

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAS CIRCULANTES
E DA ARTICULAÇÃO TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS

Araçatuba

2022

DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAS CIRCULANTES
E DA ARTICULAÇÃO TIBIOTÁRSICA EM EQUINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a Associada Juliana Regina Peiró

Coorientador: Prof^o Associado Paulo Alécio Canola

Araçatuba

2022

D391a

Denadai, Daniela Scantamburlo

Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos / Daniela Scantamburlo Denadai. – Araçatuba, 2022

95 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Juliana Regina Peiró

Coorientadora: Paulo Alécio Canola

1. Articulação. 2. Artropatias. 3. Osteoartrite. 4. Cavalo. 5. microRNA. I.

Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Araçatuba
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos

AUTORA: DANIELA SCANTAMBURLO DENADA
ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ
COORIENTADOR: PAULO ALÉSCIO CANOLA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias / Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. ÁLVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Vila Velha

Araçatuba, 17 de fevereiro de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos

AUTORA: DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

COORIENTADOR: PAULO ALÊSCIO CANOLA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias / Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. ÁLVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Vila Velha

Araçatuba, 17 de fevereiro de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos

AUTORA: DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

COORIENTADOR: PAULO ALÉSCIO CANOLA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr.  ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias / Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. ÁLVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Vila Velha

Araçatuba, 17 de fevereiro de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Titulo: Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos

AUTORA: DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

COORIENTADOR: PAULO ALÊSCIO CANOLA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias / Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. ÁLVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Vila Velha

Araçatuba, 17 de fevereiro de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Titulo: Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos

AUTORA: DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

COORIENTADOR: PAULO ALÊSCIO CANOLA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS (Participação Virtual)

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias / Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. ÁLVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Vila Velha

Araçatuba, 17 de fevereiro de 2022.

*Aos meus avós (in memoriam), que
são parte importante da minha
história, e lembrarei para sempre.
Saudades!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos, e à Nossa Senhora, por sempre me proteger.

Aos meus pais, Santo e Jandira, que sempre me apoiaram, incentivaram e compartilharam todos os momentos dessa jornada. Vocês são os meus exemplos de vida. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão Marcelo, obrigada por acompanhar e estar presente na minha vida. Você é o primeiro unespiano e doutor da família, e eu segui seus exemplos.

À minha grande família “Scantamburlo” e “Denadai”, por acompanharem e torcerem por cada vitória.

À minha orientadora, professora Juliana Peiró, por todos os ensinamentos, oportunidades, conselhos e pela confiança depositada em mim desde a graduação. Você sempre me faz acreditar que sempre posso mais.

À professora Flávia Lucas, pela valorosa contribuição na minha vida profissional durante toda a minha trajetória na UNESP/FMVA. Agradeço todas as oportunidades, conversas, incentivos e aprendizado.

Ao professor Luiz Claudio Nogueira Mendes, por abrir o caminho científico, importantíssimo para o que sou hoje profissionalmente. Você sempre será meu orientador.

Ao professor Alexandre Andrade, minha eterna gratidão por ter cedido parte do material para conclusão do projeto. Muito obrigada pela confiança.

À professora Flávia Lopes e professor Leydson pela colaboração na execução do experimento, por cederem laboratórios e equipamentos para processamento das amostras.

Ao meu co-orientador, professor Paulo Canola, pelas contribuições no projeto.

Ao Leonardo Bentin, parceiro de experimentos e laboratório há anos, por toda a ajuda e colaboração, essencial para execução desse projeto.

Ao Marco Sousa, por ter sido minha dupla preferida na pós-graduação, e por estar presente na minha vida pessoal.

Aos queridos colegas que auxiliaram nas coletas a campo: Mariana Zacarin, Gabriel Urzedo, Cesar Terence, Patrícia Galves e Ana Paula Faria.

À Laura Cleto e o Diogo Gaubeur, que além da amizade, também auxiliaram nas coletas do projeto.

A todos os amigos que cruzaram a minha vida, dividindo experiências e concedendo boas conversas, trocas de experiências e risadas.

A todos os colegas pós-graduandos, docentes, residentes, aprimorandos, funcionários e estagiários que fizeram parte desse período de pós-graduação, e que direta ou indiretamente, contribuíram em prol desta fase.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/UNESP), minha segunda casa desde a graduação, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por oferecer a oportunidade de realizar essa pós-graduação.

À Biblioteca da FMVA, em especial a Cristina Godoy, pelo auxílio nas correções da tese.

À equipe do Haras 2E e Haras 2R pela colaboração em ceder os animais para o projeto: Edvard, Paula, Rafael, Gustavo, Rogério e Silvana.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa (Processo nº 17/22942-9).

À CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Agência UNESP de Inovação (AUIN) pelo depósito da patente oriunda dessa pesquisa (Processo: BR 10 2021 024802 5).

E a todos os animais que passaram pela minha vida e que eu pude ajudá-los, pois sem eles essa profissão não teria sentido.

“As pessoas que são loucas o suficiente para achar que podem mudar o mundo, são as que, de fato, o mudam”.

Steve Jobs

DENADAI, D. S. **Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos**. 2022. 95 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A osteoartrite é uma das maiores causas de morbidade em equinos. É caracterizada pela degeneração e proliferação óssea, lesões nas cartilagens e espessamento da membrana sinovial e da cápsula articular. O estudo de miRNAs é um campo emergente na determinação dos mecanismos que regulam enfermidades inflamatórias, podendo-se criar modelos para estudar as vias de sinalização para enfermidades articulares. Foram utilizados seis equinos atletas da raça Quarto de Milha, divididos em dois grupos: Grupo Controle (CT) - sem qualquer enfermidade ósteo-articular, e Grupo Osteoartrite (OA) - diagnosticados com osteoartrite tibiotársica primária traumática subclínica. Foram coletadas amostras de sangue venoso e de líquido sinovial para realizar a extração do RNA total por meio do kit “*Alternative Protocol for Extraction of RNA from Cells Captured on LeukoLOCK Filters Using TRI Reagent®*” (Thermo Fisher Scientific®). O microarranjo foi realizado com o kit “*Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip*” e equipamento “*GeneAtlas Affymetrix®*”. As análises estatísticas foram realizadas com o programa “*Transcriptome Analysis Console (TAC)*”. Quando comparados os grupos, foram identificados 42 miRNAs diferencialmente expressos no sangue dos equinos (36 regulados positivamente e 6 regulados negativamente). Já no líquido sinovial, foram identificados 13 miRNAs diferencialmente expressos (regulados positivamente). A intersecção desses resultados revelou miRNAs que podem ser utilizados como biomarcadores sistêmicos para osteoartrite tibiotársica. A detecção do aumento na expressão destes miRNAs (eca-miR-15a, eca-miR-15b, eca-miR-17, eca-miR-18a, eca-miR-19b, eca-miR-20a, eca-miR-106a, eca-miR-106b, eca-miR-191, eca-miR-361-5p, eca-miR-450b-5p, eca-miR-451 e eca-miR-486-5p) no sangue venoso de equinos Quarto de Milha, indica que estes podem ser utilizados como biomarcadores para detecção precoce de osteoartrite tibiotársica primária traumática subclínica em equinos de maneira menos invasiva e sistêmica.

Palavras-chave: Articulação. Artropatias. Osteoartrite. Cavalos. microRNA.

DENADAI, D. S. **Evaluation of the expression of circulating miRNAs and in the tibiotarsal articulation in horses.** 2022. 95 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is one of the major causes of morbidity in horses. It is characterized by articulation degeneration and bone proliferation, structures of the synovial membrane and joint capsule. The study of miRNA is an emerging field in determining the mechanisms that regulate inflammatory diseases, and can be present in models that might predict its effect on OA signaling pathways. Six athletic Quarter Horses were used, divided into two groups: Control Group (CT) - without any disease, and Osteoarthritis Group (OA) - diagnosed with subclinical traumatic primary tibiotarsal osteoarthritis. Venous blood and synovial fluid samples were collected to perform total RNA extraction using the “*Alternative Protocol for Extraction of RNA from Cells Captured on LeukoLOCK Filters Using TRI Reagent®*” kit (Thermo Fisher Scientific®). The microarray was performed with the kit “*Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip*” kit and “GeneAtlas Affymetrix®” equipment. Statistical analyzes were performed using the “Transcriptome Analysis Console (TAC)” program. When comparing groups, 42 miRNAs were identified differentially expressed in the venous blood of horses (36 up-regulated and 6 down-regulated). In the synovial fluid, 13 differentially expressed (upregulated) miRNAs were identified. The intersection of these results revealed miRNAs that can be used as systemic biomarkers for tibiotarsal OA. The simultaneous detection of increased expression of these miRNAs (eca-miR-15a, eca-miR-15b, eca-miR-17, eca-miR-18a, eca-miR-19b, eca-miR-20a, eca-miR-106a, eca-miR-106b, eca-miR-191, eca-miR-361-5p, eca-miR-450b-5p, eca-miR-451 e eca-miR-486-5p) in venous blood of Quarter Horses, indicates that these molecules can be used as biomarkers for early detection of subclinical traumatic primary tibiotarsal osteoarthritis in horses in a less invasive and systemic way.

Keywords: Articulation. Arthropathies. Osteoarthritis. Horse. microRNA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagens termográficas das projeções dorsal, plantar e lateral das regiões distais dos membros pélvicos (bilateralmente) dos equinos do Grupo Controle (A1, A2 e A3)321
- Figura 2 - Imagens termográficas das projeções dorsal, plantar e lateral das regiões distais dos membros pélvicos (bilateralmente) dos equinos do Grupo Osteoartrite (A4, A5 e A6)32
- Figura 3 - Imagens radiográficas das projeções latero-medial (LM) e dorso-plantar (DOPL) das articulações tibiotársicas (bilateralmente) dos equinos do Grupo Controle (A1, A2 e A3)334
- Figura 4 - Imagens radiográficas das projeções latero-medial (LM) e dorso-plantar (DOPL) das articulações tibiotársicas (bilateralmente) dos equinos do Grupo Osteoartrite (A4, A5 e A6). As setas amarelas apontam as principais áreas de lesões na estrutura ósteo-articular35
- Figura 5 - Imagens ultrassonográficas das articulações tibiotársicas dos equinos do Grupo Controle (Técnica: 5 MHz linear e 3,5 cm de profundidade)37
- Figura 6 - Imagens ultrassonográficas das articulações tibiotársicas dos equinos do Grupo Osteoartrite (A4, A5 e A6). As setas amarelas apontam as áreas de lesões na cartilagem articular com exposição de osso subcondral (Técnica: 5 MHz linear e 3,5 cm de profundidade)38
- Figura 7 - A. Tubo contendo EDTA após a centrifugação, destacando-se o anel leucocitário na seta vermelha. B. Coleta do anel leucocitado utilizando micropipeta e ponteira. C. Anel leucocitário alíquotado com 1000 µL de RNA later41

| | |
|---|-----|
| Figura 8 – Imagem fotográfica ilustrando a coleta do líquido sinovial. A. Região lateral da articulação tibiotársica de um equino após a realização da tricotomia. B. Agulha descartável hipodérmica 30 x 0,8 mm inserida na bursa superior da cápsula articular através do acesso latero-plantar entre o calcâneo e o maléolo lateral da tibia. C. Aspiração do líquido sinovial utilizando seringa estéril de 5 mL | 42 |
| Figura 9 - Coloração do líquido sinovial alocado em tubo de coleta com EDTA K3, dos 6 equinos utilizados no experimento, sendo amarelo-pálido no Grupo Controle (A- A1, B- A2 e C- A3), e amarelo-escuro no Grupo Osteoartrite (D- A4, E- A5, e F- A6) | 43 |
| Figura 10 - Extração do RNA total. A. Tubo Falcon contendo a amostra de sangue venoso e adição de reagente TRI e BCP. B. Cartucho dentro do tubo de eluição | 45 |
| Figura 11 - A. Kit “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip”. B. GeneChip™ | 457 |
| Figura 12 - Equipamento “GeneAtlas Affymetrix®” | 48 |
| Figura 13 - Gráfico de expressão (<i>fold change</i> x valor de P) do microarranjo das amostras de sangue venoso dos equinos dos Grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA). Os pontos coloridos representam os miRNAs (\log_2) considerados regulados positivamente (cor vermelha) ou regulados negativamente (cor verde), e os miRNAs não considerados diferencialmente expressos são os pontos na cor cinza ($P < 0,05$, <i>fold change</i> $\pm 2,0$) | 50 |
| Figura 14 - Mapa de calor comparando os miRNAs diferencialmente expressos (\log_2), do microarranjo das amostras de sangue venoso dos equinos, de acordo com os Grupos Controle e Osteoartrite. A intensidade da cor indica níveis de expressão: regulado positivamente (cor vermelha) ou regulado negativamente (cor verde) | 51 |

- Figura 15 - Gráfico de expressão (*fold change* x valor de P) do microarranjo das amostras de líquido sinovial dos equinos dos Grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA). Os pontos coloridos representam os miRNAs (\log_2) considerados regulados positivamente (cor vermelha) ou regulados negativamente (cor verde), e os miRNAs não considerados diferencialmente expressos são os pontos na cor cinza ($P < 0,05$, *fold change* $\pm 2,0$)54
- Figura 16 - Mapa de calor comparando os miRNAs diferencialmente expressos (\log_2), do microarranjo das amostras de líquido sinovial dos equinos, de acordo com os Grupos Controle e Osteoartrite. A intensidade da cor indica níveis de expressão: regulados positivamente (cor vermelha) ou regulados negativamente (cor verde)55
- Figura 17 - Diagrama de Venn dos miRNAs regulados positivamente nas amostras de líquido sinovial (LS) e sangue venoso (SV), cuja intersecção revela 12 miRNAs em comum, que podem ser utilizados como biomarcadores sistêmicos para osteoartrite tibiotársica em equinos57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Lista dos animais utilizados no experimento, de acordo com os grupos, sexo, idade e articulação utilizada para artrocentese28
- Tabela 2 - Temperatura máxima das regiões dorsal, plantar e lateral das articulações tibiotársicas dos equinos, de acordo com o grupo (CT – Controle e AO – Osteoartrite), lado (E – esquerdo e D – direito), e temperatura (°C) e umidade (%) ambiente no momento da coleta30
- Tabela 3 - Parâmetros hematológicos do sangue venoso de cada equino, de acordo com os Grupos Controle (A1, A2 e A3) e Osteoartrite (A4, A5 e A6)40
- Tabela 4 - Passos da extração de RNAtotal utilizando uma adaptação do kit “Alternative Protocol for Extraction of RNA from Cells Captured on LeukoLOCK Filters Using TRI Reagent® (Thermo Fisher Scientific®)”44
- Tabela 5 - Valores das concentrações de RNAtotal (ng/μL) obtido após a realização do protocolo de extração e posteriormente evaporação para concentração das amostras de sangue venoso, de cada amostra, de acordo com os grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA).....46
- Tabela 6 - Valores das concentrações de RNAtotal (ng/μL) obtido após a realização do protocolo de extração e posteriormente evaporação para concentração das amostras de líquido sinovial, de cada amostra, de acordo com os grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA).....46
- Tabela 7 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulados positivamente no sangue de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (log₂), fold change e valor de P. A lista dos miRNAs está organizada por valor decrescente do fold change52

Tabela 8 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulados negativamente) no sangue de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), fold change e valor de P de cada. A lista dos miRNAs está organizada por valor crescente do fold change53

Tabela 9 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulados positivamente) no líquido sinovial de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), fold change e valor de P de cada. A lista dos miRNAs está organizada por valor decrescente do fold change.....56

Tabela 10 - Valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), fold change e valor de P dos miRNAs regulados positivamente nas amostras de sangue venoso e de líquido sinovial de equinos com (Grupo Osteoartrite - OA) e sem osteoartrite tibiotársica (Grupo Controle - CT). A lista dos miRNAs está organizada por ordem alfabética58

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|--|
| ACAN | Agrecano |
| ADAMDEC1 | Decisina-1 semelhante ao domínio de metaloproteinase |
| ADAMTS | Desintegrina e metaloproteinase de trombospondina |
| ANOVA | Análise de variância |
| ATG10 | Autophagy Related 10 |
| BCP | <i>Bromo-3-chloro-propane</i> |
| BMSCs | Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea |
| C1 | Fragmentos de degradação de colágeno tipo I |
| C2 | Fragmentos de degradação de colágeno tipo II |
| CHON-001 | Linhagem celular de condrócitos humanos |
| Col I | Colágeno tipo I |
| COMP | Proteína de matriz oligomérica de cartilagem |
| COL2A1 | Colágeno tipo II alfa 1 |
| COL11A2 | Colágeno 11 alfa II |
| CPII | Carboxipropeptídeo de colágeno tipo II |
| CT | Controle |
| CS846 | Sulfato de condroitina agrecano |
| DABG | Detected Above Background |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DOPL | Dorso-plantar |
| EZH2 | <i>Enhancer of zeste homolog 2</i> |
| FMVA | Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba |
| FOA | Faculdade de Odontologia de Araçatuba |
| FOXO1 | Forkhead Box O1 |
| GYS1 | Glicogênio sintase 1 |
| HOXA1 | Homeobox A1 |
| hUNC-93a | Homólogo A de Unc-93 |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina 1 |
| IGFR1 | Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 |
| IκBβ | Inibidor de NF-kappa-B beta |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |

| | |
|------------------------|---|
| InsR | Receptor de insulina |
| OA | Osteoartrite |
| MEG3 | Maternally Expressed 3 |
| miRNA | microRNA |
| mL | microlitro |
| LDHA | Lactato desidrogenase |
| LS | Líquido sinovial |
| LM | Latero-medial |
| lncRNA | RNA longo não codificadores de proteína |
| Log₂ | Logaritmo da base 2 |
| MEC | Matriz extracelular |
| MHz | Megahertz |
| MMP | Metaloproteinase da matriz |
| NLRP-3 | Domínio pirina 3 da família NLR |
| PDP1 | Subunidade Catalítica de Piruvato Desidrogenase Fosfatase 1 |
| RT-PCR | Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RRM2 | Polipeptídeo de ribonucleotídeo redutase M2 |
| SV | Sangue venoso |
| SIRT6 | <i>Sirtuin 6</i> |
| sncRNAs | Pequenos RNAs não codificadores de proteína |
| SPHK1 | Esfingosina quinase 1 |
| Sox6 | Fator de transcrição 6 |
| SW1353 | Linha celular de osteocondroma humano |
| TAC | <i>Transcriptome Analysis Console</i> |
| TGF_β | Fator de crescimento transformador β |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TRI | Trizol |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| ZEB1 | <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i> |
| μL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 Osteoartrite..... | 19 |
| 2.2 Biomarcadores | 21 |
| 2.3 MicroRNA..... | 22 |
| 2.4 Microarranjo | 24 |
| 3 HIPÓTESE | 26 |
| 4 OBJETIVOS..... | 27 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 5.1 Seleção dos animais | 28 |
| 5.1.1 Exame termográfico | 29 |
| 5.1.2 Exame radiográfico | 33 |
| 5.1.3 Exame ultrassonográfico | 36 |
| 5.2 Coleta do material biológico | 39 |
| 5.2.1 Sangue venoso | 39 |
| 5.2.2 Líquido sinovial..... | 41 |
| 5.3 Extração do RNA..... | 43 |
| 5.4 Microarranjo..... | 46 |
| 5.5 Análise estatística | 48 |
| 6 RESULTADOS..... | 49 |
| 6.1 Sangue venoso | 49 |
| 6.2 Líquido sinovial..... | 54 |
| 6.3 Biomarcadores sistêmicos..... | 56 |
| 6.4 Depósito de patente - painel de biomarcadores | 59 |
| 7 DISCUSSÃO | 61 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 73 |
| REFERÊNCIAS..... | 74 |
| APÊNDICE A - Lista dos 354 miRNAs presentes no “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip”, já anotados para a espécie equina (<i>Equus caballus</i>)..... | 89 |

| | |
|---|----|
| APÊNDICE B – Sequência madura de nucleotídeos de cada miRNA regulado positivamente nas amostras de sangue venoso e de líquido sinovial, que podem ser utilizados como biomarcadores sistêmicos para osteoartrite tibiotársica | 93 |
| ANEXO A – Comitê de ética | 94 |
| ANEXO B – Depósito da patente..... | 95 |

1 INTRODUÇÃO

A claudicação na espécie equina é um assunto de grande importância, tanto do ponto de vista médico como financeiro, posto que as enfermidades osteomusculares em equinos atletas são as principais causas de diminuição de desempenho e interrupção precoce da carreira atleta, resultando em perdas significativas na criação desta espécie. Artropatias são frequentes em articulações móveis devido ao movimento intenso, e provocam disfunções mecânicas que geram claudicações (ALVES, 2014).

