



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021024802-5 A2

(22) Data do Depósito: 08/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
20/06/2023

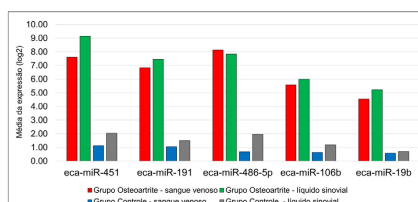
(54) **Título:** PAINEL DE MICRORNAS CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS E USO

(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/6876; C12N 15/11.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI; JULIANA REGINA PEIRÓ; ALEXANDRE LIMA ANDRADE; FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS; FLÁVIA LOMBARDI LOPES; FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA; LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN; LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES.

(57) **Resumo:** PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS E USO. A presente invenção se refere a um painel de microRNAs circulantes, que compreende cinco microRNAs: eca-miR-451 (SEQ ID NO: 01) eca-miR-191 (SEQ ID NO: 02), eca-miR-486-5p (SEQ ID NO: 03), eca-miR-106b (SEQ ID NO: 04), e eca-miR-19b (SEQ ID NO: 05), cuja expressão aumentada, detectada no sangue venoso equino, corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com osteoartrite tibiotalar, assim, a invenção também se refere ao uso do painel de microRNAs para detecção precoce das alterações da regulação da expressão gênica em artropatias de equinos, utilizando sangue venoso do animal como amostra, antes mesmo do aparecimento de sinais radiográficos ou sinais de dor na articulação. Portanto, os cinco miRNAs identificados no sangue equino servem como biomarcadores não-invasivo sistêmico e de detecção precoce para artropatias tibiotalares, sendo clinicamente aplicável na triagem de pacientes.



PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS E USO

BREVE DESCRIÇÃO

[001] Trata a presente solicitação de patente de invenção de um **“PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS E USO”**, que se refere a um painel de microRNAs circulantes, mais especificamente, eca-miR-451, eca-miR-191, eca-miR-486-5p, eca-miR-106b, e eca-miR-19b, a ser empregado para detecção precoce de osteoartrite tibiotalar em equinos de maneira não-invasiva e sistêmica, a partir de amostras de sangue venoso equino.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à seção de química ao campo de engenharia genética, mais especificamente, ao campo de processos de medição ou ensaio envolvendo ácidos nucleicos; bem como à seção de necessidades humanas, ao campo da veterinária, ao campo de diagnóstico e identificação, por se referir a um painel de microRNAs circulantes a ser empregado para detecção precoce de osteoartrite tibiotalar em equinos.

CONVENCIMENTO

[003] A expressão desregulada de microRNAs específicos (miRNAs) no sangue é conhecida como biomarcadores diagnósticos promissores para diagnóstico de algumas enfermidades. Evidências recentes demonstram que miRNAs na circulação podem refletir o estado de enfermidades presentes, podendo ser considerados como biomarcadores diagnósticos promissores e fontes potenciais para analisar o papel dos miRNAs em distúrbios articulares.

[004] Novos métodos para obtenção de amostras de tecido sinovial estão se tornando mais amplamente disponíveis e, conseqüentemente, gerando resultados que avançaram no desenvolvimento de alvos terapêuticos e identificação de biomarcadores de resposta a terapias.

[005] A partir da identificação de miRNAs em artropatias de equinos, pôde-se criar modelos para estudar as vias de sinalização comuns a enfermidades articulares em humanos, as quais, a longo prazo, podem acelerar o desenvolvimento de medidas terapêuticas para estas em ambas as espécies. Concentrações de miRNAs presentes em plasma e líquido sinovial de pacientes demonstram indícios de que há correlação entre os miRNAs de fluidos sinoviais e do plasma, evidências recentes demonstram que

miRNAs na circulação podem refletir o estado de enfermidades presentes, podendo ser considerados como biomarcadores diagnósticos promissores e fontes potenciais para analisar o papel dos miRNAs em distúrbios articulares.

[006] Distúrbios articulares em equinos, especialmente em equinos atletas, causam grande sofrimento aos animais, além de representarem grandes perdas econômicas e implicarem na retirada precoce dos animais das atividades atléticas (Sotelo, 2019: Avaliação dos efeitos *in vitro* do Dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda). O diagnóstico precoce de distúrbios dessa natureza promove melhoria na qualidade de vida do animal e aumenta as chances de sucesso nos tratamentos empregados.

