 – Questionário feito aos tutores de todos os animais incluídos no estudo.