A região do tarso é comumente acometida por enfermidades locomotoras nos membros pélvicos, que envolvem distúrbios de tendões e ligamentos, luxações, osteoartrite (OA) e fraturas, decorrentes principalmente de traumas nas estruturas ósseas da região plantar, decorrentes da escassez de tecidos moles protegendo o local, e pela grande amplitude de movimentos de flexão e extensão que realiza (AUER, 2012; ALVES, 2014).

O tarso é composto por cinco articulações: tibiotársica, intertarsal proximal, intertarsal distal, tarsometatarsal e talocalcaneal, de modo que quatro dessas são quase imóveis, realizando micro movimentos que ocorrem durante a movimentação e o levantamento de peso, gerando, portanto, maior estresse mecânico na articulação tibiotársica, sendo a sede das principais enfermidades em equinos (AUER, 2012).

Analisando dados clínicos de equinos, constatou-se que o tarso foi a principal articulação que exibiu alterações radiográficas compatíveis com OA, sendo que 31% dos animais eram assintomáticos sem evidência de claudicação (BACCARIN et al., 2012). Este dado evidencia que há baixa correlação entre claudicação e a aparência radiográfica da articulação do tarso, ou seja, os pacientes com alterações radiográficas não necessariamente apresentam os sinais clínicos característicos da doença articular (BACCARIN et al., 2012).

O caráter insidioso de osteopatias na articulação do tarso, muitas vezes juvenil em equinos, revela uma demanda de estudo de diagnóstico precoce e, assim como descrito em humanos, há uma necessidade urgente de compreender os mecanismos moleculares que mantêm a homeostase da cartilagem articular equina, para se divulgar biomarcadores diagnósticos e prognósticos, bem como alvos para terapias efetivas em artropatias, que são causas importantes de dor, deficiência e perda

econômica em equinos e seres humanos (McILWRAITH et al., 2012; D'ADAMO et al., 2017).

Além da importância econômica dos cavalos em nosso país e na modalidade esportiva, os equinos também são utilizados como modelo experimental para afecções do sistema locomotor em humanos (ALINI et al., 2008; McILWRAITH et al., 2012; CADBY et al., 2013; PEFERS et al., 2013; TEW et al., 2014). Os equinos fornecem mecanismos úteis para estudos, já que há ampla ocorrência destas afecções na clínica de cavalos, e utiliza-se esta espécie como o principal modelo experimental para estudar a patogênese das afecções articulares (McILWRAITH et al., 2012).

A osteoartrite (OA) é uma importante causa de dor, incapacidade e perda econômica em humanos, e é igualmente importante no cavalo (McILWRAITH et al., 2012). A maior parte do tecido humano disponível para estudo é obtido no momento da substituição articular, quando as lesões da OA estão em estágio final e pouco pode ser concluído sobre a fisiopatogenia da doença. Para superar essa limitação, vários modelos animais induzidos e espontâneos foram utilizados para estudar o início e a progressão da doença, bem como para testar novas intervenções terapêuticas (McCOY, 2015).

O assunto osteoartrite em humanos e equinos é tema de vários artigos publicados. A busca online para o termo "*osteoarthritis*" (osteoartrite) resultou na existência de 101.864 resultados. Para o termo "*osteoarthritis human*" (osteoartrite humana) foram 5.983 resultados, e para o termo "*osteoarthritis equine*" (osteoartrite equina) foram 925 resultados (PUBMED, 2022).

Todavia, apesar de existirem 158.990 resultados para o termo "*microarray*" (microarranjo), 134.631 resultados para "miRNA", e 96.018 resultados para "*miRNA human*" (miRNA humano), ainda há poucos artigos neste assunto em equinos, sendo apenas 142 resultados para os termo "*miRNA equine*" (miRNA equino) (PUBMED, 2022).

O melhor entendimento das alterações articulares em equinos, assim como suas possíveis consequências e alterações no organismo, fornecerá novas informações e perspectivas sobre os complexos mecanismos moleculares presentes na resposta de reparo, auxiliando na detecção precoce e no prognóstico, com possibilidade de aplicação também na medicina humana ao se utilizar equinos como modelo experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Osteoartrite

A função das articulações sinoviais depende da integridade da anatomia normal e da função celular adequada de todos os componentes articulares: ossos, cartilagem articular, líquido sinovial (LS), membrana sinovial, cápsula articular fibrosa e estruturas ligamentares. Situações patológicas articulares geralmente ocorrem devido à disfunção de um ou mais componentes (FRISBIE, 2012).

A osteoartrite (OA) é caracterizada por degeneração e perda da cartilagem articular (FRISBIE, 2012). Esses grupos de distúrbios possuem um estágio final comum: deterioração progressiva da cartilagem articular, acompanhada por alterações ósseas e nos tecidos moles articulares, cuja degeneração é manifestada pela fragmentação da cartilagem articular (McILWRAITH, 2002).

A OA primária equina ocorre, na maioria dos casos, devido a traumas repetitivos crônicos, sendo que os fatores de risco podem ser relacionados à raça, idade, sexo ou conformação; cuja predisposição sistêmica pode estar relacionada às propriedades dos tecidos envolvidos, por exemplo, cartilagem e osso; enquanto a expressão, o local e a gravidade podem ser determinados pelo uso, ou seja, fatores biomecânicos locais (LABENS et al., 2012).

A mecânica articular é única e complexa, em grande parte devido à cartilagem articular, sua resposta ao carregamento e dependência de três aspectos: cinemática, cinética e lubrificação articular. A cinemática envolve o estudo do movimento das superfícies articuladas em relação umas às outras; a cinética relaciona-se com as forças que são criadas durante o movimento articular e as cargas que são criadas ao longo da superfície articular; e a lubrificação articular proporciona um movimento quase sem atrito dos tecidos moles adjacentes e da cartilagem articular (FRISBIE, 2012).

A destruição da cartilagem articular é o componente patológico essencial em uma série de eventos, alguns degenerativos e outros regenerativos, que afetam, em última instância, todos os tecidos e estruturas da articulação (McILWRAITH, 2002). Na maioria dos casos de doença articular equina há envolvimento de múltiplos tecidos articulares em algum grau de alteração ou lesão (FRISBIE, 2012).

A patogênese da OA pode estar relacionada a propriedades biomecânicas alteradas, em condições normais de carga; a mudanças anormais no osso subcondral, em resposta ao exercício ou a mudanças em carga; ou a forças anormais que sobrecarregam os mecanismos normais de reparo metabólico na cartilagem articular (FRISBIE, 2012).

O exercício tem uma grande influência no equilíbrio homeostático articular, e desempenha um papel crucial no processo de amadurecimento da articulação. Todavia, há uma linha tênue entre os efeitos benéficos e prejudiciais do exercício na homeostase articular. A sobrecarga física perturba a integridade das estruturas articulares, resultando em respostas inflamatórias, e têm efeitos negativos sobre os condrócitos (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017). Níveis adequados de atividade física durante o desenvolvimento inicial de um programa de treinamento não aumentam a prevalência de lesão osteoartrítica no tarso, conforme verificado em potros Mangalarga Marchador, de 30 a 36 meses de idade (DI FILIPPO et al., 2019).

A OA apresenta-se como degeneração e proliferação óssea, lesões nas cartilagens, e espessamento da membrana sinovial e da cápsula articular. Radiograficamente é caracterizada por redução do espaço articular e presença de neoformações óssea em graus variados. Em situações de maior gravidade, a OA pode evoluir para anquilose, devido a intensa proliferação, que ocasiona a fusão completa das superfícies ósseas, obliterando o espaço articular e impedindo a livre movimentação da articulação (THOMASSIAN, 2005).

A OA continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade na população equina. A incapacidade de detectar alterações pré-clínicas na OA tem sido um impedimento significativo para o desenvolvimento de terapias eficazes contra esta doença (CASTANHEIRA et al., 2021).

Compreender a patogênese da OA precoce, e caracterizar essas mudanças moleculares dinâmicas, pode fornecer novas percepções sobre o processo e o mecanismo do desenvolvimento inicial da OA, sendo fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (CASTANHEIRA et al., 2021), principalmente àquelas relativas as terapias genéticas.

2.2 Biomarcadores

Os biomarcadores são ferramentas diagnósticas essenciais na pesquisa da OA, ensaios clínicos e desenvolvimento de medicamentos. Detectar e avaliar biomarcadores na pesquisa de OA pode abrir novos caminhos para pesquisar e desenvolver novos tratamentos (HUANG et al., 2021). Além de serem utilizados como uma ferramenta diagnóstica adicional para OA também podem auxiliar na identificação do estágio evolutivo e acompanhar a progressão da OA (COPPELMAN et al., 2020).

Novos métodos para obtenção de amostras de tecido sinovial estão se tornando mais amplamente disponíveis, e conseqüentemente geram resultados que avançam no desenvolvimento de alvos terapêuticos e identificação de biomarcadores de resposta a terapias (ORR et al., 2017).

Verificou-se que o aumento do neoepítipo de proteína de matriz oligomérica de cartilagem (COMP) no LS da articulação metacarpofalângica de cavalos com claudicação aguda sugere que este tem potencial para ser um biomarcador para as alterações moleculares precoces na cartilagem articular associadas à OA (SKIÖLDEBRAND, et al., 2017).

No tarso equino, um estudo sobre biomarcadores de OA no LS demonstrou que o carboxipeptídeo de colágeno tipo II (CPII) e o carboxi-neoepítipo de colágeno tipo II exposto após clivagem de collagenase (C2C), têm o potencial de fornecer informações relevantes para o grau da OA observadas através de alterações radiográficas presentes nas articulações distais do tarso (COPPELMAN et al., 2020).

É importante destacar a importância de encontrar biomarcadores séricos no cavalo, visto que este conhecimento pode ser de grande valia na triagem de casos clínicos para OA quando os cavalos estão em treinamento ativo, visto que a coleta rotineira de LS é laboriosa em atletas de elite, diferentemente da coleta de sangue para obtenção do soro (FRISBIE et al., 2008).

Nas articulações do carpo, seis biomarcadores séricos e no LS foram úteis na diferenciação da OA experimental precoce daquela em decorrência ao exercício isolado em cavalos com dois anos de idade, sendo: sulfato de condroitina agregado (CS846), epítipo carboxipeptídeo de colágeno tipo II (CPII), glicosaminoglicanos,

osteocalcina, fragmentos de degradação de colágeno tipo I e II (C1, C2) e colágeno tipo I (Col I) (FRISBIE et al., 2008).

Utilizando amostras de SV e LS coletadas no pós-operatório de equinos submetidos à cirurgia artroscópica para indução experimental da OA, por meio da criação de um fragmento ósseo na face distal na articulação rádio-cárpica de um membro, constatou-se pelo método de PCR que a expressão gênica de ADAMDEC1 (proteína decisina-1 semelhante ao domínio de metaloproteinase), hUNC-93a (homólogo A de Unc-93) e RRM2 (polipeptídeo de ribonucleotídeo redutase M2) em leucócitos periféricos tem potencial para uso no auxílio diagnóstico para OA em cavalos (KAMM et al., 2013).

Outros tipos de RNAs, como os pequenos RNAs não codificadores de proteína (sncRNAs), presentes no LS também podem ser usados como biomarcadores moleculares para doenças precoces em articulações osteoartíticas de equinos (CASTANHEIRA et al., 2021).

2.3 MicroRNA

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes e endógenos (codificados dentro do genoma), de fita simples, de 17-27 nucleotídeos de comprimento, que desempenham um papel fundamental em diversos processos celulares através da regulação pós-transcricional da expressão gênica. Sua atuação ocorre através da regulação da expressão de RNAs mensageiros complementares, visando mRNAs para clivagem ou repressão de tradução (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; HOLLIS; STARKEY, 2018).

Os miRNAs compreendem uma das classes mais abundantes de moléculas reguladoras de genes em organismos multicelulares, influenciando a produção de muitos genes que codificam proteínas, sendo bem correlacionados com proliferação ou morte celular (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; HOLLIS; STARKEY, 2018).

Os miRNAs conferem robustez às redes gênicas e proporcionam redução na variabilidade das características, que é um mecanismo importante na evolução da crescente complexidade morfológica (BEREZIKOV, 2011).

A análise genética dos genes do miRNA nos organismos modelos exhibe uma gama de funções no desenvolvimento animal e de sua fisiologia (AMBROS, 2004).

Todavia, a desregulação de miRNAs específicos está associada ao desenvolvimento e progressão de doenças (HOLLIS; STARKEY, 2018).

Centenas de genes de miRNAs já foram encontrados em diversos animais e muitos destes são conservados filogeneticamente (AMBROS, 2004). Análises computacionais identificaram 694 sequências de miRNAs em animais domésticos, que apresentaram 100% de identidade de sequência com os miRNAs de 287 doenças humanas, e destas, mais de 60% do total de miRNAs de cavalos (216) apresentam correspondências perfeitas com miRNAs associados a doenças humanas. Tais dados demonstram que alguns miRNAs associados a doenças humanas estão bem conservados em equinos, indicando uma probabilidade de se ter doenças semelhantes entre as duas espécies (BUZA et al., 2014).

Todavia, os miRNAs ainda não foram bem estudados em animais domésticos, obtendo-se pouca informação disponível principalmente sobre os miRNAs em equinos (VAN DER KOLK et al., 2015). Até o momento há 690 miRNAs anotados para a espécie equina (MIRBASE, 2022).

Embora o RNA seja geralmente considerado uma molécula instável, os miRNAs, em contrapartida, demonstram formas estáveis que circulam na corrente sanguínea e em outros fluidos corporais, podendo assim estar presentes no plasma, soro ou em outros fluidos corporais durante a patogênese de muitas doenças e, portanto, confirma seu potencial como biomarcador de doenças (VAN DER KOLK et al., 2015).

A detecção de miRNA em fluidos corporais é uma área em crescimento no mundo dos biomarcadores, de modo que a sua detecção pode ser um grande indicativo para prever a resposta para qualquer tipo de condição ou doença (CORTEZ et al., 2011).

A regulação e expressão de miRNA é um campo emergente na determinação dos mecanismos que regulam uma variedade de enfermidades inflamatórias (SONDAG; HAQQI, 2016). A partir da identificação de miRNAs em artropatias de equinos, pode-se criar modelos para estudar as vias de sinalização comuns a enfermidades articulares em humanos, que a longo prazo, podem acelerar o desenvolvimento de medidas terapêuticas para estas em ambas as espécies (VAN DER KOLK et al., 2015).

A maioria dos estudos sobre miRNA articular em equinos foi realizada utilizando amostras biológicas obtidas imediatamente após a eutanásia (BUECHLI et al., 2013; DESJARDIN et al., 2014) ou em frigoríficos (PEFFERS et al., 2013; TEW et al., 2014).

A natureza menos invasiva da amostragem de miRNA na corrente sanguínea, em comparação com a coleta de amostras de biópsia, por exemplo, bem como sua sensibilidade e especificidade como marcadores circulantes de certas doenças estimulam o interesse por pesquisas realizadas com material sistêmico, para detecção precoce, prognóstico e para a concepção de terapias personalizadas para doenças (VAN DER KOLK et al., 2015).

As concentrações de miRNAs no plasma e LS de pacientes humanos demonstrou indícios de que há correlação entre os miRNAs de ambos os compartimentos (MURATA et al., 2010). Evidências recentes demonstram que miRNAs circulantes 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, e de sua patogênese (MURATA et al., 2010; NUGENT, 2016).

2.4 Microarranjo

O estudo do miRNA é um campo emergente nas ciências da vida, cuja detecção da expressão de miRNA é um primeiro passo na exploração dos miRNAs. Até o momento, várias metodologias foram desenvolvidas para detectar e analisar a expressão de miRNA, como *Northern blotting*, RT-PCR, clonagem e microarranjo. Cada técnica tem suas vantagens e algumas limitações na sua aplicação (LI; RUAN, 2009).

Embora milhares de miRNAs tenham sido identificados, poucos foram funcionalmente ligados a vias biológicas específicas. A análise de expressão baseada em microarranjo é uma estratégia ideal para identificar miRNAs candidatos que se correlacionam com vias biológicas e para gerar assinaturas moleculares de estados de doença (THOMSON et al., 2007).

O microarranjo oferece uma nova dimensão no diagnóstico molecular, permitindo a análise simultânea de grandes conjuntos de genes. A automação do

ensaio e as novas ferramentas de bioinformática tornam o microarranjo uma tecnologia robusta para o diagnóstico molecular (LIU-STRATTON et al., 2004).

Os microarranjos, em alusão ao componente eletrônico que carrega milhões de transistores, são lâminas sólidas, nas quais fragmentos de DNA fita simples, denominados de sondas, são depositados e imobilizados de forma ordenada e em áreas específicas, chamadas de *spots*. Na lâmina, cada *spot* contém milhões de cópias de um único e determinado transcrito que pode posteriormente ser identificado (GIACHETTO, 2010).

O princípio da técnica de microarranjo baseia-se na hibridização por complementaridade das moléculas de ácido nucleico, que ocorre entre a sonda depositada na lâmina e o seu RNAm correspondente, transformado em cDNA, extraído das amostras a serem analisadas e comparadas. Em resumo, são três as etapas envolvidas em um experimento com microarranjo: (a) preparo das amostras, (b) hibridização e (c) detecção, e posteriormente visualização e interpretação dos dados (GIACHETTO, 2010).

O perfil de miRNAs baseado em microarranjo é uma metodologia eficiente para rastrear de forma paralela a expressão de um grande número de miRNAs (MISKA et al., 2004). Os microarranjos de miRNA são melhor utilizados para comparar a abundância relativa de miRNAs específicos entre dois estados (por exemplo, tratamento *versus* controle ou doença *versus* saudável) (PRITCHARD et al., 2012).

Destaca-se no microarranjo a possibilidade de obter milhares de conjuntos de genes a partir de uma pequena amostra, com estimativa de erro dos dados zero (DOUGHERTY, 2001), muitas vezes sendo o número de amostras entre dois e cinco (GIT et al., 2010; DAS et al., 2013; HEIDARI et al., 2016).

Outra vantagem que os microarranjos de miRNA têm é que geralmente são menos caros do que os outros métodos de detecção, e ainda permitem um número maior de medições paralelas. Porém, a principal desvantagem do microarranjo é que esta técnica possui uma especificidade mais baixa que o sequenciamento de RNA (alta precisão e sensibilidade), e não pode ser utilizado para determinar a quantificação absoluta (PRITCHARD et al., 2012).

3 HIPÓTESE

Com base no exposto e considerando que o tema merece novas investigações, levantou-se a hipótese, formulando-se a seguinte pergunta: Existem miRNAs expressos na corrente circulatória, presentes concomitantemente na articulação, que podem ser utilizados como biomarcadores precoces para a osteoartrite tibiotársica em equinos?

4 OBJETIVOS

1 Investigar as alterações fisiológicas e patológicas articulares em equinos, utilizando a tecnologia de microarranjo, a fim de identificar o perfil de expressão de miRNAs na corrente circulatória e na articulação tibiotársica de equinos da raça Quarto de Milha, sadios e com osteoartrite traumática não experimental.