[007] Convencionalmente, segundo Delchiaro e colaboradores (2020: Condromalácia na articulação tíbio társica das trócleas em equino – Relato de caso), o diagnóstico de distúrbios articulares são baseados principalmente em achados clínicos, radiográficos e ultrassonográficos, podendo, eventualmente serem realizados exames complementares, tais como artroscopia e a artrocentese, os quais, através de análises químicas, citológicas e de cultura do líquido sinovial, podem contribuir para o diagnóstico das enfermidades articulares, sendo elas sépticas ou inflamatórias (Kaser-Hotz e Veltschi, 2006: *Diagnostic Medical Imaging. In: Auer and Stick*).

[008] Nesse contexto, a presente invenção disponibiliza um painel com identificação de cinco miRNAs (eca-miR-451, eca-miR-191, eca-miR-486-5p, eca-miR-106b, e eca-miR-19b) no sangue venoso equino, cuja expressão aumentada corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com osteoartrite tibiotársica. O painel com os cinco miRNAs identificados no sangue equino serve como biomarcador não-invasivo sistêmico e de

detecção precoce para artropatias tibiotársicas, podendo ser clinicamente aplicável na triagem de pacientes.

[009] A principal aplicação da presente invenção é o diagnóstico precoce de artropatias tibiotársicas em equinos, tendo em vista que o desenvolvimento de terapias direcionadas aos miRNAs relacionados a doenças, usando inibidores de miRNA para destruir miRNAs sobre-expressos em sua forma madura ou precursora é uma abordagem bastante promissora.

[010] Estudos baseados na terapia “anti-miRNA” já demonstram resultados positivos no tratamento de doenças articulares humanas, impedindo a destruição das articulações e atenuando a progressão da enfermidade. Atletas humanos e equinos poderão vir a se beneficiar de novos tratamentos, assim, o desenvolvimento de modelos experimentais seguros na espécie equina pode ser útil para testar novas terapias, pois ambas as espécies desenvolvem atividades esportivas e enfermidades semelhantes. Portanto, a presente invenção contribui de maneira positiva para o desenvolvimento e aperfeiçoamento do campo técnico, corroborando com sua inventividade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[011] Atualmente, estão disponíveis no estado da técnica algumas anterioridades que se referem ao uso de miRNA como biomarcadores que auxiliam no diagnóstico de algumas patologias. No entanto, nenhuma delas, associadas ou não, resolvem o problema técnico do campo da utilidade, relacionado à detecção de micro RNAs circulantes e seu emprego para diagnóstico *in vitro* de distúrbios articulares em equinos, o que é possibilitado pelo painel de microRNAs pleiteado na presente invenção, conforme observado a seguir.

[012] Castanheira e colaboradores (2021), em "*Equine synovial fluid small non-coding RNA signatures in early osteoarthritis*", preconizam que estágios iniciais da osteoartrite seriam capazes de alterar a expressão de sncRNAs, facilitando a compreensão da patogênese subjacente e potencialmente fornecer biomarcadores precoces. Para testar sua hipótese, o grupo realizou o sequenciamento do RNA, a partir de amostra do líquido sinovial das articulações metacarpofalângicas dos cavalos controle e com osteoartrite inicial. Um grupo de sncRNAs expressos diferencialmente foi selecionado

para validação adicional por qRT-PCR, em seguida, foi promovida uma análise de bioinformática, a fim de identificar alvos putativos dos microRNAs diferencialmente expressos e para explorar associações potenciais com processos biológicos específicos. Após a análise, o grupo concluiu que, os sncRNAs do líquido sinovial podem ser usados como biomarcadores moleculares para doenças precoces em articulações osteoartíticas equinas e que a caracterização dessas mudanças moleculares dinâmicas pode fornecer novos *insights* sobre o processo e mecanismo de desenvolvimento de osteoartrite precoce, o que é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

[013] Antunes e colaboradores (2019), em “*On the road to biomarkers: developing a robust system for miRNA evaluation in equine blood and synovial fluid*”, tiveram como objetivo desenvolver um método robusto e reproduzível para o isolamento de miRNA do fluido sinovial equino e plasma sanguíneo para, posteriormente, ser utilizado no sequenciamento de RNA de cavalos com doença articular. Para tanto, o líquido sinovial e o sangue foram coletados de cavalos submetidos à artroscopia articular de cavalos com OA ou OC. O fluido sinovial foi centrifugado para sedimentar quaisquer células ou fragmentos. O sobrenadante foi congelado rapidamente e armazenado a -80°C. O sangue equino foi centrifugado em vacutainers revestidos com EDTA. O sobrenadante foi então congelado rapidamente e armazenado a -80°C. O miRNA foi extraído do plasma sanguíneo e do fluido sinovial usando o kit avançado Qiagen Serum / Plasma de acordo com as instruções do fabricante. O RNA *spike-in* da Qiagen foi adicionado ao tampão de lise durante cada extração. O líquido sinovial foi isolado no estado puro ou diluído (1:1). O miRNA foi revertido transcrito usando Qiagen LNA RT kit com outro conjunto de Qiagen *spike-in* RNAs utilizados. A análise de qPCR foi realizada no cDNA resultante para avaliar os controles de pico utilizados (UniSp2, UniSp4, UniSp6, cel-miR-39) e miR-132, miR-146a, miR-16, miR-223. O miRNA isolado foi usado para preparar bibliotecas de miRNA para sequenciamento de RNA usando o Qiagen QIAseq miRNA Library Kit de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas resultantes foram submetidas à análise de bioanalisador usando um chip de DNA de alta sensibilidade em um bioanalisador Agilent 2100. A partir dos resultados preliminares e da

avaliação de qualidade, o grupo acredita ter estabelecido um método robusto de isolamento de RNA tanto no líquido sinovial equino quanto no plasma, possibilitando a preparação de bibliotecas para realizar o sequenciamento de miRNA em cavalos OA e OC versus controles saudáveis para estabelecer uma coorte de miRNAs diferencialmente expressos em cavalos com doença articular.

[014] Zhang e colaboradores (2017), em "*Role of MicroRNA in Osteoarthritis*", fizeram uma revisão bibliográfica com o objetivo de destacar o papel do miRNA na regulação da expressão gênica em condrócitos articulares e sua importância na patogênese da osteoartrite, com uma discussão sobre o potencial do miRNA como um novo biomarcador e alvo terapêutico para osteoartrite.

[015] Hollis e Starkey (2018), em "*MicroRNAs in equine veterinary science*", também fizeram uma revisão, na qual resumiram como os microRNAs modulam a expressão gênica e explicaram a nomenclatura dos microRNAs. Além disso, discutiram as aplicações potenciais de microRNAs no diagnóstico e tratamento de doenças em equinos no contexto da soma do conhecimento atual sobre a expressão de microRNAs em tecidos de equinos normais e doentes.

[016] As quatro anterioridades inicialmente apresentadas compreendem publicações científicas que relatam a importância e o uso de microRNAs específicos como biomarcadores para diversas finalidades, especialmente, relacionadas à osteoartrite e com o uso desses em equinos. No entanto, nenhuma das anterioridades menciona os miRNAs que compreendem a presente invenção, nem o uso desses cinco miRNAs para obtenção de um painel para detecção de distúrbios articulares, o qual é empregado para detecção precoce de osteoartrite tibiotársica em equinos de maneira não-invasiva e sistêmica, a partir de amostras de sangue venoso equino.

[017] Unger e colaboradores (2021), em "*Diagnostic potential of three serum microRNAs as biomarkers for equine sarcoid disease in horses and donkeys*", avaliaram eca-miR-331, eca-miR-100 e eca-miR-1 como biomarcadores séricos para doença sarcóide equina (SE). Para tanto, a expressão de eca-miR-331, eca-miR-100 e eca-miR-1 séricos em equídeos afetados por SE foi comparada ao controle pareado por idade, sexo e raça livre de tumor cavalos e burros com outros tumores de pele