2 Verificar se miRNAs circulantes podem atuar como possíveis biomarcadores para diagnóstico sistêmico e precoce de distúrbios articulares, antes do aparecimento de sinais clínicos de dor e claudicação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada em 29/04/2021 – Processo FOA nº 0251-2020 (ANEXO A).

5.1 Seleção dos animais

Foram utilizados seis equinos atletas da raça Quarto de Milha, em rotina de treinamento e provas para a modalidade de Três Tambores. Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (CT) - composto por três animais sem qualquer enfermidade ósteo-articular, e Grupo Osteoartrite (OA) - composto por três animais diagnosticados com osteoartrite tibiotársica primária traumática subclínica. Foram selecionados animais de ambos os sexos e igual números ($n = 3$), cujos dados de acordo com o grupo, sexo, idade e articulação tibiotársica utilizada para artrocentese estão descritos no Tabela 1.

Tabela 1 - Lista dos animais utilizados no experimento, de acordo com os grupos, sexo, idade e articulação utilizada para artrocentese

| GRUPO | ANIMAL | SEXO | IDADE | ARTICULAÇÃO COLETADA |
|------------------------------|-----------------------|-------|-----------------|----------------------|
| Controle (CT) | A1 | Fêmea | 6 anos | Esquerda |
| | A2 | Fêmea | 8 anos | Esquerda |
| | A3 | Macho | 12 anos | Direita |
| | Média de idade | | 8,7 anos | |
| Osteoartrite (OA) | A4 | Macho | 13 anos | Esquerda |
| | A5 | Fêmea | 5 anos | Direita |
| | A6 | Macho | 8 anos | Direita |
| | Média de idade | | 8,7 anos | |

Fonte: Elaboração da própria autora.

Todos os animais selecionados não apresentavam qualquer evidência clínica de claudicação em nenhum membro, e havia ausência de traumas, tratamentos ou qualquer outra anormalidade física aparente recente. Para seleção dos animais do Grupo Controle

(CT), estes não poderiam apresentar sinais clínicos de qualquer enfermidade. Para o Grupo OA, foram selecionados equinos com osteoartrite tibiotársica primária traumática subclínica, sem evidência de claudicação.

Os equinos foram submetidos a exame clínico completo, consistindo em anamnese, exame físico geral e específico do sistema locomotor (inspeção em repouso, ao passo, trote e círculo; palpação; manipulação dos membros e teste de flexão) sem anormalidades.

Os exames complementares bilaterais das articulações tibiotársicas consistiram na realização de exame termográfico, radiográfico e ultrassonográfico, para avaliar a integridade articular e óssea, ou presença da OA primária subclínica.

5.1.1 Exame termográfico

Foram realizadas imagens termográficas correspondentes às regiões dorsal, plantar e lateral dos membros pélvicos após o equino permanecer 30 minutos em repouso, em ambiente com cobertura e sem corrente de ar. As imagens foram obtidas através da utilização de câmera térmica infravermelha Flir® do smartphone Caterpillar S60, com resolução de imagem de 480x640 pixels, emissividade ajustada a 0,95, acurácia de $\pm 2\%$ e sensibilidade de $0,1^\circ\text{C}$, em tempo real, à distância de 1 metro.

Para minimizar efeitos adversos durante a coleta dos dados, evitando que variações na temperatura ambiente interferissem nos resultados, todas as imagens termográficas foram realizadas no mesmo horário (período da manhã) e mesma estação do ano (verão), cujas variações de temperatura ambiente e umidade do ar foram mensuradas através de termo-higrômetro modelo Klimalogg Pro® 3030.39.0.00.

A análise das imagens termográficas foi realizada com o programa “*FLIR® Tools*” (versão 6.4.18039.1005, 2015 – FLIR Systems®), no qual também foram feitas as correções da temperatura superficial de acordo com a temperatura ambiente e umidade do ar.

Como pré-requisito para seleção dos equinos para o experimento, nenhuma anormalidade de temperatura foi identificada, associada à simetria em relação ao membro contra-lateral, afim de descartar qualquer alteração de temperatura superficial que pudesse estar relacionada a um processo inflamatório.

As temperaturas máximas mensuradas nas regiões dorsal, plantar e lateral das articulações tibiotársicas dos equinos, e a temperatura e umidade ambiente estão na Tabela 2.

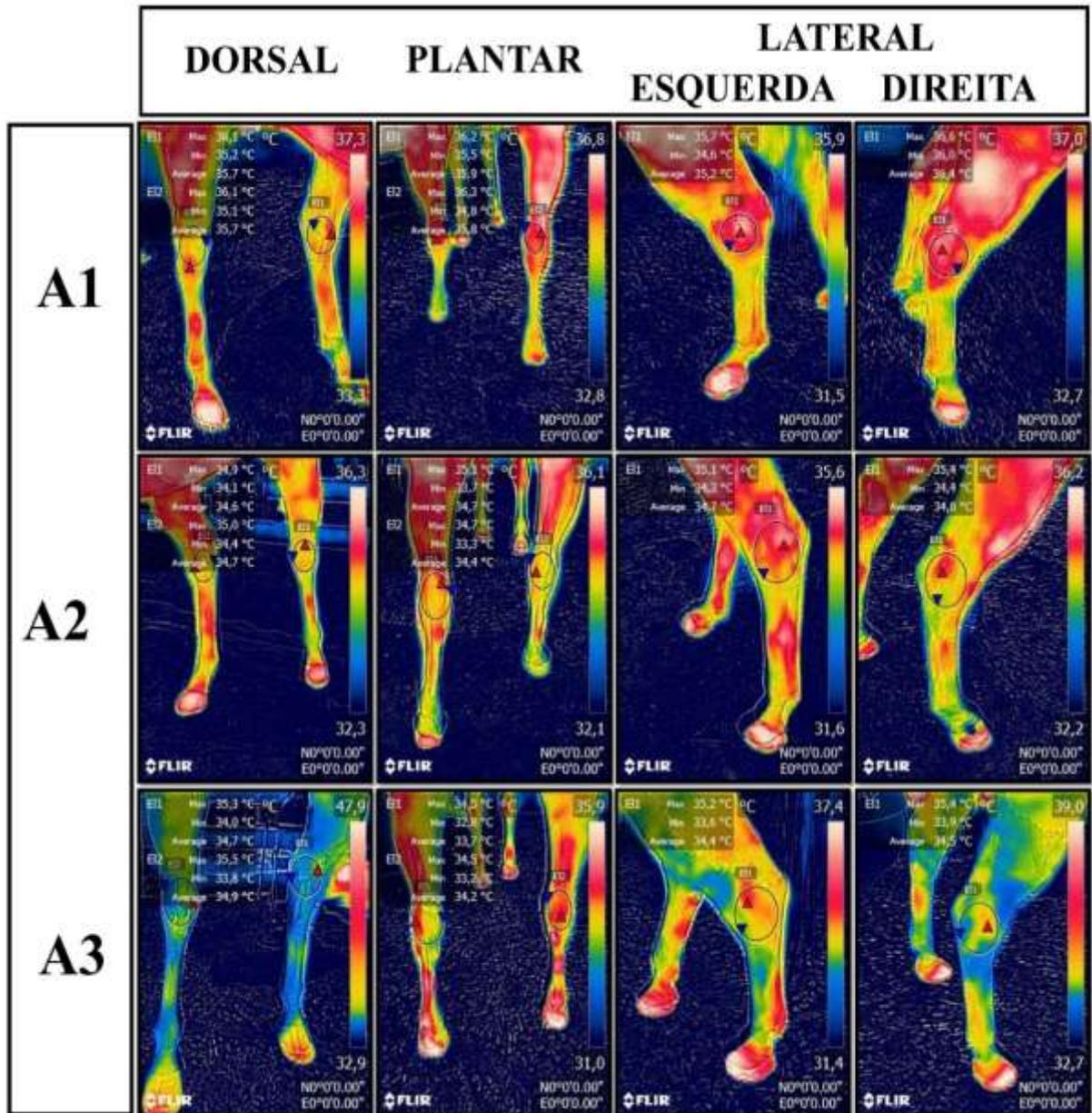
Tabela 2 - Temperatura máxima das regiões dorsal, plantar e lateral das articulações tibiotársicas dos equinos, de acordo com o grupo (CT – Controle e AO – Osteoartrite), lado (E – esquerdo e D – direito), e temperatura (°C) e umidade (%) ambiente no momento da coleta

| GRUPO | EQUINO | DORSAL | | PLANTAR | | LATERAL | | AMBIENTE | |
|-------|--------|--------|------|---------|------|---------|------|------------|-----------|
| | | E | D | E | D | E | D | TEMP. (°C) | UMID. (%) |
| CT | A1 | 36,1 | 36,1 | 36,2 | 36,3 | 36,6 | 35,7 | 33,9 | 51 |
| | A2 | 34,9 | 35,0 | 35,1 | 34,7 | 35,1 | 35,4 | 35,6 | 47 |
| | A3 | 35,3 | 35,5 | 34,5 | 34,5 | 35,2 | 35,4 | 34,7 | 49 |
| OA | A4 | 31,7 | 31,1 | 31,2 | 30,2 | 31,3 | 30,6 | 28,6 | 59 |
| | A5 | 32,2 | 32,2 | 31,1 | 31,3 | 32,1 | 32,0 | 28,4 | 68 |
| | A6 | 32,2 | 32,5 | 33,3 | 33,7 | 32,6 | 33,9 | 27,9 | 69 |

Fonte: Elaboração da própria autora.

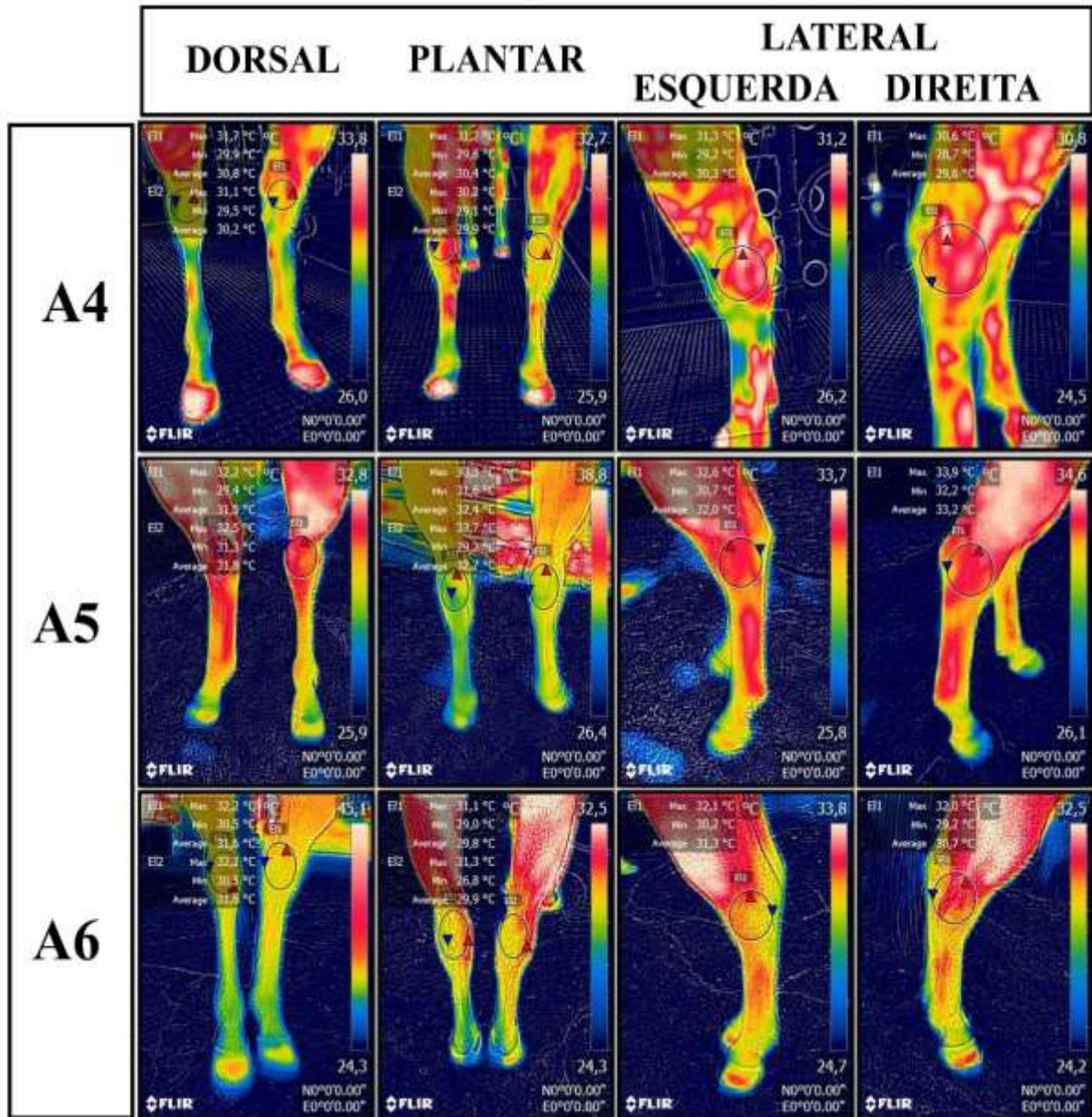
As imagens utilizadas para a análise termográfica estão ilustradas na Figura 1 (Grupo CT) e Figura 2 (Grupo OA).

Figura 1 - Imagens termográficas das projeções dorsal, plantar e lateral das regiões distais dos membros pélvicos (bilateralmente) dos equinos do Grupo Controle (A1, A2 e A3)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 2 - Imagens termográficas das projeções dorsal, plantar e lateral das regiões distais dos membros pélvicos (bilateralmente) dos equinos do Grupo Osteoartrite (A4, A5 e A6)



Fonte: Elaboração da própria autora.

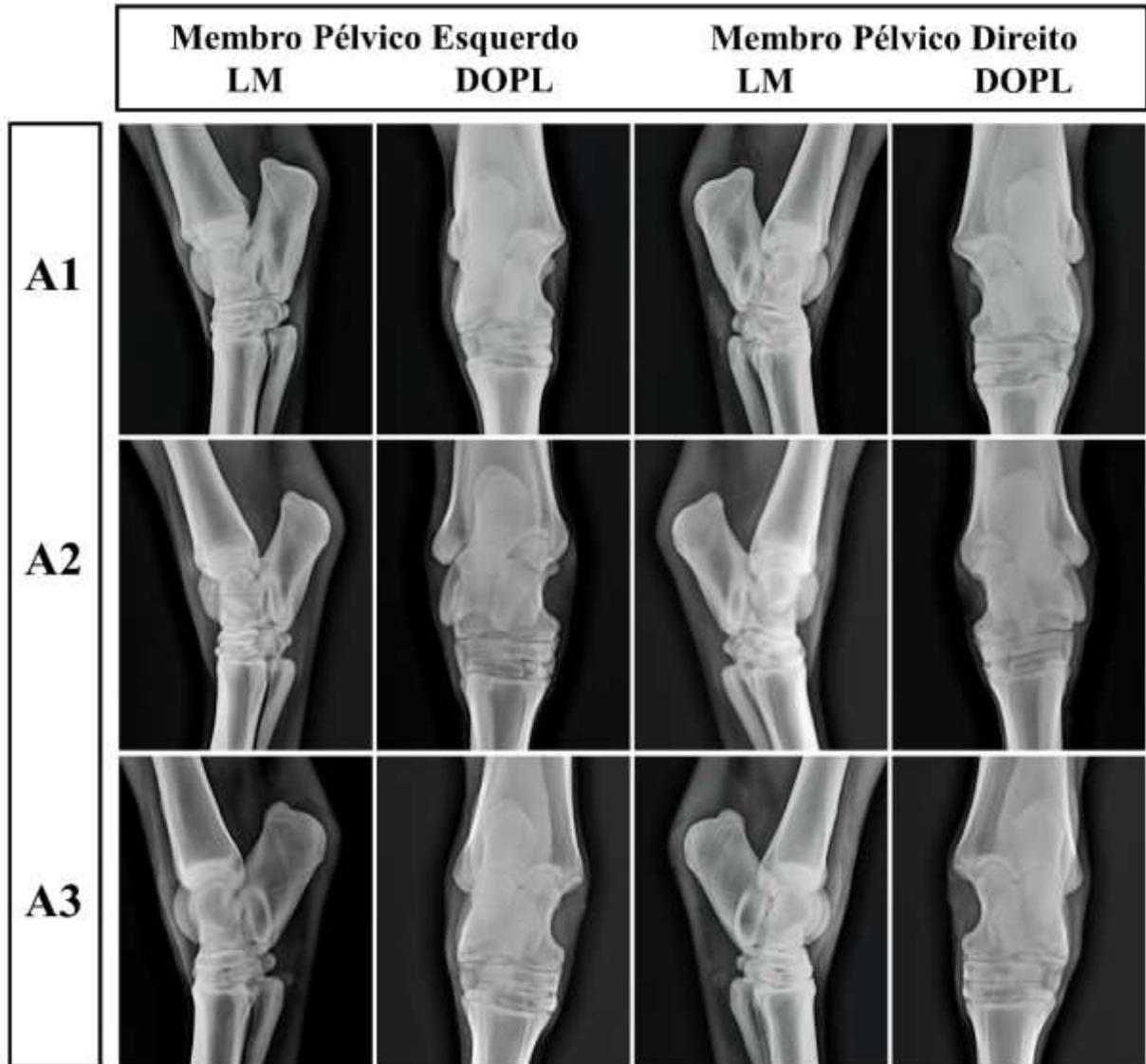
5.1.2 Exame radiográfico

O exame radiográfico foi realizado com o emissor de raios-x HR Orange, utilizando a técnica 75 KV e 1,24 mA. Para padronização das imagens, foram realizadas duas projeções radiográficas das articulações tibiotársicas, latero-medial e dorso-plantar, bilateralmente nos equinos do Grupo Controle, e unilateralmente nos animais do Grupo OA.

Para seleção dos equinos para o Grupo Controle, nenhuma alteração articular ou óssea foi identificada, garantindo a integridade da articulação. Já para os animais do Grupo OA, foram selecionados animais com evidências radiográficas de OA na articulação tibiotársica, caracterizadas pela presença de estreitamento do espaço articular, esclerose óssea subcondral, e/ou proliferação óssea periosteal.