usando PCR quantitativo de transcrição reversa (reação em cadeia da polimerase) para quantificação relativa de miRNA. Influências de variáveis biológicas, pré-analíticas e clínicas na expressão de miRNA foram examinadas. As análises da curva de características do operador receptor (ROC) foram usadas para determinar as diferenças na expressão de miRNA entre os grupos. Os resultados das análises demonstraram que a expressão de eca-miR-100 foi afetada pela idade ($P = 0,003$) e a expressão de eca-miR-100 e eca-miR-1 foi afetada pela hemólise (ambos $P < 0,001$). Eca-miR-331 não foi afetado por variação biológica, hemólise, tipo de ES e gravidade da doença. As concentrações de Eca-miR-331 foram maiores nos afetados por SE em comparação com os controles sem tumor ($P = 0,002$). A análise da curva ROC indicou uma área sob a curva de 0,65 ($P = 0,002$) com uma sensibilidade de 60%, especificidade de 71% e razões de verossimilhança positivas e negativas de 2,1 e 0,56, respectivamente, para diagnosticar ES. A expressão de Eca-miR-331 não discriminou entre cavalos com SE e outros tumores de pele. A expressão de eca-miR-100 e eca-miR-1 não foi diferente entre os grupos. Assim, os pesquisadores concluíram que, a expressão sérica de eca-miR-331 não é sensível nem específica o suficiente como um único biomarcador SE. Se combinado com outros miRNAs, pode ser útil para o diagnóstico de SE. Ainda que a anterioridade faça referência ao eca-miR-451, ele foi descrito como biomarcador para sarcoidose equina, portanto, tendo em vista se tratar de uma aplicação diferente da descrita na presente invenção, a anterioridade não antecipa o uso do biomarcador nem seu emprego no painel de microRNAs circulantes.

[018] Oliveira Jr. e colaboradores (2021), em *"Effects of endurance racing on horse plasma extracellular particle miRNA"*, avaliaram os efeitos de corrida de resistência de 160 km sobre as partículas extracelulares de plasma de cavalos e sua população de miRNA. Para tanto, o plasma de cinco cavalos árabes durante cinco momentos de uma prova de resistência foi analisado. Partículas extracelulares foram purificadas do plasma e caracterizadas por microscopia eletrônica, sensor de pulso resistivo (qNano) e *Western blotting*. RNAs pequenos foram purificados a partir de plasma de cavalo e o sequenciamento foi realizado. As corridas de resistência aumentaram a concentração e o diâmetro médio das partículas extracelulares, em comparação com antes da corrida.

O *Western blotting* mostrou uma alta concentração de proteínas das vesículas extracelulares duas horas após a corrida, que retornou à linha de base quinze horas após a corrida. A análise de expressão diferencial de microRNA revelou níveis crescentes de eca-miR-486-5p durante e após a corrida, e níveis decrescentes de eca-miR-9083 após o final. Assim, o estudo adicionou novos dados sobre a variação nas concentrações plasmáticas de partículas extracelulares após exercícios de longa distância e trouxe novos *insights* sobre os papéis dos miRNAs derivados do exercício, durante exercícios de resistência e de baixa intensidade. Apesar de a anterioridade mencionar que o eca-miR-486-5p é observado com maior expressão em equinos de competições de resistência, não é citado seu uso para detecção precoce de distúrbios articulares, como observado na presente invenção, portanto, a anterioridade não antecipa a matéria pleiteada.

[019] Niwane e colaboradores (2021), em “*miR-486-5p: A Prognostic Biomarker for Chronic Myeloid Leukemia*”, analisou alterações na expressão de miR-486-5p em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Os resultados indicaram que a expressão do miR-486-5p foi significativamente regulada positivamente nas células K562 após a exposição ao imatinibe, em comparação com as células K562 não tratadas (valor $p = 0,047$). As do grupo suportam o papel supressor de tumor de miR-486-5p na LMC. A regulação negativa da expressão do miR-486-5p pode ser criticamente importante na progressão da doença em pacientes com LMC. A regulação positiva da expressão de miR-486-5p em células K562 de exposição pós-imatinibe e pacientes com LMC após 12 meses de tratamento com imatinibe sugere um papel efector onco-supressor de miR-486-5p na via de sinalização BCR-ABL a jusante. Assim, o miR-486-5p pode ser explorado como um novo biomarcador para a detecção precoce de LMC. Embora a anterioridade faça referências ao eca-miR-486-5p, ele é citado como biomarcador para prognóstico de neoplasias malignas, como leucemia mieloide crônica, não sendo relatado seu uso veterinário, portanto, a anterioridade não antecipa a matéria pleiteada.

[020] Também estão presentes no atual estado da técnica as anterioridades JP2016025853, intitulada “*Micro RNA-based methods and compositions for diagnosing*

and treating solid cancers” e a EP1937845B1, intitulada “*Micro-RNA-based methods and compositions for the diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer*”, as quais compreendem invenções na área de microRNAs e procedimentos e métodos de diagnóstico, prognóstico e tratamentos de neoplasias malignas, como câncer de mama, sem no entanto mencionar o uso veterinário de microRNAs ou ainda para o diagnóstico prematuro de distúrbios articulares e que, portanto, não antecipam a presente invenção.