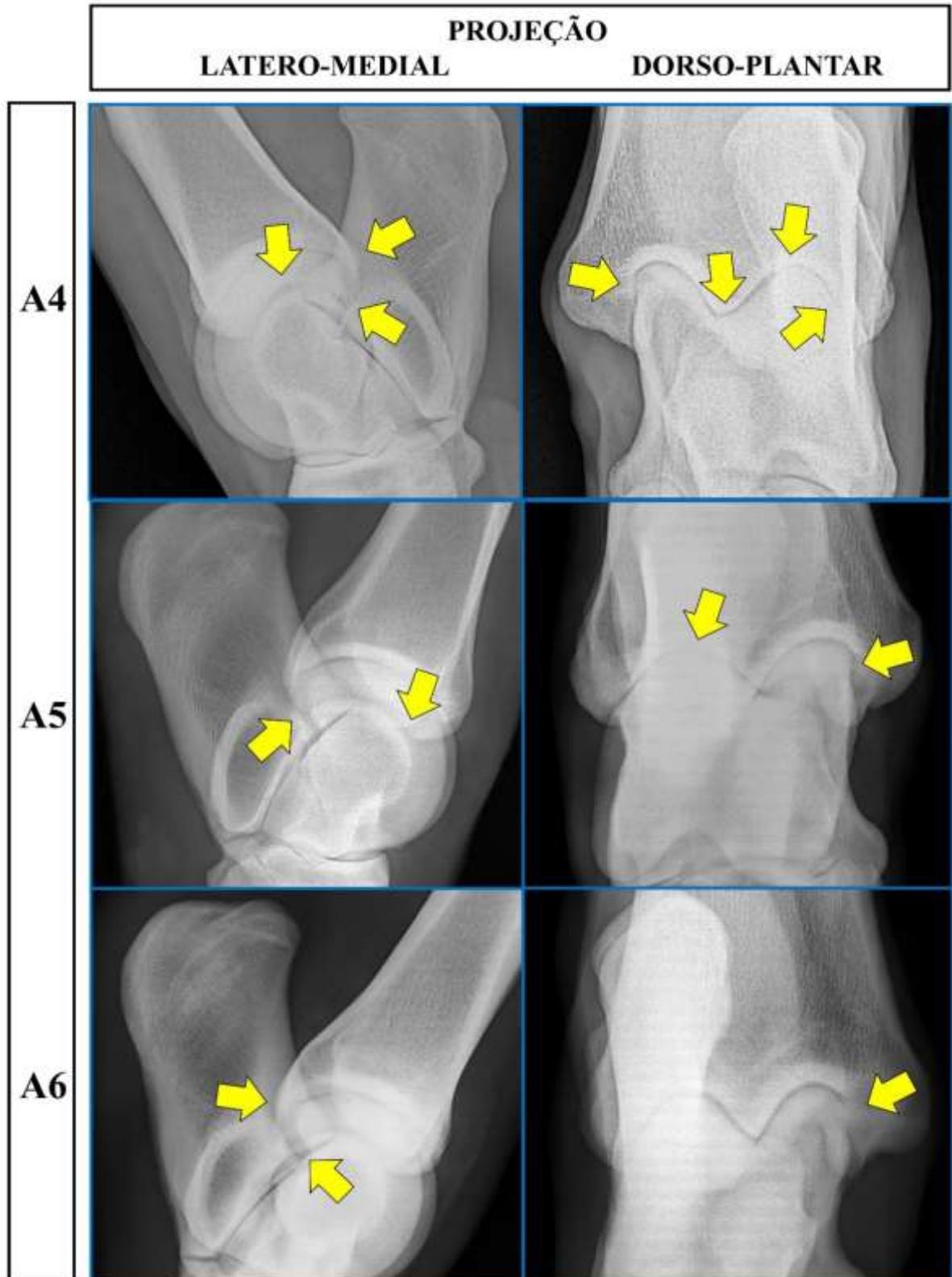
As imagens utilizadas para a análise radiográfica estão ilustradas na Figura 3 (Grupo CT) e Figura 4 (Grupo OA), cujas setas amarelas apontam as principais áreas de lesões na estrutura ósteo-articular.

Figura 3 - Imagens radiográficas das projeções latero-medial (LM) e dorso-plantar (DOPL) das articulações tibiotársicas (bilateralmente) dos equinos do Grupo Controle (A1, A2 e A3)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 4 - Imagens radiográficas das projeções latero-medial (LM) e dorso-plantar (DOPL) das articulações tibiotársicas (bilateralmente) dos equinos do Grupo Osteoartrite (A4, A5 e A6). As setas amarelas apontam as principais áreas de lesões na estrutura ósteo-articular



Fonte: Elaboração da própria autora.

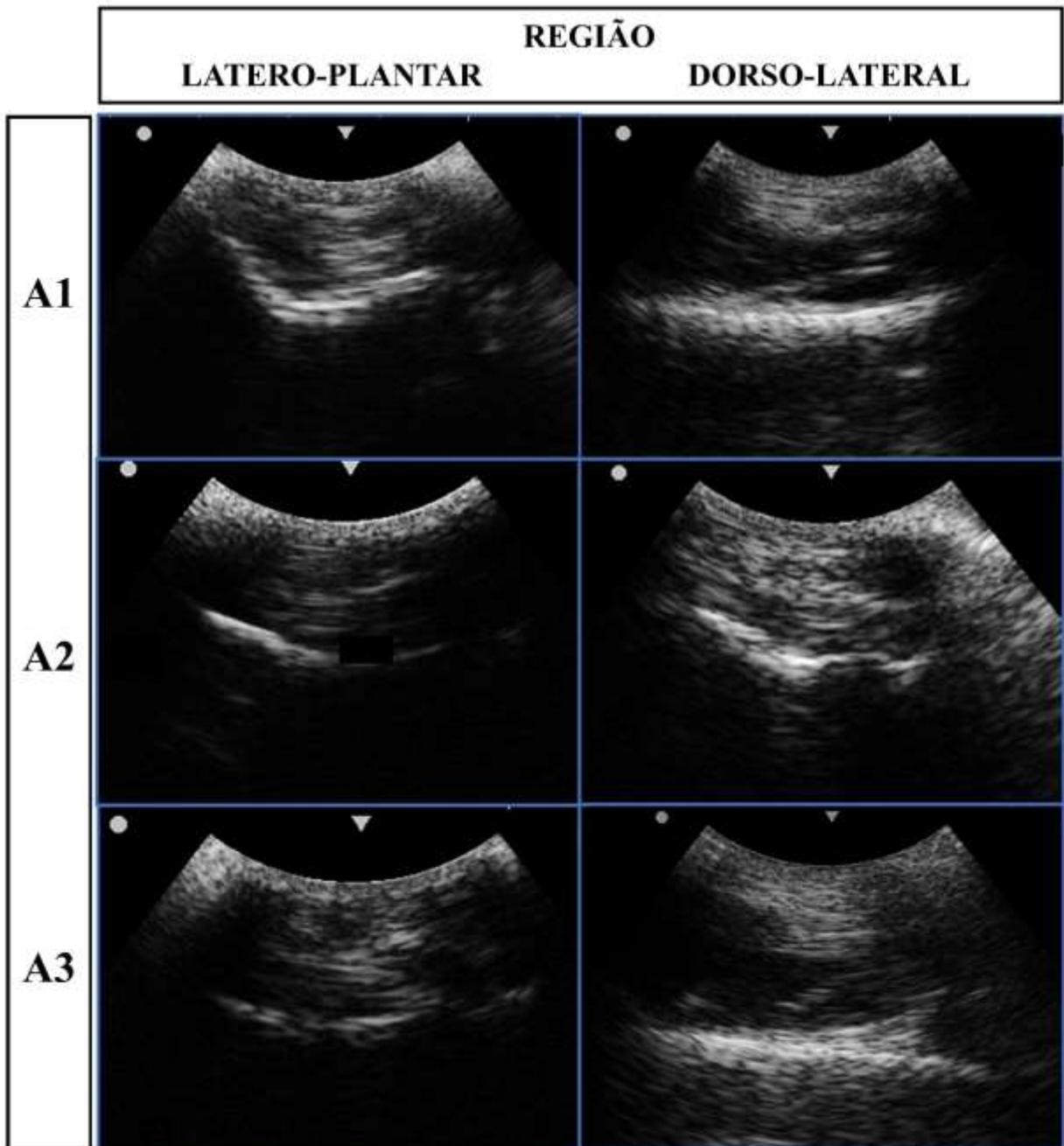
5.1.3 Exame ultrassonográfico

Após tricotomia prévia das articulações tibiotársicas, o exame ultrassonográfico foi realizado com probe setorial de 3,5 - 10 MHz conectada no equipamento Chison® 8100vet. Para padronização das imagens ultrassonográficas, foi realizada uma varredura 360° na articulação tibiotársica na posição transversal (horizontal), utilizando frequência de 5 MHz e 3,5 cm de profundidade.

Para seleção dos equinos para o Grupo Controle, nenhuma alteração na superfície articular ou óssea foi identificada, garantindo a integridade da articulação. Já para os animais do Grupo OA, foram selecionados animais com evidências ultrassonográficas de OA na articulação tibiotársica, cujas imagens sonográficas eram compatíveis com a presença da redução do espaço articular, erosões na cartilagem articular, e/ou exposição do osso subcondral.

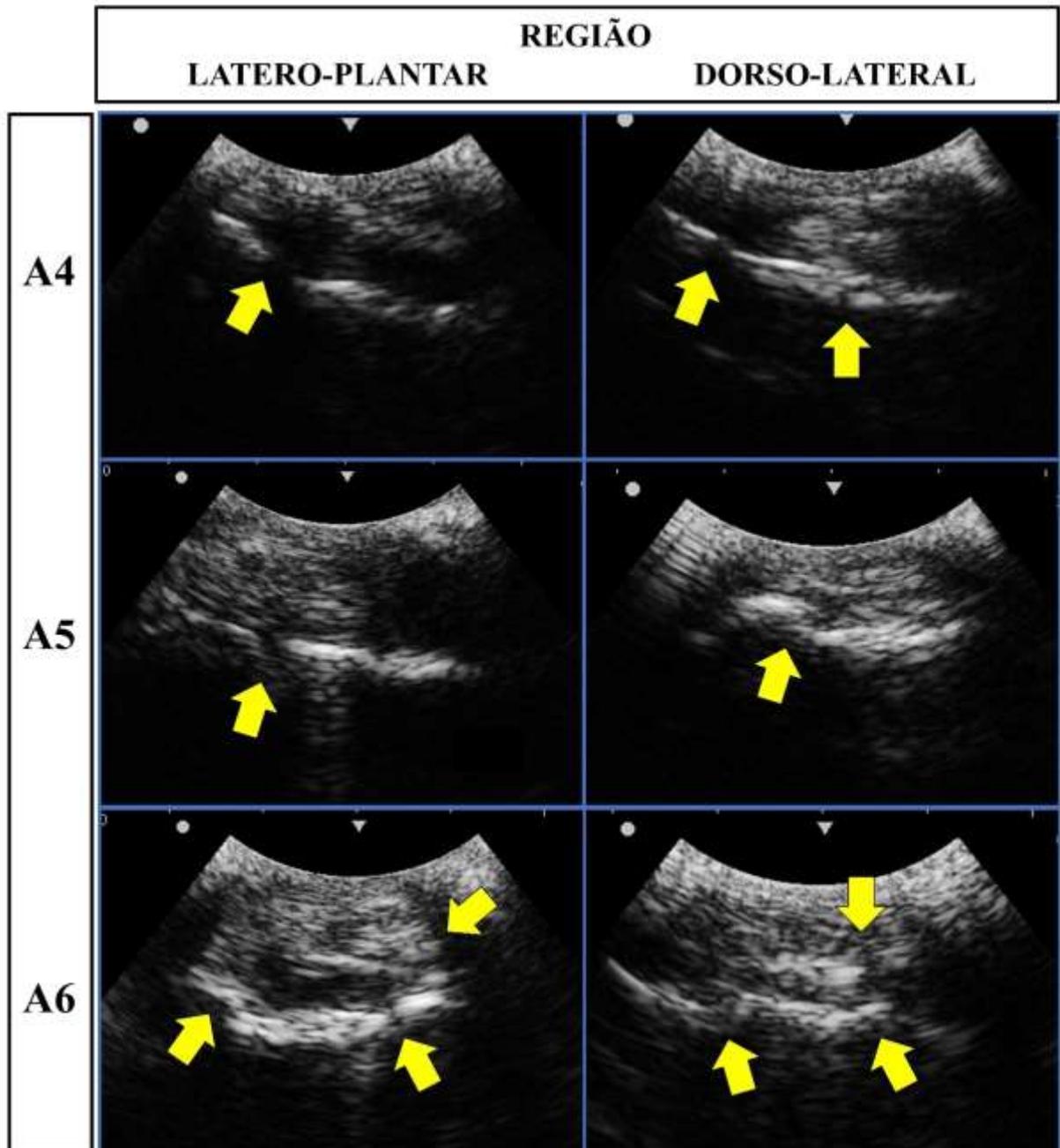
As imagens utilizadas para a análise ultrassonográficas estão ilustradas na Figura 5 (Grupo CT) e Figura 6 (Grupo OA), cujas setas amarelas apontam as principais áreas de lesões na estrutura ósteo-articular.

Figura 5 - Imagens ultrassonográficas das articulações tibiotársicas dos equinos do Grupo Controle (Técnica: 5 MHz linear e 3,5 cm de profundidade)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 6 - Imagens ultrassonográficas das articulações tibiotársicas dos equinos do Grupo Osteoartrite (A4, A5 e A6). As setas amarelas apontam as áreas de lesões na cartilagem articular com exposição de osso subcondral (Técnica: 5 MHz linear e 3,5 cm de profundidade)



Fonte: Elaboração da própria autora.

5.2 Coleta do material biológico

A coleta do sangue venoso foi realizada previamente à coleta de líquido sinovial, no mesmo dia. Como pré-requisito, os animais estavam em repouso no dia da coleta, ou seja, não realizaram nenhuma atividade física atlética, apenas caminhada livre ao pasto, visto que todos os equinos estavam alocados em piquetes.

Outra condição foi que na semana da coleta de amostras nenhum equino poderia ter participado de provas de competição. Esses estavam apenas realizando treinamento rotineiro três vezes por semana, que consistia em treino aeróbico e simulação de prova para a modalidade de Três Tambores.

5.2.1 Sangue venoso

Através de venopunção da jugular utilizando sistema a vácuo com agulha para coleta múltipla 25 x 0,7 mm e tubo de coleta a vácuo com EDTA K3 4 mL (FirstLab[®]), foram colhidos três tubos de sangue venoso (SV) em cada.

Um tubo foi refrigerado (isopor com gelo à uma temperatura entre 2 e 8 °C) e destinado para a realização do hemograma através da contagem total de células em contador hematológico automatizado (BC-5000 Vet - Mindray[®]) e contagem diferencial através de esfregaço em lâmina, corado com Panótico Rápido (Laborclin[®]). Como pré-requisito para seleção no estudo, todos os cavalos deveriam estar livres de evidências hematológicas de doença sistêmica ou discrasias sanguíneas, seguindo os parâmetros de TYLER et al. (1987). Os parâmetros hematológicos mensurados de cada equino estão descritos na Tabela 3.

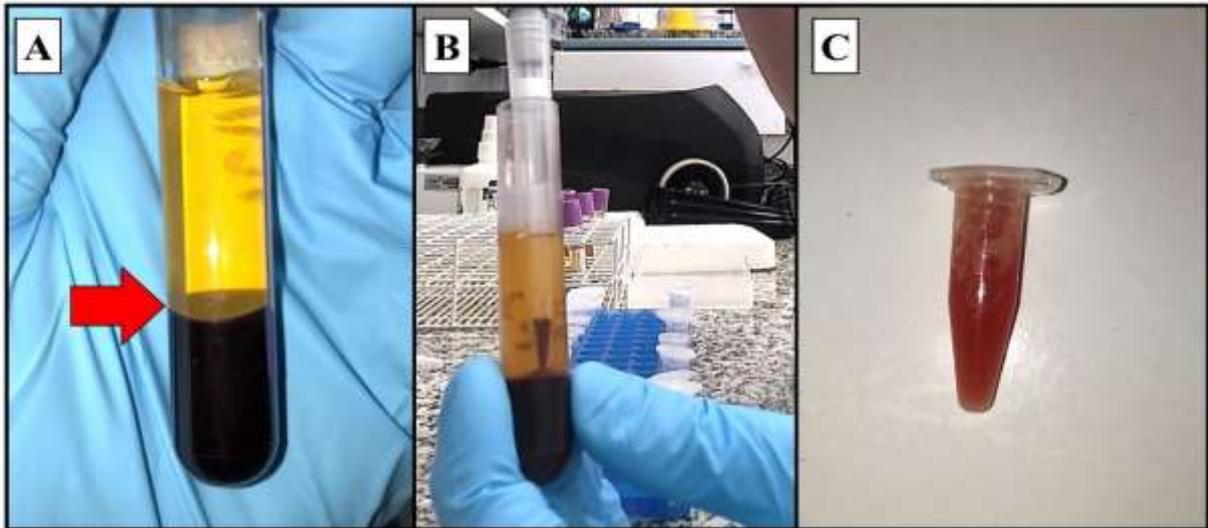
Os outros dois tubos foram imediatamente centrifugados, durante 10 minutos. O anel leucocitário (Figura 1A), com volume estimado de 500 µL para cada tubo, foi coletado com micropipeta Research 2100 monocanal 100-1000 µL (Eppendorf[®]) e ponteira universal 100-1000 µL com filtro (Gilson[®]) (Figura 1B), e aliqotado em microtubo (DNase e RNase free) contendo 1000 µL de RNA^{later} (Ambion[®]) (Figura 1C). Posteriormente os microtubos foram armazenados em freezer -80°C até o momento da extração do miRNA.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos do sangue venoso de cada equino, de acordo com os Grupos Controle (A1, A2 e A3) e Osteoartrite (A4, A5 e A6)

| PARÂMETRO | GRUPO | | | GRUPO | | | REFERÊNCIA* |
|--|----------|-------|-------|--------------|-------|-------|---------------------|
| | CONTROLE | | | OSTEOARTRITE | | | |
| | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | |
| Eritrócitos | 7,30 | 6,62 | 7,33 | 9,11 | 8,22 | 9,02 | 6,0 – 12,5 |
| Hemoglobina (g/dL) | 11,2 | 10,9 | 11,5 | 13,6 | 13,7 | 12,8 | 10,0 – 18,0 |
| Hematócrito (%) | 30,9 | 30,2 | 31,2 | 37,2 | 38,3 | 35,6 | 30,0 – 50,0 |
| VCM (fL) | 42,2 | 43,5 | 42,5 | 40,8 | 46,6 | 39,5 | 35,0 – 58,0 |
| HCM (pg) | 15,3 | 16,4 | 15,6 | 14,9 | 16,7 | 14,1 | 12,5 – 19,5 |
| CHCM (g/dL) | 36,3 | 37,8 | 36,7 | 36,6 | 35,8 | 35,9 | 31,0 – 39,0 |
| Leucócitos totais (10³/μL) | 11,66 | 10,82 | 10,50 | 9,03 | 9,58 | 9,23 | 5500 – 14000 |
| Neutrófilos (10³/μL) | 6,79 | 6,33 | 6,00 | 5,31 | 6,15 | 6,35 | 3000 – 8000 |
| Linfócitos (10³/μL) | 3,95 | 3,49 | 3,64 | 2,79 | 2,69 | 2,44 | 1500 – 6000 |
| Monócitos (10³/μL) | 0,17 | 0,22 | 0,16 | 0,19 | 0,12 | 0,12 | 0 – 1000 |
| Eosinófilos (10³/μL) | 0,75 | 0,78 | 0,70 | 0,74 | 0,62 | 0,32 | 0 – 1000 |
| Basófilos (10³/μL) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 – 300 |
| Neutrófilos (%) | 58,23 | 58,50 | 57,20 | 58,80 | 64,10 | 68,80 | 30 – 70 |
| Linfócitos (%) | 33,88 | 32,30 | 34,70 | 30,91 | 28,10 | 26,43 | 25 – 65 |
| Monócitos (%) | 1,46 | 2,10 | 1,50 | 2,10 | 1,30 | 1,30 | 1 – 10 |
| Eosinófilos (%) | 6,43 | 7,10 | 6,60 | 8,19 | 6,50 | 3,47 | 1 – 10 |
| Basófilos (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 – 3 |

*Fonte: Tyler et al., 1987.

Figura 7 - A. Tubo contendo EDTA após a centrifugação, destacando-se o anel leucocitário na seta vermelha. B. Coleta do anel leucocitado utilizando micropipeta e ponteira. C. Anel leucocitário aliqotado com 1000 μ L de RNAlater



Fonte: Elaboração da própria autora.

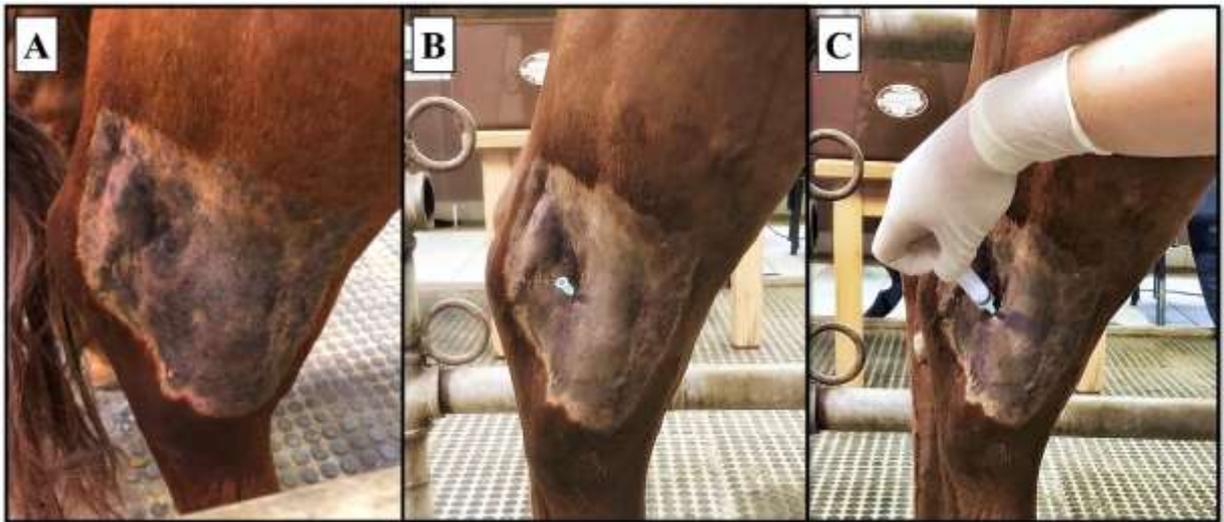
5.2.2 Líquido sinovial

Dentro de um tronco de contenção, o equino foi contido para realização da tricotomia (Figura 8A) e antissepsia (iodopolividona degermante, seguido por iodopolividona tópico e álcool iodado) na região lateral da articulação tibiotársica. Os equinos foram sedados através da administração intravenosa de detomidina na dose de 10 μ g/Kg (Detomidin – Syntec®).

Para os equinos do Grupo CT, a coleta foi realizada alternadamente, entre os membros pélvicos direito e esquerdo, para evitar qualquer tipo de viés e não interferir na análise. No Grupo OA, o líquido sinovial (LS) foi coletado na articulação enferma.

Após a sedação e de modo asséptico, a amostra de LS foi colhida através da técnica modificada de Schumacher e Wilhite (2012), que consistiu em artrocentese utilizando agulha descartável hipodérmica 30 x 0,8 mm (Labor Import®) para acessar a bursa superior da cápsula articular, através do acesso latero-plantar entre o calcâneo e o maléolo lateral da tíbia (Figura 8B). O LS foi aspirado com seringa estéril de 5 mL (Descarpack®) (Figura 8C).

Figura 8 – Imagem fotográfica ilustrando a coleta do líquido sinovial. A. Região lateral da articulação tibiotársica de um equino após a realização da tricotomia. B. Agulha descartável hipodérmica 30 x 0,8 mm inserida na bursa superior da cápsula articular através do acesso latero-plantar entre o calcâneo e o maléolo lateral da tibia. C. Aspiração do líquido sinovial utilizando seringa estéril de 5 mL



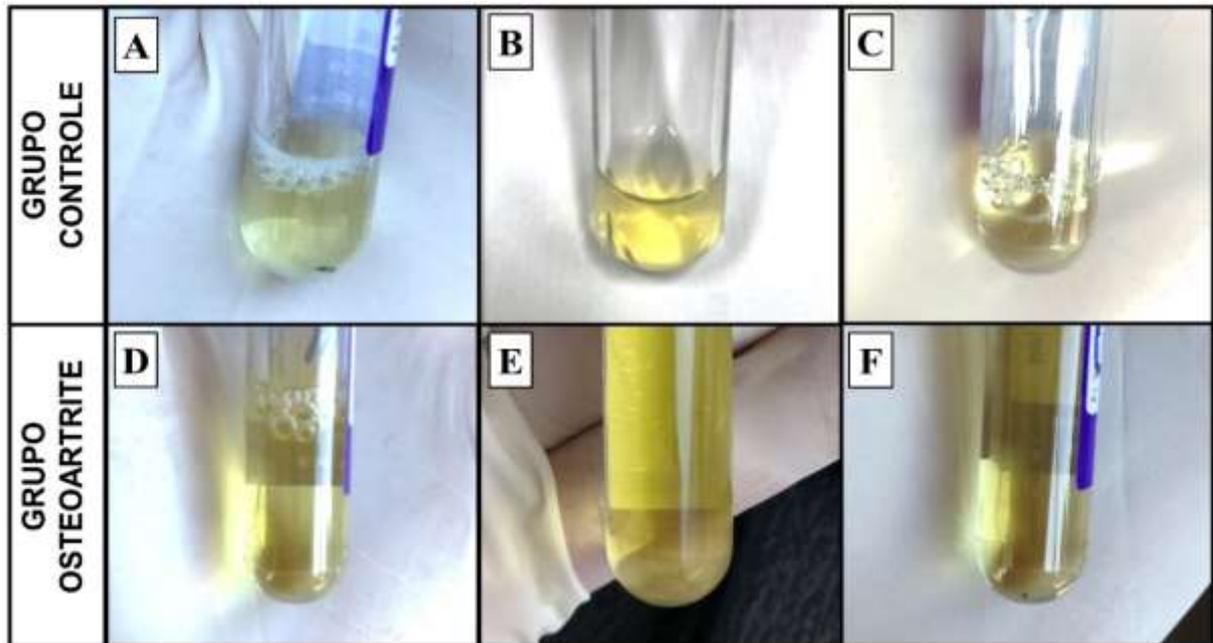
Fonte: Elaboração da própria autora.

Durante os procedimentos de coleta, tomou-se a precaução que nenhum cavalo se movimentasse, visando que as amostras não fossem ocasionalmente contaminadas com sangue fresco.

O volume de 1 mL de LS imediatamente alocado em tubo de coleta à vácuo com EDTA K3 4 mL (FirstLab[®]). Posteriormente, 500 μ L da amostra de LS foi alíquotado com micropipeta Research 2100 monocanal 100-1000 μ L (Eppendorf[®]) e ponteira universal 100-1000 μ L com filtro (Gilson[®]), em microtubo (DNase e RNase free) com 1000 μ L de RNA^{later} (Ambion[®]). Posteriormente os microtubos foram armazenados em freezer - 80°C até o momento da extração do miRNA.

Todos os equinos do Grupo CT apresentaram LS com coloração amarelo-citrino (Figura 9A, 9B e 9C). O LS dos equinos do Grupo OA possuía coloração amarelo-escuro (Figura 9D, 9E e 9F), e em dois equinos OA (A4 e A5) foram observadas partículas em suspensão no LS.

Figura 9 - Coloração do líquido sinovial alocado em tubo de coleta com EDTA K3, dos 6 equinos utilizados no experimento, sendo amarelo-pálido no Grupo Controle (A- A1, B- A2 e C- A3), e amarelo-escuro no Grupo Osteoartrite (D- A4, E- A5, e F- A6)



Fonte: Elaboração da própria autora.

5.3 Extração do RNA

As análises foram realizadas no Laboratório de Endotoxemia e Enfermidades de Grandes Animais (LEEGA) do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/UNESP).

As amostras, que permaneceram congeladas a -80°C até o momento da extração, foram descongeladas (5 minutos em temperatura ambiente) e centrifugadas em centrífuga 5417 R (Eppendorf®) na velocidade de 5000 rpm durante 10 minutos, com o objetivo de separar o RNA/ater da amostra.

Posteriormente, os 1000 μL de RNA/ater foram removidos do microtubo utilizando com micropipeta Research 2100 monocanal 100-1000 μL (Eppendorf®) e ponteira universal 100-1000 μL com filtro (Gilson®).

O RNAtotal foi extraído 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®), cujos passos estão descritos na Tabela 4.

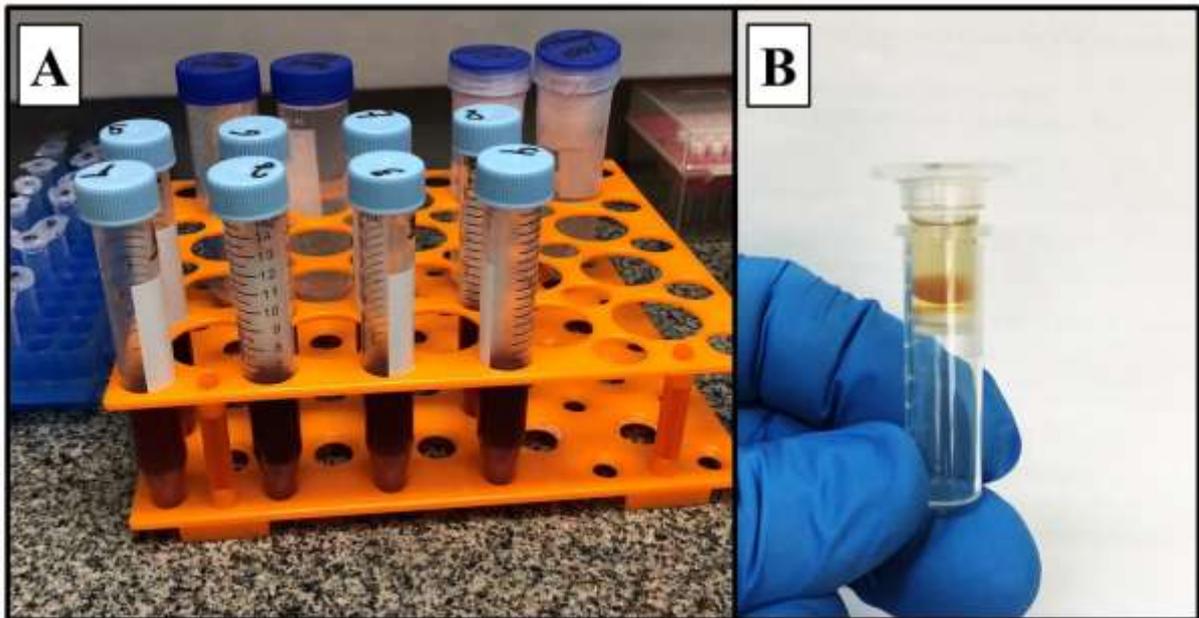
Tabela 4 - Passos da extração de RNAtotal utilizando uma adaptação do kit “Alternative Protocol for Extraction of RNA from Cells Captured on LeukoLOCK Filters Using TRI Reagent® (Thermo Fisher Scientific®)”

(continua)

| PASSO | PROCEDIMENTO |
|--------------|--|
| 1 | Adição de 4 mL de reagente TRI na amostra (sem RNA $_{later}$), em um tubo Falcon estéril de 15 mL. |
| 2 | Adição de 800 μ l de BCP, seguido por agitação vigorosa por 30 segundos, e repouso em temperatura ambiente por 5 minutos (Figura 10A). |
| 3 | Centrifugação (5810 R - Eppendorf®) por 10 minutos a 2000 x g (3200 rpm) e posterior remoção da fase aquosa (~ 2,5 mL). |
| 4 | Adição de 0,5 volume de água isenta de nuclease. Em seguida, adição de 1,25 volumes de etanol a 100%. |
| 5 | Filtração da amostra por meio da utilização da centrífuga 5417 R (Eppendorf®) durante 10 segundos, através da inserção de um cartucho rotativo (700 μ L) em um tubo de eluição. Repetição da filtração até o fim do conteúdo da amostra. |
| 6 | Inserção do cartucho em outro tubo de eluição e adição de 750 μ l de “Wash 1”. Centrifugação do conjunto em velocidade máxima por 10 segundos, até que toda a solução passe pelo filtro. Descarte do conteúdo do tubo de eluição. |
| 7 | Lavagem do cartucho duas vezes com 750 μ L de “Wash 2”, descartando o conteúdo do tubo de eluição (Figura 10B). |
| 8 | Centrifugação do cartucho rotativo para secar o filtro e colocação do cartucho em um novo tubo de eluição. |
| 9 | Eluição do RNA com 200 μ L de EDTA 0,1 mM isento de nuclease, aquecido a 80°C, no centro do cartucho. Fechamento da tampa e espera em temperatura ambiente por 1 minuto. |
| 10 | Centrifugação por 1 minuto na velocidade máxima da centrífuga e descarte o cartucho rotativo. |
| 11 | Armazenamento do RNA eluído em freezer a -80°C. |

Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 10 - Extração do RNA total. A. Tubo Falcon contendo a amostra de sangue venoso e adição de reagente TRI e BCP. B. Cartucho dentro do tubo de eluição



Fonte: Elaboração da própria autora.

Os ácidos nucleicos foram avaliados de maneira quantitativa pelo “*NanoDrop Microvolume Spectrophotometers and Fluorometer*” (Thermo Fisher Scientific®) seguindo-se as instruções do fabricante, para mensuração da quantidade de miRNA das amostras, e garantia de qualidade antes do ensaio de microarranjo.

Para se obter a quantidade de RNA total necessária para a realização da técnica de microarranjo, foi necessário realizar o *pool* de anel leucocitário de dois microtubos para cada tipo de amostra na extração, ou seja, dois microtubos contendo 500 μL de anel leucocitário oriundos do SV + 1000 μL de RNA $later$ cada, e outros dois microtubos contendo 500 μL de LS + 1000 μL de RNA $later$ cada.

As amostras extraídas foram concentradas no equipamento “Eppendorf Concentrator 5301” (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) conforme descrito em (HERMANN et al., 2019), para padronização da concentração de RNA total das amostras (16,25 ng/ μL) para realização do microarranjo.

Os valores das concentrações de RNA total obtido após a realização do protocolo de extração, e posterior evaporação para concentração das amostras de SV, estão presentes na Tabela 5, e do LS na Tabela 6.

Tabela 5 - Valores das concentrações de RNAtotal (ng/μL) obtido após a realização do protocolo de extração e posteriormente evaporação para concentração das amostras de sangue venoso, de cada amostra, de acordo com os grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA)

| GRUPO | AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DE RNA (ng/μL) | |
|-------|---------|-----------------------------|-------------------|
| | | APÓS A EXTRAÇÃO | APÓS A EVAPORAÇÃO |
| CT | A1 | 6,5 | 23,6 |
| | A2 | 4,2 | 25,0 |
| | A3 | 4,1 | 20,0 |
| OA | A4 | 4,7 | 10,9 |
| | A5 | 2,8 | 14,4 |
| | A6 | 1,9 | 7,71 |

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 6 - Valores das concentrações de RNAtotal (ng/μL) obtido após a realização do protocolo de extração e posteriormente evaporação para concentração das amostras de líquido sinovial, de cada amostra, de acordo com os grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA)

| GRUPO | AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DE RNA (ng/μL) | |
|-------|---------|-----------------------------|-------------------|
| | | APÓS A EXTRAÇÃO | APÓS A EVAPORAÇÃO |
| CT | A1 | 1,6 | 60,5 |
| | A2 | 1,1 | 57,9 |
| | A3 | 3,3 | 46,5 |
| OA | A4 | 1,8 | 33,7 |
| | A5 | 2,1 | 17,8 |
| | A6 | 3,0 | 25,2 |

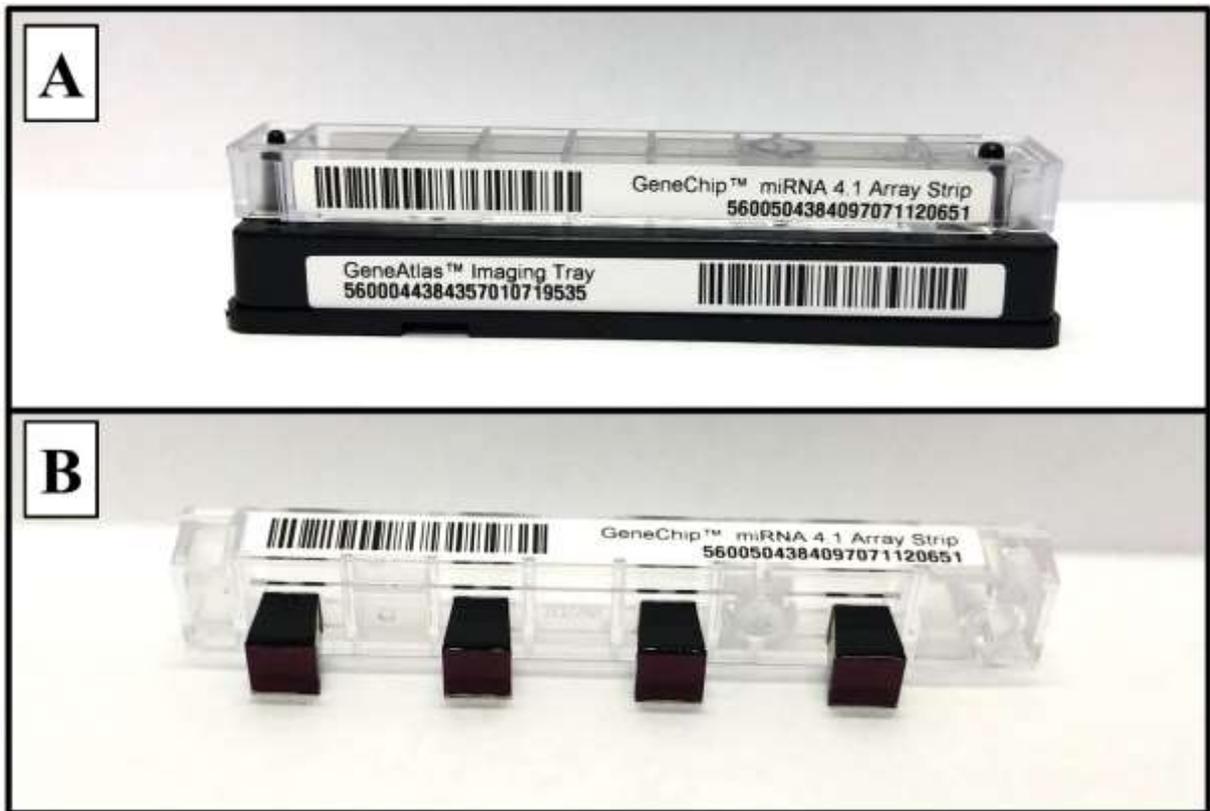
Fonte: Elaboração da própria autora.

5.4 Microarranjo

O microarranjo foi realizado no Laboratório de Endotoxemia e Enfermidades de Grandes Animais (LEEGA) do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/UNESP).

Após descongelamento do miRNA extraído, foi utilizado o kit “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip” (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) (Figura 11) para realização do microarranjo, de acordo com as recomendações do fabricante.

Figura 11 - A. Kit “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip”. B. GeneChip™



Fonte: Elaboração da própria autora.

As amostras foram marcadas com o kit “FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kits” (Thermo Fisher Scientific®), e hibridizadas em *strips* com o kit “GeneAtlas® Hybridization, Wash, and Stain Kit for miRNA Arrays” (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) durante 20 horas a 48°C no equipamento “AccuBlock™ Digital Dry Bath” (Labnet International, Inc., Nova Jersey, EUA).

Em seguida, os *strips* foram lavados e escaneados pelo equipamento “GeneAtlas Affymetrix®” (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EUA) (Figura 12).

Posteriormente, as imagens obtidas em arquivos de formato “CEL” foram convertidas em arquivos “CHP”, foram transformadas em valores de \log_2 e normalizadas através do programa “Transcriptome Analysis Console (TAC)” (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), utilizando o algoritmo RMA (*Robust Multi-array Average*) + DABG (*Detected Above Background*).

Figura 12 - Equipamento “GeneAtlas Affymetrix®”



Fonte: Elaboração da própria autora.

5.5 Análise estatística

Foram utilizados nesta análise os 354 miRNAs (APÊNDICE A) já anotados para a espécie equina (*Equus caballus*), presentes no “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip”. A análise estatística para avaliação da expressão diferencial de miRNAs entre os grupos CT e OA foi realizada utilizando o programa “*Transcriptome Analysis Console (TAC)*”.