[021] A anterioridade BRPI0920582A2, intitulada “Biomarcadores e métodos de detecção e tratamento da dor espinhal e de articulação”, descreve biomarcadores, incluindo complexos de fibronectina-agrecano isolados que se correlacionam com dor e inflamação de espinha ou articulação e métodos para sua detecção. São também fornecidos métodos para identificar locais de tratamento na espinha ou articulação para tratamento de dor e inflamação por detectar a presença de, ou níveis aumentados de, complexo de fibronectina-agrecano, além de métodos para tratar dor e inflamação de espinha ou articulação. Ainda que a anterioridade se refira a biomarcadores para detecção e tratamento na espinha ou articulação, ela não menciona os cinco biomarcadores empregados na presente invenção, portanto, não antecipa a matéria pleiteada.

[022] A anterioridade KR102070969B1, intitulada “*A marker for the identification of pain*”, descreve um microRNA como um marcador para determinar objetivamente o grau de dor que pode ser negligenciado pela sensação subjetiva e para determinar ou prever sua gravidade. Assim, a anterioridade se refere a um marcador para prever a dor, um kit e/ou a uma composição de predição que compreende um agente para medir o nível de expressão de hsa-mir-1285-3p. Ainda que a anterioridade empregue a tecnologia de microRNA, ela não descreve os mesmo miRNA utilizados na presente invenção para detecção de distúrbios articulares em equinos, assim como não antecipa a associação de cinco miRNA para a obtenção de um painel de microRNA circulantes para detecção precoce osteoartrite tibiotársica em equinos.

[023] A anterioridade US6589755B1, intitulada “*Assay for quantifying arthritic conditions*”, se refere a fragmentos de proteína de baixo peso molecular que são

produtos de degradação de COMP e têm um peso molecular de cerca de 14-33 quilodaltons e anticorpos policlonais e monoclonais para o novo fragmento de COMP e outros fragmentos de COMP conhecidos de molecular peso 67-80 kDa e 150-250 kDa, e fragmentos de trombospondina (coletivamente referidos como "ADP"), bem como um ensaio para medir o nível de ADP que compreende: (1) incubar uma amostra de fluido corporal, que foi obtida a partir de um paciente com artrite, em condições redutoras ou não redutoras; (2) incubar a amostra de fluido corporal com um anticorpo anti-ADP; e (3) medir o nível de anticorpo anti-ADP ligado na amostra de fluido corporal. Também é divulgado um ensaio para medir a proporção de ADP para KS como uma medida de diagnóstico de doença artrítica. Tendo em vista que a anterioridade não menciona o emprego dos cinco miRNA utilizados na presente invenção, a anterioridade não antecipa a matéria pleiteada.

[024] Ainda que estejam presentes no atual estado da técnica diversas anterioridades que se referem ao emprego de microRNAs como biomarcadores, especialmente para osteoartrite e de uso veterinário, nenhuma delas resolve o problema técnico resolvido pela presente invenção: a detecção de microRNAs circulantes e consequente diagnóstico *in vitro* de distúrbios articulares em equinos; o que corrobora com sua inventividade e contribuição ao campo técnico, uma vez que, em nenhuma das anterioridades são mencionados os miRNAs descritos na presente invenção como marcadores da doença.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[025] A presente invenção tem como objetivo disponibilizar um painel de miRNA a ser utilizado para detecção precoce de artropatias tibiotársicas em equinos, a partir da identificação de cinco miRNAs no sangue venoso equino.

DA INVENÇÃO

[026] A presente invenção descreve um painel com identificação de cinco miRNAs (eca-miR-451, eca-miR-191, eca-miR-486-5p, eca-miR-106b, e eca-miR-19b) no sangue venoso equino, cuja expressão aumentada corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com osteoartrite tibiotársica. O painel com os cinco miRNAs identificados no sangue equino serve como biomarcador não-invasivo sistêmico e de

detecção precoce para artropatias tibiotársicas, podendo ser clinicamente aplicável na triagem de pacientes.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[027] A presente invenção apresenta como principais vantagens:

- ✓ Disponibilizar uma solução alternativa e superior às existentes para diagnósticos por detecção de biomarcadores de distúrbios articulares em equinos, com processo mais rápido e de custo reduzido;
- ✓ Disponibilizar um painel de miRNA que possibilita a identificação de cinco miRNAs no sangue venoso equino, cuja expressão aumentada corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com osteoartrite tibiotársica;
- ✓ Disponibilizar um painel de miRNA que possibilita a detecção dos biomarcadores para artropatias tibiotársicas de maneira não-invasiva, sistêmica e precocemente;
- ✓ Disponibilizar um painel de miRNA que possibilita a detecção precoce das alterações da regulação da expressão gênica em artropatias de equinos, utilizando sangue venoso, antes mesmo do aparecimento de sinais radiográficos ou sinais de dor na articulação.

DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS

[028] A fim de possibilitar melhor o entendimento da presente invenção, serão feitas referências às sequências biológicas descritas a seguir:

- ✓ SEQ ID NO: 1 - eca-miR-451 compreendido pela sequência de nucleotídeos AAACCGUUACCAUUACUGUGUU
- ✓ SEQ ID NO: 2 - eca-miR-191 compreendido pela sequência de nucleotídeos CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
- ✓ SEQ ID NO: 3 - eca-miR-486-5p compreendido pela sequência de nucleotídeos UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG
- ✓ SEQ ID NO: 4 - eca-miR-106b compreendido pela sequência de nucleotídeos UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
- ✓ SEQ ID NO: 5 - eca-miR-19b compreendido pela sequência de nucleotídeos UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[029] A fim de possibilitar melhor o entendimento da presente invenção, serão feitas referências à figura descrita a seguir:

- ✓ FIG. 1: Média da expressão (log2) de cada miRNA, de acordo com o grupo (osteoartrite e controle) e amostra (sangue venoso e líquido sinovial).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[030] A presente invenção refere-se a um painel com identificação de cinco miRNAs no sangue venoso equino, cuja expressão aumentada corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com osteoartrite tibiotársica, e que se constitui de:

- ✓ eca-miR-451 compreendido pela SEQ ID NO: 1, ID 20513943, MIMAT0013041, Cromossomo de origem chr11 (42750442 até 42750463, -);
- ✓ eca-miR-191 compreendido pela SEQ ID NO: 2, ID 20513981, MIMAT0013079, Cromossomo de origem chr16 (38001165 até 38001187, +);
- ✓ eca-miR-486-5p compreendido pela SEQ ID NO: 3, ID 20514089, MIMAT0013186, Cromossomo de origem chr27 (3709572 até 3709593, +);
- ✓ eca-miR-106b compreendido pela SEQ ID NO: 4, ID 20513956, MIMAT0013054, Cromossomo de origem chr13 (8034729 até 8034749, -);
- ✓ eca-miR-19b compreendido pela SEQ ID NO: 5, ID 20513989, MIMAT0013087, Cromossomo de origem chr17 (61793043 até 61793065, +).

[031] A seguir, são descritas as etapas do desenvolvimento do painel de microRNAs circulantes pleiteado.

[032] Para o ensaio, foram utilizados seis equinos atletas da raça Quarto de Milha. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle (GC) - composto por animais sem qualquer enfermidade ósteo-articular, e Grupo osteoartrite (OA) - composto por animais diagnosticados com osteoartrite társica traumática não experimental. Para a seleção, os equinos foram submetidos a exame clínico consistindo em exame visual para detectar a presença de claudicação, trauma, anormalidades de pele e efusão articular. Exames complementares como termografia, radiografia, e ultrassonografia das articulações tibiotársicas foram realizados para avaliar a integridade articular e óssea, ou presença de sinais de osteoartrite.