A análise foi baseada no método ANOVA, cujos critérios foram: *fold change* < -2 ou > +2, valor de P < 0,05, e DABG < 0,05. A “*Probeset*” (exon) foi considerada expressa quando $\geq 50\%$ das amostras tiveram valores DABG abaixo do limiar.

6 RESULTADOS

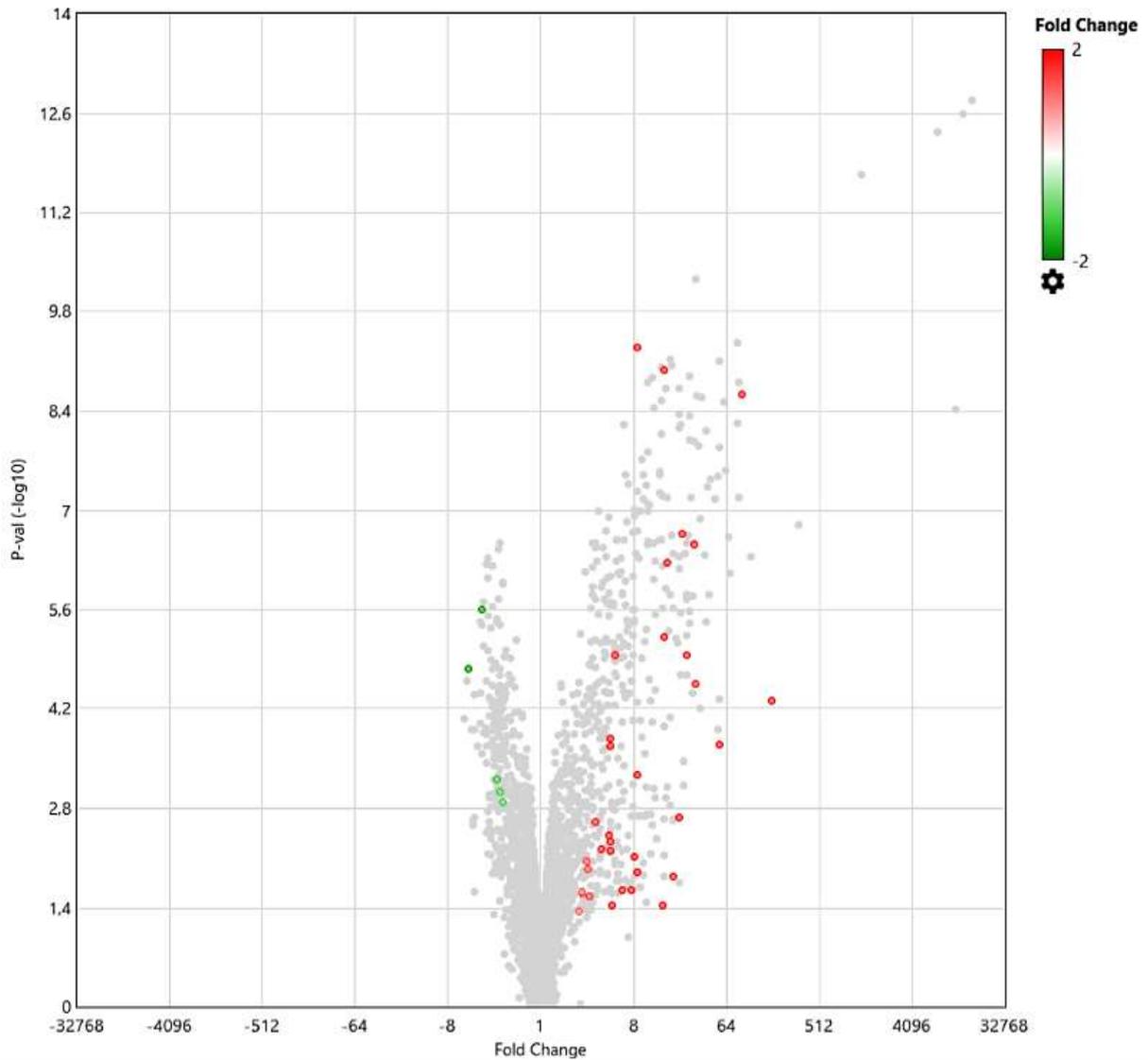
6.1 Sangue venoso

Foram identificados 42 miRNAs diferencialmente expressos no SV dos equinos, sendo 36 regulados positivamente e 6 regulados negativamente, quando comparado o Grupo OA em relação ao Grupo CT (Figura 13).

A semelhança entre indivíduos com armazenamento em cluster hierárquico pode ser visualizada no mapa de calor (Figura 14).

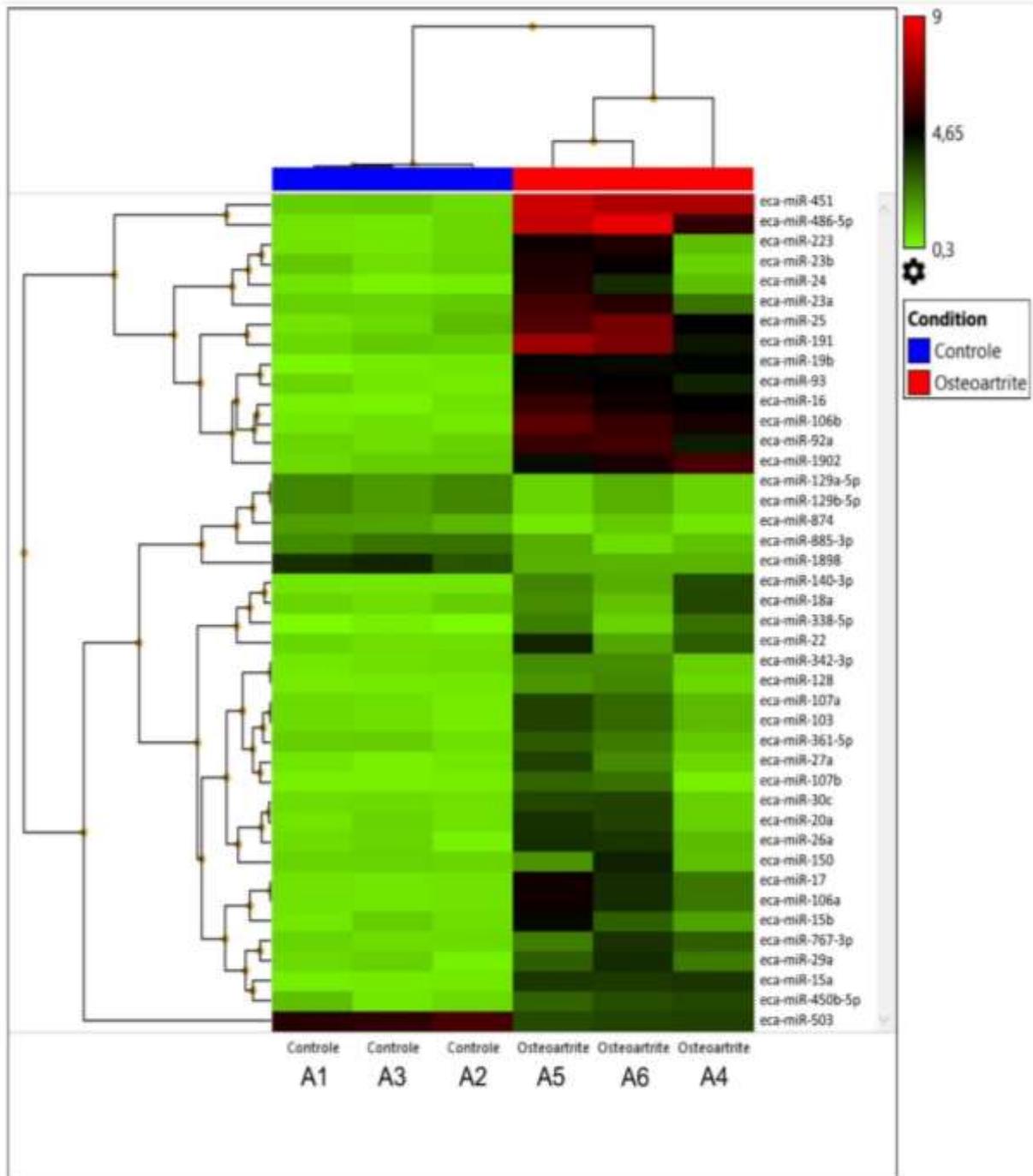
A lista com todos os miRNAs, e os respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P, estão na Tabela 7 (regulados positivamente) e na Tabela 8 (regulados negativamente).

Figura 13 - Gráfico de expressão (*fold change* x valor de P) do microarranjo das amostras de sangue venoso dos equinos dos Grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA). Os pontos coloridos representam os miRNAs (\log_2) considerados regulados positivamente (cor vermelha) ou regulados negativamente (cor verde), e os miRNAs não considerados diferencialmente expressos são os pontos na cor cinza ($P < 0,05$, *fold change* $\pm 2,0$)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 14 - Mapa de calor comparando os miRNAs diferencialmente expressos (\log_2), do microarranjo das amostras de sangue venoso dos equinos, de acordo com os Grupos Controle e Osteoartrite. A intensidade da cor indica níveis de expressão: regulado positivamente (cor vermelha) ou regulado negativamente (cor verde)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 7 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulados positivamente no sangue de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P. A lista dos miRNAs está organizada por valor decrescente do *fold change*

(continua)

| miRNA | Média de expressão \pm desvio-padrão (\log_2) | | <i>fold change</i> | Valor de P |
|-----------------|--|-----------------|--------------------|------------|
| | Grupo OA | Grupo CT | | |
| eca-miR-486-5p | 8,14 \pm 1,67 | 0,68 \pm 0,17 | 176,43 | 0,00005 |
| eca-miR-451 | 7,60 \pm 0,34 | 1,12 \pm 0,16 | 89,31 | 0,00000 |
| eca-miR-191 | 6,83 \pm 1,61 | 1,05 \pm 0,14 | 54,93 | 0,00020 |
| eca-miR-25 | 5,88 \pm 1,04 | 0,89 \pm 0,38 | 31,75 | 0,00003 |
| eca-miR-106b | 5,58 \pm 0,56 | 0,63 \pm 0,10 | 31,03 | 0,00000 |
| eca-miR-92a | 5,66 \pm 0,85 | 0,95 \pm 0,10 | 26,15 | 0,00001 |
| eca-miR-16 | 5,02 \pm 0,47 | 0,46 \pm 0,16 | 23,50 | 0,00000 |
| eca-miR-23a | 5,53 \pm 1,67 | 1,07 \pm 0,08 | 21,98 | 0,00210 |
| eca-miR-223 | 5,00 \pm 2,11 | 0,72 \pm 0,14 | 19,43 | 0,01440 |
| eca-miR-93 | 4,71 \pm 0,44 | 0,63 \pm 0,18 | 16,92 | 0,00000 |
| eca-miR-1902 | 5,12 \pm 0,73 | 1,13 \pm 0,15 | 15,97 | 0,00001 |
| eca-miR-19b | 4,55 \pm 0,04 | 0,58 \pm 0,15 | 15,64 | 0,00000 |
| eca-miR-23b | 4,96 \pm 2,31 | 1,01 \pm 0,21 | 15,64 | 0,03620 |
| eca-miR-24 | 3,68 \pm 1,98 | 0,57 \pm 0,12 | 8,63 | 0,01230 |
| eca-miR-17 | 3,83 \pm 1,16 | 0,73 \pm 0,03 | 8,62 | 0,00050 |
| eca-miR-106a | 3,83 \pm 1,16 | 0,73 \pm 0,03 | 8,62 | 0,00050 |
| eca-miR-15a | 3,69 \pm 0,03 | 0,59 \pm 0,04 | 8,60 | 0,00000 |
| eca-miR-26a | 3,82 \pm 1,37 | 0,79 \pm 0,27 | 8,15 | 0,00780 |
| eca-miR-20a | 3,67 \pm 1,54 | 0,72 \pm 0,15 | 7,69 | 0,02280 |
| eca-miR-30c | 3,47 \pm 1,41 | 0,85 \pm 0,05 | 6,12 | 0,02210 |
| eca-miR-450b-5p | 3,30 \pm 0,26 | 0,92 \pm 0,36 | 5,23 | 0,00001 |
| eca-miR-107b | 2,82 \pm 1,34 | 0,50 \pm 0,03 | 4,98 | 0,03730 |
| eca-miR-29a | 3,12 \pm 0,70 | 0,85 \pm 0,29 | 4,81 | 0,00020 |
| eca-miR-15b | 3,09 \pm 1,31 | 0,84 \pm 0,23 | 4,77 | 0,00640 |

Tabela 7 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulado positivamente) no sangue de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P. A lista dos miRNAs está organizada por valor decrescente do *fold change*

| | | | | (conclusão) |
|----------------|-------------|-------------|------|-------------|
| eca-miR-338-5p | 2,58 ± 0,91 | 0,33 ± 0,12 | 4,76 | 0,00470 |
| eca-miR-767-3p | 3,08 ± 0,67 | 0,84 ± 0,08 | 4,72 | 0,00020 |
| eca-miR-22 | 2,99 ± 1,12 | 0,79 ± 0,09 | 4,59 | 0,00390 |
| eca-miR-107a | 2,72 ± 1,06 | 0,76 ± 0,15 | 3,87 | 0,00580 |
| eca-miR-103 | 2,72 ± 1,06 | 0,76 ± 0,15 | 3,87 | 0,00580 |
| eca-miR-140-3p | 2,45 ± 0,88 | 0,66 ± 0,01 | 3,45 | 0,00240 |
| eca-miR-27a | 2,26 ± 1,31 | 0,68 ± 0,11 | 2,99 | 0,02690 |
| eca-miR-128 | 2,16 ± 0,75 | 0,62 ± 0,02 | 2,89 | 0,01110 |
| eca-miR-342-3p | 2,24 ± 0,67 | 0,79 ± 0,11 | 2,73 | 0,00900 |
| eca-miR-361-5p | 2,44 ± 0,98 | 1,09 ± 0,18 | 2,55 | 0,02340 |
| eca-miR-18a | 2,30 ± 1,07 | 0,96 ± 0,14 | 2,54 | 0,02460 |
| eca-miR-150 | 2,21 ± 1,42 | 0,99 ± 0,04 | 2,34 | 0,04550 |

Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 8 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulados negativamente) no sangue de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P de cada. A lista dos miRNAs está organizada por valor crescente do *fold change*

| miRNA | Média de expressão ± desvio-padrão (\log_2) | | <i>fold change</i> | Valor de P |
|-----------------|--|-------------|--------------------|------------|
| | Grupo OA | Grupo CT | | |
| eca-miR-1898 | 1,55 ± 0,03 | 3,87 ± 0,44 | -4,99 | 0,00002 |
| eca-miR-503 | 3,51 ± 0,10 | 5,43 ± 0,29 | -3,78 | 0,00000 |
| eca-miR-885-3p | 1,26 ± 0,41 | 2,68 ± 0,25 | -2,69 | 0,00060 |
| eca-miR-129b-5p | 1,00 ± 0,35 | 2,35 ± 0,19 | -2,54 | 0,00090 |
| eca-miR-129a-5p | 1,00 ± 0,35 | 2,35 ± 0,19 | -2,54 | 0,00090 |
| eca-miR-874 | 0,64 ± 0,31 | 1,85 ± 0,23 | -2,32 | 0,00130 |

Fonte: Elaboração da própria autora.

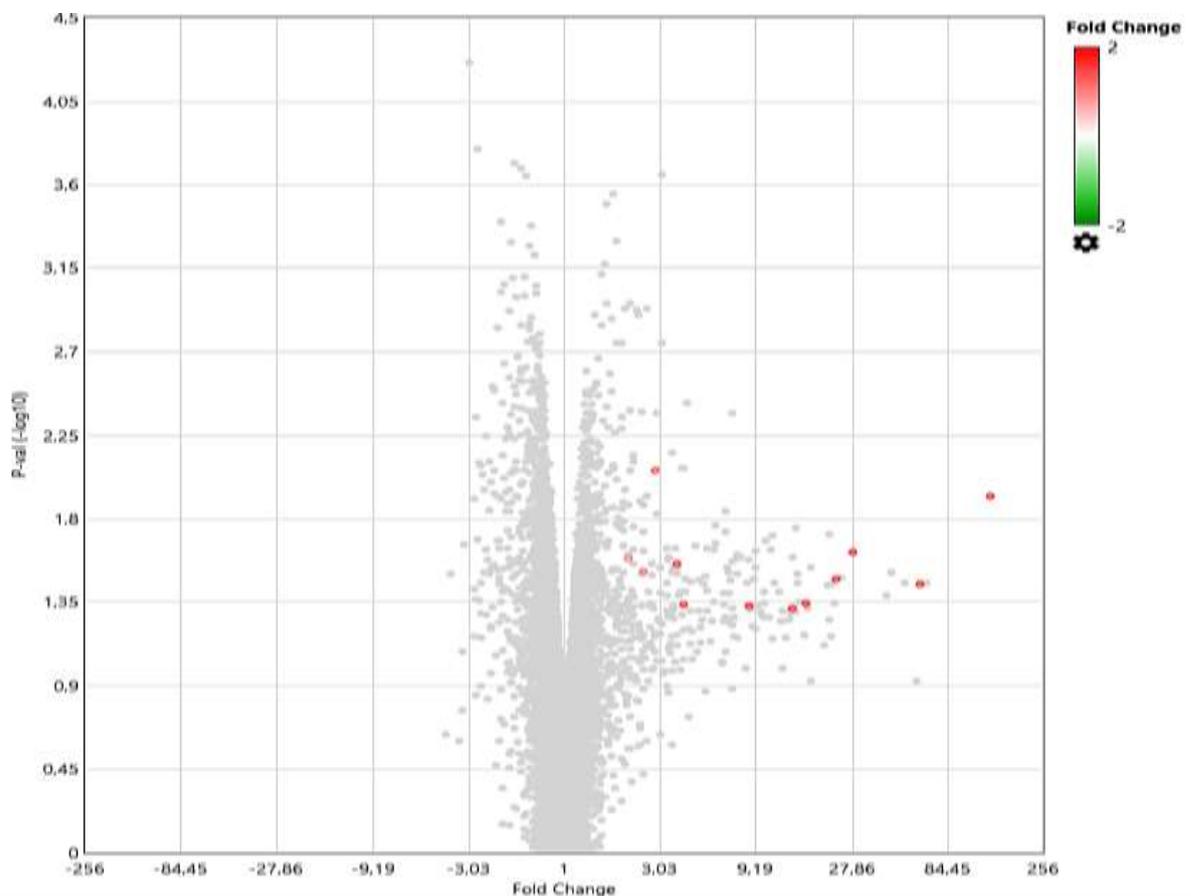
6.2 Líquido sinovial

Foram identificados 13 miRNAs diferencialmente expressos (regulados positivamente) no LS dos equinos, quando comparado o Grupo (OA) em relação ao Grupo CT na Figura 15.

A semelhança entre indivíduos com armazenamento em *cluster* hierárquico pode ser visualizada no mapa de calor (Figura 16).