[033] Através de venopunção da jugular, o tubo com sangue venoso foi imediatamente centrifugado, durante 10 minutos. O anel leucocitário com volume estimado de 500µL, foi coletado com micropipeta e ponteira universal 100-1000 µL com filtro e aliqotado em tubo juntamente com 1000 µL de RNAlater (Ambion®). Posteriormente foi armazenado em freezer -80°C até o momento da extração do miRNA. Subsequentemente, o equino foi contido em tronco de contenção para que fosse realizada a tricotomia e antissepsia na região lateral da articulação tibiotársica. O equino foi sedado através da administração de detomidina na dose de 10 µg/Kg/IV. Com o animal sedado, utilizando material estéril, a amostra de líquido sinovial foi colhida através de artrocentese utilizando agulha descartável hipodérmica 25 x 0,8 mm para acessar a bursa superior da cápsula articular, através do acesso latero-plantar entre o calcâneo e o maléolo lateral da tíbia. O líquido sinovial foi aspirado com seringa estéril de 5 mL. O líquido sinovial foi imediatamente alocado em tubo de coleta à vácuo com EDTA K3 4 ml. Posteriormente 500 µl de líquido sinovial foram aliqotados em microtubos (DNase e RNase free) com 1000 µl de RNAlater (Ambion®), e foi armazenado em freezer -80°C até o momento da extração do miRNA.

[034] As amostras, que permaneceram congeladas a -80°C até o momento da extração, foram descongeladas e centrifugadas para remoção do RNA com micropipeta e ponteira universal. Os miRNAs foram extraídos das amostras utilizando uma adaptação do kit “*Alternative Protocol for Extraction of RNA from Cells Captured on LeukoLOCK Filters Using TRI Reagent*® (Thermo Fisher Scientific®)”. Em seguida as amostras de RNA foram concentradas no equipamento Eppendorf Concentrator 5301 conforme descrito em HERMANN *et al.* (2019).

[035] O kit utilizado foi o “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip”, realizado segundo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram marcadas com o kit “FlashTag® Biotin HSR RNA Labeling Kits”, hibridizadas com o kit “GeneAtlas® Hybridization, Wash, and Stain Kit for miRNA Arrays” e escaneadas no equipamento “GeneAtlas Affymetrix®”.

[036] Dentre os 360 miRNAs presentes no *strip*, destacaram-se cinco miRNAs diferencialmente expressos (eca-miR-451, eca-miR-191, eca-miR-486-5p, eca-miR-

106b, e ecamir-19b), os quais são compreendidos no painel pleiteado, para que possam ser utilizados na detecção precoce da osteoartrite tibiotársica em equinos, visto que a expressão desses miRNAs estão aumentadas no sangue venoso e no líquido sinovial dos equinos do grupo osteoartrite da análise, conforme observado na Figura 1 e na Tabela 1 (Fig. 1).

MicroR NA	Sangue Venoso				Líquido Sinovial			
	Média e desvio padrão (log2)		Fold Chan ge	Valor de P	Média e desvio padrão (log2)		Fold Chan ge	Valor de P
	Grupo Osteo- artrite	Grupo Con- trole			Grupo Osteo- artrite	Grupo Con- trole		
eca- miR- 191	7,60±0, 34	1,12±0, 16	89,31	0,000000 002	9,14±3, 42	2,04±0, 09	136,9 3	0,011900 000
eca- miR- 191	6,83±1, 61	1,05±0, 14	54,93	0,000200 000	7,44±3, 32	1,50±0, 24	61,36	0,035500 000
eca- miR- 486-5p	8,14±1, 67	0,68±0, 17	176,4 3	0,000048 500	7,84±3, 89	1,96±0, 11	58,61	0,117700 000
eca- miR- 106b	5,58±0, 56	0,63±0, 10	31,03	0,000000 299	6,00±2, 55	1,18±0, 11	28,34	0,023700 000
eca- miR- 19b	4,55±0, 04	0,58±0, 15	15,64	0,000000 001	5,23±3, 23	0,70±0, 16	23,13	0,033500 000

Tabela 1: Média da expressão e desvio padrão (log2) de cada miRNA, de acordo com a amostra (Sangue Venoso e Líquido Sinovial) e o grupo (Osteoartrite e Controle).

[037] Para o desenvolvimento do painel de microRNAs foi utilizado um equipamento já disponível comercialmente (microarranjo - Affymetrix), o qual viabilizou além de permitir a construção do dispositivo, viabilizou seu uso como ferramenta de diagnóstico precoce para osteoartrite tibiotársica em equinos.

REIVINDICAÇÕES

1. **PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS** caracterizado por se constituir de cinco micro RNAs:
 - ✓ eca-miR-451 compreendido pela SEQ ID NO: 1;
 - ✓ eca-miR-191 compreendido pela SEQ ID NO: 2;
 - ✓ eca-miR-486-5p compreendido pela SEQ ID NO: 3;
 - ✓ eca-miR-106b compreendido pela SEQ ID NO: 4;
 - ✓ eca-miR-19b compreendido pela SEQ ID NO: 5.
2. **USO DE PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS**, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser para detecção dos microRNAs marcadores: eca-miR-451, compreendido pela SEQ ID NO: 1; eca-miR-191, compreendido pela SEQ ID NO: 2; eca-miR-486-5p, compreendido pela SEQ ID NO: 3; eca-miR-106b, compreendido pela SEQ ID NO: 4 e eca-miR-19b, compreendido pela SEQ ID NO: 5, no sangue venoso de equinos.
3. **USO DE PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS**, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser para a produção de tiras, kits ou dispositivos para diagnóstico de osteoartrite tibiotársica em equinos.
4. **USO DE PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS**, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pela** detecção dos microRNAs alvo se dar a partir de amostras de sangue venoso equino.

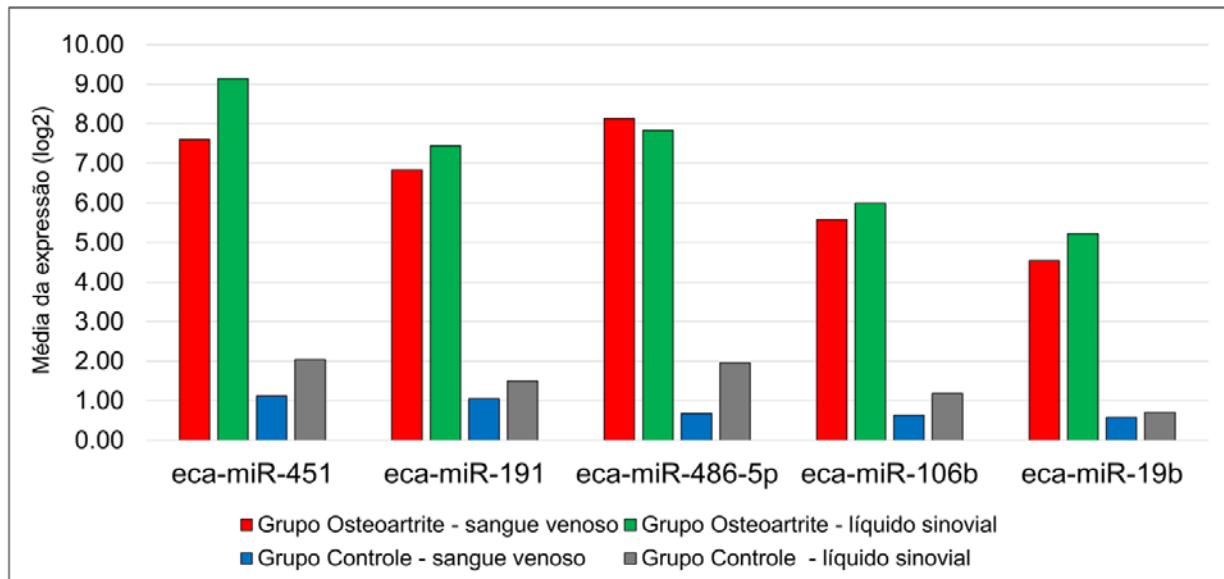


FIG. 1

RESUMO

PAINEL DE microRNAs CIRCULANTES PARA DETECÇÃO PRECOCE DE OSTEOARTRITE TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS E USO.

A presente invenção se refere a um painel de microRNAs circulantes, que compreende cinco microRNAs: eca-miR-451 (SEQ ID NO: 01) eca-miR-191 (SEQ ID NO: 02), eca-miR-486-5p (SEQ ID NO: 03), eca-miR-106b (SEQ ID NO: 04), e eca-miR-19b (SEQ ID NO: 05), cuja expressão aumentada, detectada no sangue venoso equino, corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com osteoartrite tibiotársica, assim, a invenção também se refere ao uso do painel de microRNAs para detecção precoce das alterações da regulação da expressão gênica em artropatias de equinos, utilizando sangue venoso do animal como amostra, antes mesmo do aparecimento de sinais radiográficos ou sinais de dor na articulação. Portanto, os cinco miRNAs identificados no sangue equino servem como biomarcadores não-invasivo sistêmico e de detecção precoce para artropatias tibiotársicas, sendo clinicamente aplicável na triagem de pacientes.