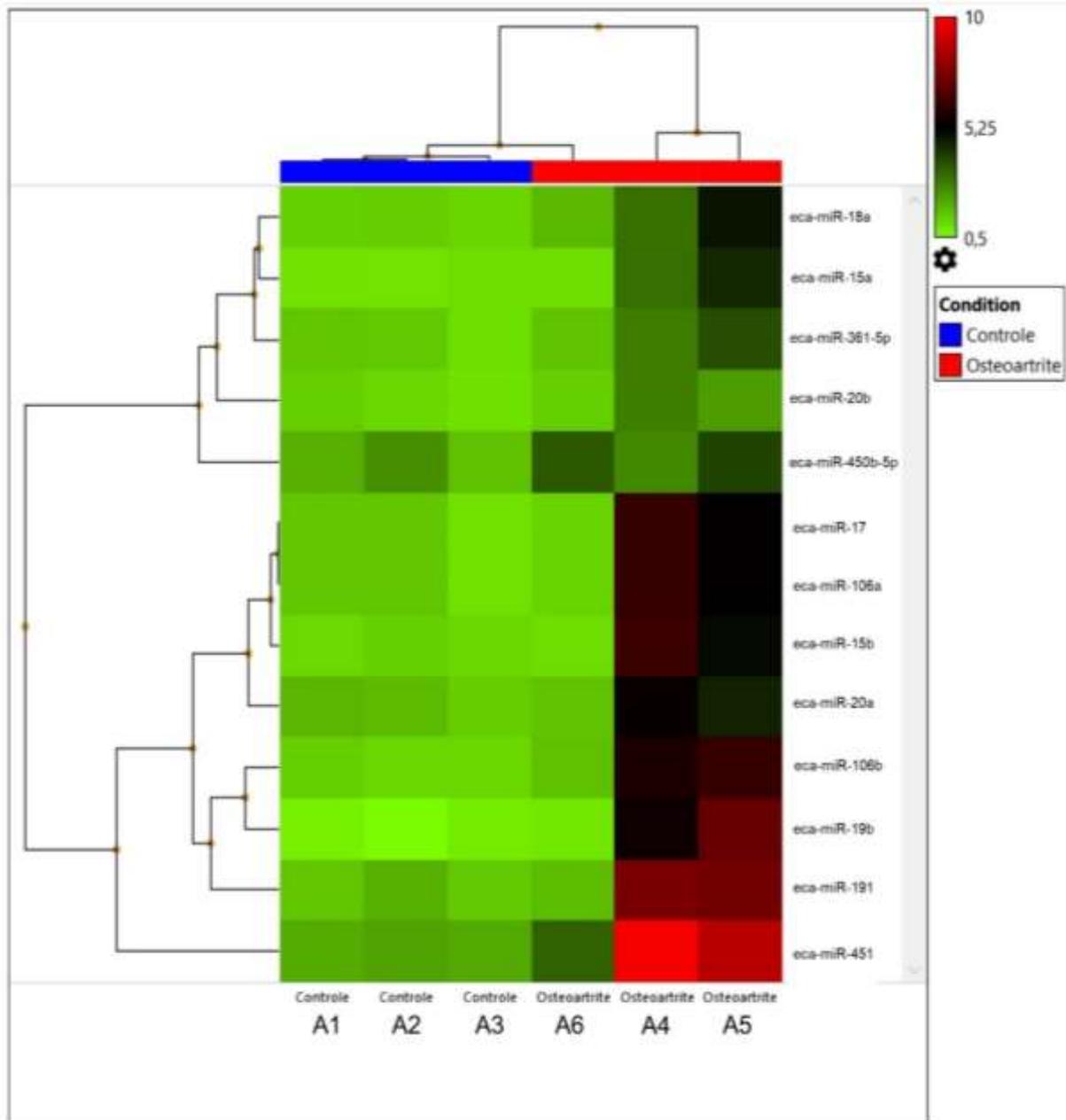
A lista com todos os miRNAs, e os respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P, estão na Tabela 10.

Figura 15 - Gráfico de expressão (*fold change* x valor de P) do microarranjo das amostras de líquido sinovial dos equinos dos Grupos Controle (CT) e Osteoartrite (OA). Os pontos coloridos representam os miRNAs (\log_2) considerados regulados positivamente (cor vermelha) ou regulados negativamente (cor verde), e os miRNAs não considerados diferencialmente expressos são os pontos na cor cinza ($P < 0,05$, *fold change* $\pm 2,0$)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Figura 16 - Mapa de calor comparando os miRNAs diferencialmente expressos (\log_2), do microarranjo das amostras de líquido sinovial dos equinos, de acordo com os Grupos Controle e Osteoartrite. A intensidade da cor indica níveis de expressão: regulados positivamente (cor vermelha) ou regulados negativamente (cor verde)



Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 9 - Lista de miRNAs diferencialmente expressos (regulados positivamente) no líquido sinovial de equinos, quando comparados os grupos OA e CT, e o respectivos valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P de cada. A lista dos miRNAs está organizada por valor decrescente do *fold change*

| miRNA | Média de expressão ± desvio-padrão (\log_2) | | <i>fold change</i> | Valor de P |
|-----------------|--|-------------|--------------------|------------|
| | Grupo OA | Grupo CT | | |
| eca-miR-451 | 9,14 ± 3,42 | 2,04 ± 0,09 | 136,93 | 0,012 |
| eca-miR-191 | 7,44 ± 3,32 | 1,50 ± 0,24 | 61,36 | 0,036 |
| eca-miR-106b | 6,00 ± 2,55 | 1,18 ± 0,11 | 28,34 | 0,024 |
| eca-miR-19b | 5,23 ± 3,23 | 0,70 ± 0,16 | 23,13 | 0,034 |
| eca-miR-17 | 5,56 ± 2,66 | 1,52 ± 0,32 | 16,42 | 0,045 |
| eca-miR-106a | 5,56 ± 2,66 | 1,52 ± 0,32 | 16,42 | 0,045 |
| eca-miR-15b | 4,96 ± 2,74 | 1,16 ± 0,10 | 13,96 | 0,048 |
| eca-miR-20a | 4,75 ± 2,03 | 1,69 ± 0,24 | 8,36 | 0,047 |
| eca-miR-15a | 2,98 ± 1,74 | 1,00 ± 0,06 | 3,95 | 0,046 |
| eca-miR-18a | 3,22 ± 1,55 | 1,36 ± 0,09 | 3,64 | 0,028 |
| eca-miR-450b-5p | 3,51 ± 0,69 | 1,99 ± 0,47 | 2,87 | 0,009 |
| eca-miR-361-5p | 2,8 ± 1,12 | 1,48 ± 0,26 | 2,48 | 0,030 |
| eca-miR-20b | 2,23 ± 0,76 | 1,17 ± 0,18 | 2,08 | 0,026 |

Fonte: Elaboração da própria autora.

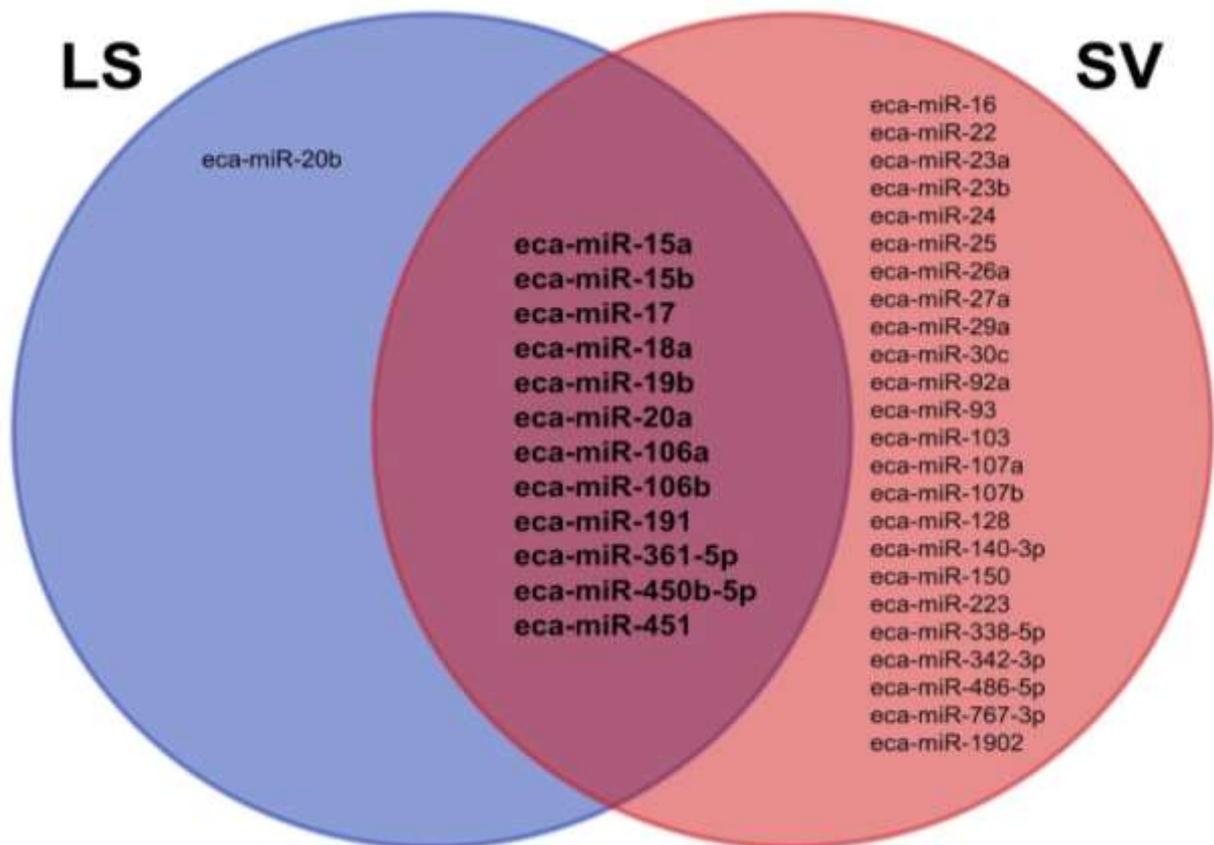
6.3 Biomarcadores sistêmicos

Utilizando a lista de miRNAs diferencialmente expressos no SV e no LS, verificou-se quais miRNAs estavam regulados positivamente em ambas as amostras biológicas. A intersecção (diagrama de Venn) destes revelou 12 miRNAs (eca-miR-15a, eca-miR-15b, eca-miR-17, eca-miR-18a, eca-miR-19b, eca-miR-20a, eca-miR-106a, eca-miR-106b, eca-miR-191, eca-miR-361-5p, eca-miR-450b-5p e eca-miR-451), que podem ser utilizados como biomarcadores sistêmicos para osteoartrite tibiotársica (Tabela 10 e Figura 17).

Os valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P dos 12 miRNAs regulados positivamente nas amostras de SV e de LS estão presentes na Tabela 11.

As sequências maduras de nucleotídeos dos miRNAs regulados positivamente nas amostras de SV e de LS estão no ANEXO B.

Figura 17 - Diagrama de Venn dos miRNAs regulados positivamente nas amostras de líquido sinovial (LS) e sangue venoso (SV), cuja intersecção revela 12 miRNAs em comum, que podem ser utilizados como biomarcadores sistêmicos para osteoartrite tibiotársica em equinos



Fonte: Elaboração da própria autora.

Tabela 10 - Valores médios de expressão e desvio-padrão (\log_2), *fold change* e valor de P dos miRNAs regulados positivamente nas amostras de sangue venoso e de líquido sinovial de equinos com (Grupo Osteoartrite - OA) e sem osteoartrite tibiotársica (Grupo Controle - CT). A lista dos miRNAs está organizada por ordem alfabética

| miRNA | Sangue Venoso | | | | Líquido Sinovial | | | |
|------------------------|------------------------------------|-------------|--------------------|------------|------------------------------------|-------------|--------------------|------------|
| | Média e desvio padrão (\log_2) | | <i>fold change</i> | Valor de P | Média e desvio padrão (\log_2) | | <i>fold change</i> | Valor de P |
| | OA | CT | | | OA | CT | | |
| eca-miR-15a | 3,69 ± 0,03 | 0,59 ± 0,04 | 8,60 | 0,00000 | 2,98 ± 1,74 | 1,00 ± 0,06 | 3,95 | 0,04550 |
| eca-miR-15b | 3,09 ± 1,31 | 0,84 ± 0,23 | 4,77 | 0,00640 | 4,96 ± 2,74 | 1,16 ± 0,10 | 13,96 | 0,04800 |
| eca-miR-17 | 5,56 ± 2,66 | 1,52 ± 0,32 | 16,42 | 0,04480 | 3,83 ± 1,16 | 0,73 ± 0,03 | 8,62 | 0,00050 |
| eca-miR-18 | 2,30 ± 1,07 | 0,96 ± 0,14 | 2,54 | 0,02460 | 3,22 ± 1,55 | 1,36 ± 0,09 | 3,64 | 0,02780 |
| eca-miR-19b | 4,55 ± 0,04 | 0,58 ± 0,15 | 15,64 | 0,00000 | 5,23 ± 3,23 | 0,70 ± 0,16 | 23,13 | 0,03350 |
| eca-miR-20a | 4,75 ± 2,03 | 1,69 ± 0,24 | 8,36 | 0,04670 | 3,67 ± 1,54 | 0,72 ± 0,15 | 7,69 | 0,02280 |
| eca-miR-106a | 5,56 ± 2,66 | 1,52 ± 0,32 | 16,42 | 0,04480 | 3,83 ± 1,16 | 0,73 ± 0,03 | 8,62 | 0,00050 |
| eca-miR-106b | 5,58 ± 0,56 | 0,63 ± 0,10 | 31,03 | 0,00000 | 6,00 ± 2,55 | 1,18 ± 0,11 | 28,34 | 0,02370 |
| eca-miR-191 | 6,83 ± 1,61 | 1,05 ± 0,14 | 54,93 | 0,00020 | 7,44 ± 3,32 | 1,50 ± 0,24 | 61,36 | 0,03550 |
| eca-miR-361-5p | 2,44 ± 0,98 | 1,09 ± 0,18 | 2,55 | 0,02836 | 2,80 ± 1,12 | 1,48 ± 0,26 | 2,48 | 0,03030 |
| eca-miR-450b-5p | 3,51 ± 0,69 | 1,99 ± 0,47 | 2,87 | 0,00860 | 3,30 ± 0,26 | 0,92 ± 0,36 | 5,23 | 0,00001 |
| eca-miR-451 | 7,60 ± 0,34 | 1,12 ± 0,16 | 89,31 | 0,00000 | 9,14 ± 3,42 | 2,04 ± 0,09 | 136,93 | 0,01190 |

Fonte: Elaboração da própria autora.

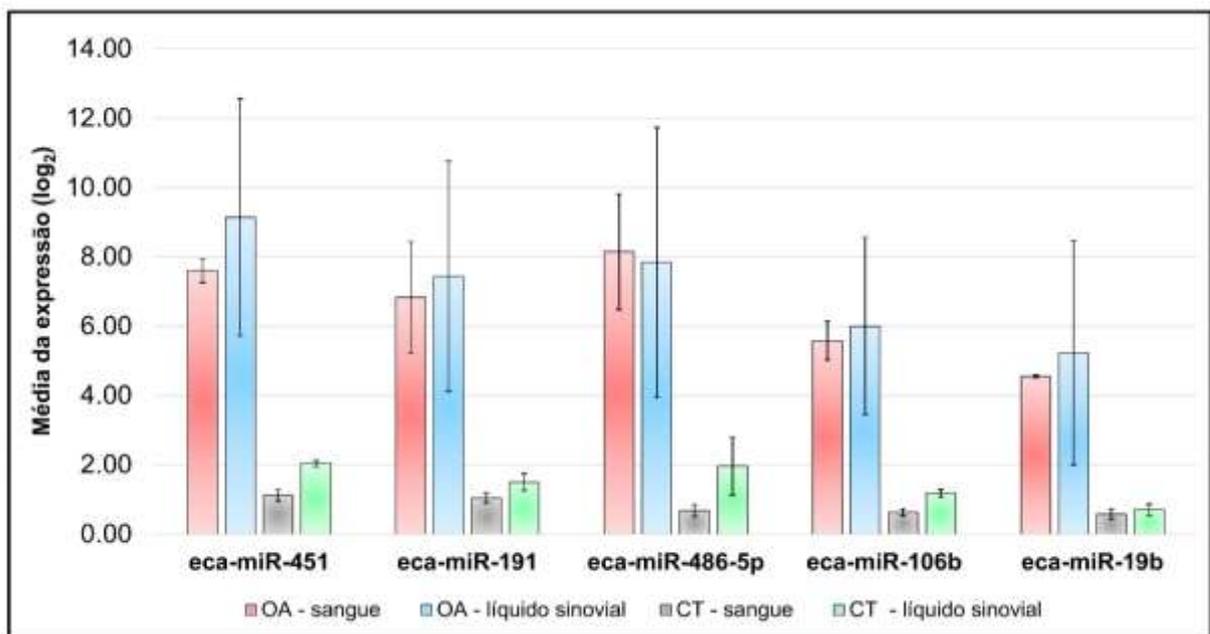
6.4 Depósito de patente - painel de biomarcadores

A partir dos resultados apresentados, desenvolveu-se um painel com identificação de cinco miRNAs mais representativos (maiores valores de *fold change*), ao correlacionar-se os miRNAs diferencialmente expressos nas amostras de SV e no LS dos equinos.

Verificou-se que a expressão aumentada do eca-miR-451, eca-miR-191, eca-miR-486-5p, eca-miR-106b, e do eca-miR-19b corresponde ao diagnóstico precoce de equinos com OA tibiotársica. A Figura 18 ilustra graficamente os valores médios de expressão (\log_2) e desvio-padrão dos cinco miRNAs do painel, de acordo com os grupos e tipo de amostra biológica.

O painel apresentado foi considerado uma invenção e foi solicitada a patente intitulada “Painel de microRNAs circulantes para detecção precoce de OA tibiotársica em equinos e uso”, que se refere a um painel de cinco miRNAs 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 OA tibiotársica em equinos de maneira não-invasiva e sistêmica, a partir de amostras de SV equino.

Figura 18 - Gráfico de barras exibindo a média da expressão (\log_2) e desvio-padrão dos miRNAs, de acordo com o Grupo Controle (CT) e Osteoartrite (OA), e o tipo amostra biológica, sangue venoso e líquido sinovial



Fonte: Elaboração da própria autora.

A comunicação de invenção foi submetida à Agência Unesp de Inovação – AUIN (Código 21CI079), e posteriormente foi realizado o pedido de depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI (Código INPI: BR 10 2021 024802 5), cujo titular é a “Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho” e os inventores: Daniela Scantamburlo Denadai, Juliana Regina Peiró, Alexandre Lima Andrade, Flávia de Almeida Lucas, Flávia Lombardi Lopes, Francisco Leydson Formiga Feitosa, Leonardo Aparecido Teixeira Bentin e Luiz Claudio Nogueira Mendes (ANEXO B).

A tecnologia está livre para ser divulgada e publicada, sendo seus direitos resguardados pelo depósito de patente realizado. A tecnologia também está apta a ser licenciada e transferida a parceiros e o suporte nas atividades de comercialização e parceria será prestado pelo setor de Transferência de Tecnologia da AUIN.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo é pioneiro ao mencionar o eca-miR-15a, eca-miR-15b, eca-miR-17, eca-miR-18a, eca-miR-19b, eca-miR-20a, eca-miR-106a, eca-miR-106b, eca-miR-191, eca-miR-361-5p, eca-miR-450b-5p, eca-miR-451 e eca-miR-486-5p como biomarcadores para OA em equinos, visto que não foram encontrados artigos relacionando-os com esta enfermidade.

Não foram encontradas patentes que descrevem o uso do painel com os miRNAs apresentados (eca-miR-451, eca-miR-191, eca-miR-486-5p, eca-miR-106b, e eca-miR-19b) identificados no SV equino, para o diagnóstico precoce de distúrbios articulares nesta espécie.

Visto que os miRNAs são bem conservados em mamíferos, e podem ter homólogos em espécies distantes, sugerindo que as funções dos miRNAs também podem ser conservadas ao longo da evolução das linhagens animais (BEREZIKOV, 2011), utilizaram-se artigos publicados em espécies com genomas melhor anotados, como humanos, camundongos e ratos para realizar essa discussão.

Por meio de mediadores inflamatórios, a lesão biomecânica e o estresse oxidativo comprometem a viabilidade dos condrócitos, reprogramando-os para diferenciação hipertrófica e respostas pró-inflamatórias e pró-catabólicas articulares (LIU-BRIAN; TERKELTAUB, 2015).

Na cartilagem do joelho de humanos com OA em comparação com a cartilagem normal, a expressão de miR-20 estava significativamente aumentada enquanto a expressão do gene ATG10 (*autophagy related 10*) significativamente diminuída. Foi demonstrado em células de condrócitos que o gene ATG10 foi regulado negativamente pelo miR-20. Em células de condrócitos transfectados com IL(interleucina)-1 β (IL-1 β) houve aumento da expressão do miR-20, e quando utilizado um inibidor de miR-20, houve aumento das concentrações das citocinas IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante da cultura de células (HE; CHENG, 2018).

A atuação do miR-20 é favorável para reduzir a síntese de fatores pró-inflamatórios e a liberação de fatores anti-inflamatórios, por suprimir as ações do gene ATG10 na via de sinalização PI3K/AKT/mTO. O papel dessa via de sinalização está relacionado com a degradação da cartilagem, disfunção óssea subcondral e inflamação sinovial (SUN et al., 2020).

Através de um modelo de OA *in vivo* em ratos por transecção do ligamento cruzado anterior (ACLT), verificou-se aumento da expressão do miR-20a nos tecidos cartilagosos em comparação aos tecidos normais. Utilizando um inibidor de miR-20a em ratos com OA, foi observado aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como apoptose celular. Por meio de um ensaio de luciferase, verificou-se que a expressão do gene I κ B β (inibidor de NF-kappa-B beta) foi impedida pelo direcionamento do miR-20a à sua região 3'-UTR pelo miR-20a (ZHAO; GONG, 2019).

A via de sinalização NF- κ B é uma via catabólica nas articulações com OA. A regulação da ativação desta via é importante, pois desencadeia a expressão de vários genes que estão implicados na destruição da cartilagem, inflamação da membrana sinovial e aumento da reabsorção óssea subcondral (RIGOGLOU; PAPAVALASSILOU, 2013). Deste modo, a presença do eca-miR-20a regulado positivamente no SV e LS no presente estudo, é oportuna, visto a atuação benéfica deste miRNA para modular a inflamação na OA.

Outra ação vantajosa na redução da inflamação na OA é a regulação positiva do eca-miR-18a no SV e LS do presente estudo, visto que já foi relatado que o miR-18a-3p possui atuação na inibição da secreção de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-6 e PGE2) em condrócitos de ratos, além de melhorar a remodelação da matriz da cartilagem (aumento dos níveis de proteína de metaloproteinases de matriz - MMP2, MMP3 e MMP9), devido à supressão do gene PDP1 (subunidade catalítica de piruvato desidrogenase fosfatase 1). *In vivo*, a superexpressão de miR-18a-3p também suprimiu a progressão da OA em ratos (FENG et al., 2022).

A expressão do miR-106a-5p é regulada negativamente em humanos com OA, acompanhada por regulação negativa do gene PAX5 (*paired box 5*) e regulação positiva do gene GLIS3 (*GLIS family zinc finger 3*). O eixo PAX5/miR-106a-5p/GLIS3 atua como um novo regulador pleiotrópico na proteção da cartilagem OA mediada por criptotansinona (um agente anti-inflamatório na OA). Sugere-se que a ativação de miR-106a-5p e inibição de GLIS3 pode ser uma estratégia para atenuar a OA (JI et al., 2018). Na cartilagem articular (platô tibial medial) de ratas, houve diminuição da expressão do miR-106a apenas no grupo OA e aumento significativo da expressão de mediadores inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF- β). Além disso, foi verificado que o miR-106a pode reduzir as alterações inflamatórias e a degeneração de condrócitos (CUI et al., 2021).

Resultados distintos foram encontrados no presente estudo, visto que o eca-miR-106a e eca-miR-106b estavam regulados positivamente no LS e SV dos equinos. Todavia, sustenta-se a atuação na redução da inflamação articular.

Ressalta-se que todos os três animais utilizados para compor o grupo OA apresentavam sinais radiográficos e ultrassonográficos de lesões na cartilagem e osso subcondral, sem sinais de claudicação ou dor na articulação tibiotársica, o que poderia ser atribuído à atuação do miR-18a, do eca-miR-20a e do eca-miR-106b na modulação da inflamação articular nos estágios iniciais da OA, antes dos sinais clínicos.

A angiogênese osteocondral é caracterizada pelo aumento da proliferação de células endoteliais e densidade vascular na cartilagem articular não calcificada na OA, sendo associada à substituição da medula óssea subcondral por tecido fibrovascular (WALSH et al., 2010). A angiogênese osteocondral está associada à gravidade das alterações da cartilagem OA, visto que a densidade vascular osteocondral aumenta com a progressão da gravidade da lesão (WALSH et al., 2007).

Foi previsto em humanos que o mir-15b é um regulador do gene angiogênico VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (HUA et al., 2006). Durante os estágios mais avançados da OA em humanos afetados, a expressão de VEGF foi aumentada na cartilagem articular, sinóvia, líquido sinovial e osso subcondral. Há correlação do gene VEGF com a progressão da OA humana, através de seus receptores cognatos (VEGFR-1 e VEGFR-2) e angiogênese (HAMILTON et al., 2016). Adicionalmente, há correlação significativa entre a expressão de VEGF no líquido sinovial do joelho de humanos com OA, em relação ao grau de dor (GABALLAH et al., 2016).

Reforçando os achados do presente estudo, sugere-se que eca-miR-15b, regulado positivamente no SV e LS, atuou de modo vantajoso no bloqueio da sinalização do gene VEGF e conseqüentemente na redução da angiogênese e dor associada à OA, pois os animais estavam em treinamento e participando de competições, sem alterar seu desempenho atlético, e sem manifestar sinais de OA clínica.

Um dos principais componentes da matriz extracelular da cartilagem é o agrecano, um proteoglicano que confere resistência à compressão ao tecido. A degradação do agrecano mediada pela agrecanase é um evento significativo na OA em estágio inicial, cuja contribuição das proteinases ADAMTS 4 e 5 (desintegrina e

metaloproteinase de trombospodina) para a destruição da cartilagem durante a OA não foi bem elucidada (VERMA; DALAI, 2021).

Em humanos, a expressão do homólogo hsa-miR-15a foi regulada negativamente nos condrócitos com OA em comparação com os condrócitos normais, mas a expressão de ADAMTS-5 foi regulada positivamente nos condrócitos com OA, visto que foi confirmado que o sítio de ligação de hsa-miR-15a estava na região 3'-UTR não traduzida do gene ADAMTS-5. A regulação negativa de hsa-miR-15a resultou em uma produção total de colágeno significativamente menor, e a atividade da colagenase foi marcadamente maior (LU et al., 2016).

Corroborando com os achados do presente estudo, em que o eca-miR-15a estava positivamente regulado no SV e LS, sugere-se o efeito benéfico do miR-15a, através de seus efeitos protetores contra a OA, por suprimir a expressão de ADAMTS-5, cuja função tem papel na degradação da matriz extracelular e atividade proteolítica em relação aos proteoglicanos de sulfato de condroitina (GENECARDS, 2022).

O eca-miR-191 (regulado positivamente no SV e LS no presente estudo) é um dos 10 miRNAs mais expressos em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de equinos (PARKINSON et al., 2017). Em humanos, o hsa-miR-191-3p teve expressão aumentada no plasma de paciente com OA precoce de joelho, quando comparado ao grupo de OA avançada (ALI et al., 2020). Na cartilagem embrionária humana do dia 54 a 56 da gestação, o miR-191 está entre os 30 principais miRNAs mais abundantemente expressos em condrócitos (MCALINDEN, et al., 2013).

O presente estudo também demonstrou a regulação positiva tanto circulante (SV) quanto no LS do eca-miR-191 na OA precoce, semelhante àquela descrita em humanos com OA precoce em joelho (ALI et al., 2020). Sugere-se a importância do eca-miR-191 na proliferação e diferenciação das células condrogênicas. Todavia, ainda não há relatos sobre a atuação e potenciais genes-alvo ou fisiopatogenia relacionada à OA para este miRNA.

A apoptose é um processo ativo e altamente regulado de morte celular envolvido no desenvolvimento, homeostase e envelhecimento articular. A desregulação da apoptose pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças degenerativas, como a OA, caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem articular. A apoptose ocorre na cartilagem osteoartrítica, porém não está claro se a apoptose de condrócitos é o indutor da degeneração da cartilagem ou um subproduto da destruição da mesma. A morte de condrócitos e a perda de matriz

podem formar um ciclo vicioso, com a progressão de uma agravando a outra, existindo uma correlação entre o grau de dano da cartilagem e a apoptose dos condrócitos (HWANG; KIM, 2015).

O miR-361-5p já foi identificado no soro de equinos saudáveis (PACHOLEWSKA et al., 2016). Em pacientes humanos, a expressão de miR-361-5p foi aumentada nos condrócitos da cartilagem humana do joelho com OA em comparação com o grupo normal, enquanto a expressão dos genes MEG3 (*Maternally Expressed 3*) foi significativamente diminuída na OA. A análise da expressão em tempo real (qRT-PCR) do miR-361-5p revelou que este foi regulado positivamente após regulação negativa da expressão do gene MEG3, que contribui para a proliferação celular e inibir a apoptose celular e degradação da MEC (WANG et al., 2019).

Dessa forma, a expressão do eca-miR-361-5p, regulada positivamente no SV e LS no presente estudo, pode estar vinculada à contribuição para a proliferação celular e redução da apoptose de condrócitos.

A osteocondrose é o distúrbio do desenvolvimento mais prevalente em equinos, definido como um distúrbio focal da ossificação endocondral. A fisiopatologia exata ainda não é compreendida, visto que vias biológicas e mecanismos moleculares permanecem controversos. Porém, é geralmente aceito que fatores de risco genéticos e ambientais influenciam o desenvolvimento das lesões osteoarticulares (BARREY et al., 2016; DESJARDIN et al., 2014).

Os achados do presente estudo com OA diferem dos resultados obtidos por Desjardin et al. (2014), que utilizou amostras de cartilagem epifisária de potros (10 meses) anglo-árabes eutanasiados com osteocondrose na articulação fêmoro-tibio-patelar. Ao se comparar animais saudáveis e afetados por osteocondrose, foram encontrados miRNAs regulados negativamente, sendo estes: eca-miR-126-5p, eca-miR-135a-5p, eca-miR-451, eca-miR-486-3p e eca-miR-486-5p. O eca-miR-451 foi expresso diferentemente entre o estudo com OA tibiotársica e o de Desjardin et al. (2014) com osteocondrose, visto que há no presente estudo, regulação positiva no SV e LS. Esta diferença pode estar relacionada à diferença entre a fisiopatogenia das enfermidades (osteoartrite e osteocondrose), idade e/ou atividade atlética desenvolvida pelos animais do presente estudo, que ao participar de treinamentos e competições regulares, desenvolvem um mecanismo de proteção e reparo ao dano traumático nas estruturas ósteo-articulares.

Em condrócitos isolados de pacientes humanos, constatou-se que nível de lncRNA-p21 (RNA longo não codificante de proteína p21) foi positivamente regulado na cartilagem com OA, quando comparado à cartilagem normal. A superexpressão de lncRNA-p21 suprime a expressão de miR-451, enquanto o silenciamento de lncRNA-p21 reverte esse efeito. O aumento da viabilidade celular e a diminuição da taxa de apoptose em condrócitos, induzida pelo silenciamento de lncRNA-p21, foi abolida pelo inibidor de miR-451 (TANG et al., 2018).

Sugere-se que a regulação positiva do eca-miR-451 e do eca-miR-361-5p, tanto no SV quanto no LS no presente estudo, atua na inibição da apoptose de condrócitos nos equinos com OA primária.

Em condrócitos humanos, o miR-17-5p e miR-19b-3p tem como alvo o gene EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), cujos sítios de ligação entre miR-17-5p ou miR-19b-3p e EZH2 foram previstos *in silico*. O EZH2 tem como função a apoptose induzida por IL-1 β (interleucina 1 beta) e a degradação da MEC em condrócitos. Experimentalmente, a inibição da progressão da OA pode ser induzida pela supressão do miR-17-5p ou miR-19b-3p, e diminuição da expressão de EZH2 (LI et al., 2020). *In vivo*, injeções intra-articulares do inibidor de EZH2 reduzem a degradação da cartilagem, melhoraram as funções motoras de camundongos OA, e retarda a progressão da OA, sugerindo que EZH2 pode ser um alvo eficaz para o tratamento da OA, reduzindo o catabolismo, inflamação e dor (ALLAS et al., 2020).

Em vista disso, a regulação positiva do eca-miR-17 e eca-miR-19b, no SV e LS do presente estudo, podem estar relacionados com a prevenção da progressão da OA, através da diminuição das taxas de apoptose e da degradação da MEC.

A autofagia na cartilagem articular adulta normal é um mecanismo importante para a homeostase celular, sendo indispensável na manutenção das atividades metabólicas das células expostas ao estresse deletério. Todavia, a desregulação da autofagia de condrócitos está envolvida na patogênese da OA (LIAN et al., 2018; SHAPIRO et al., 2013). Com a depleção dos condrócitos originais, visto que a perda de condrócitos é uma característica proeminente da OA, há o surgimento de aglomerados de células densamente compactadas, que são fenotipicamente distintas das células cartilaginosas originais. A autofagia celular exacerbada na cartilagem OA pode ser interpretada como uma tentativa malsucedida de reparo tecidual, contribuindo para as manifestações de dano na cartilagem à medida que a condição

progride, como degradação e calcificação da matriz extracelular (MEC) e inflamação articular (LOTZ et al., 2010).

Através de um modelo de ACLT em rato para o desenvolvimento de OA, foi verificado que injeções intra-articulares com o oligonucleotídeo antisense miR-128a estabilizaram a autofagia de condrócitos e retardaram a destruição do tecido articular, incluindo erosão da cartilagem, sinovite, formação de osteófitos, e danos na placa subcondral, ou seja, a interrupção da sinalização do miR-128a atenuou a disfunção dos condrócitos e atrasou o desenvolvimento da OA (LIAN et al., 2018).

Resultados distintos de ratos foram encontrados em humanos, reafirmando a importância da utilização dos equinos como modelo experimental para doenças articulares humanas. Foi demonstrado através de cartilagem coletada do joelho de humanos submetidos à artroplastia total, que o miR-128-3p é superexpresso em pacientes com OA e pode regular a atuação da atividade do gene ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*) em condrócitos. A superexpressão de miR-128-3p e silenciamento do gene ZEB1 atenuou a degradação da MEC e a apoptose celular, e aumentou a proliferação de células CHON-001 (linhagem celular de condrócitos humanos) ativadas por IL-1 β , suprimindo a degradação da cartilagem com OA (SUN et al., 2022).

No presente estudo, a expressão do eca-miR-128a apresentou-se positivamente regulada apenas no SV, demonstrando que não havia desregulação na autofagia intra-articular, visto a fase inicial da OA. O aumento da expressão sanguínea do eca-miR-128a pode estar relacionada à atividade esportiva desses equinos, que eram atletas da modalidade de Três Tambores. Utilizando um modelo de rato nadador crônico, constatou-se que após a natação, o nível de miR-128a aumentou significativamente no músculo extensor longo dos dedos. Sugere-se que além da adaptação metabólica, a natação regular até a exaustão também leva à adaptação ao estresse no músculo esquelético (GAÁL et al., 2021), visto que o miR-128a é o único miRNA que possui potencial para aumentar a massa muscular esquelética (HITACHI; TSUCHIDA, 2013).

Nesta pesquisa, não foi verificada expressão diferencial do eca-miR-140-3p, eca-miR-223, eca-miR-23b e eca-miR-103 quando comparados entre os grupos utilizando a amostra de LS, provavelmente pelos equinos do grupo OA apresentarem quadros iniciais de OA, com poucos danos à cartilagem articular, e sem dor/clauidicação. Todavia, esses miRNAs foram regulados positivamente no SV, o que

pode estar relacionado com a atividade atlética desempenhada, como ganho de massa muscular.

O eca-miR-140 é um importante miRNA específico de cartilagem, sendo altamente expresso na cartilagem articular equina normal (BUECHLI et al., 2013), regulando o desenvolvimento e a homeostase da cartilagem (MIYAKI et al., 2010). Em camundongos, a deleção do miR-140 leva à degradação prematura da cartilagem articular e aumento da suscetibilidade à osteoartrite pós-traumática (SWINGLER et al., 2019).

Em humanos, a expressão de miRNA-140 no LS de joelhos normais e joelhos com OA, foi regulada negativamente no líquido sinovial do grupo OA em comparação com o grupo normal. Existe uma correlação inversa significativa entre a expressão do miR-140 e a gravidade da doença na OA, ou seja, o aumento da gravidade da OA foi associado a uma expressão diminuída de miR-140-3p ou miR-140-5p (YIN et al., 2017).

Uma análise *in silico* revelou o IGF1 (receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1) como genes-alvo para o hsa-miR-140 (NTOUMOU et al., 2017). O IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) regula o reparo da cartilagem humana, promovendo o anabolismo da cartilagem (síntese de proteoglicanos dos condrócitos) e inibindo o catabolismo da cartilagem, para manter uma matriz cartilaginosa funcional (VERSCHURE et al., 1996; WEN et al., 2021). A deficiência do IGF-1 pode contribuir para a falta de resposta de cicatrização após a lesão da cartilagem articular e desempenhar um papel na fisiopatologia da OA (DENKO et al., 1994).

O sequenciamento de amostras de LS da articulação metacarpofalângica de cavalos saudáveis em comparação com equinos com OA precoce, coletadas em um frigorífico, demonstrou que alguns miRNA estavam diferencialmente regulados, cuja análise de vias, utilizando o aplicativo “*Ingenuity Pathway Analysis*” (IPA), revelou ações celulares relacionadas à apoptose, necrose, autofagia e inflamação. Foi verificado que o miR-223 foi regulado negativamente, e o miR-23b foi regulado positivamente (CASTANHEIRA et al., 2021).

Esses resultados divergem do presente estudo, que utilizou LS de articulações tibiotársicas, onde não foi observada expressão diferencialmente expressa do eca-miR-223 e eca-miR-23b no LS, apenas no SV, o que pode ser explicado pela diferença entre os aspectos anatômicos e biomecânicos das articulações (metacarpofalângica

e tibiotársica), raça, assim como o tipo de exercício/função que os equinos desempenhavam.

Utilizando células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMSCs) isoladas de ratos e cultivadas em meio condrogênico para estimular a diferenciação de condrócitos, verificou-se que a expressão de miR-223 foi maior em BMSCs condrogênicas diferenciadas do que as normais, promovendo a diferenciação da cartilagem. O efeito protetor do miR-223 também está relacionado com a supressão do gene NLRP-3 (domínio pirina 3 da família NLR) no tecido cartilaginoso de ratos com OA, através da indução da OA por meio da ACLT (MIN et al., 2020). NLRP-3 atua na produção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas degradativas, como IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e metaloproteinase-3 da matriz (MMP-3), que conduzem a degeneração da cartilagem e inflamação sinovial (MCALLISTER et al., 2018).

Os níveis de miR-23b-3p foram regulados positivamente, enquanto as expressões de colágeno II e agrecano foram diminuídas em tecidos OA e em células CHON-001 (linhagem de condrócitos humanos) tratadas com IL-1 β . *In vitro*, a superexpressão de miR-23b-3p diminuiu acentuadamente o nível de COL11A2 (colágeno 11 alfa II) nas células. *In vivo*, a regulação negativa do miR-23b-3p alivia a sinovite e a destruição da cartilagem. A regulação negativa de miR-23b-3p poderia aliviar a progressão da OA através da regulação positiva de COL11A2 (relação inversamente proporcional) (YANG et al., 2019).

A expressão diferencial do eca-miR-223 e eca-miR-23b, positivamente regulados apenas no SV do presente estudo, sugere estar relacionada com a baixa gravidade das lesões osteoartríticas dos animais do grupo, não havendo degradação das estruturas articulares mediadas por miR-23b, e não necessitando do efeito protetor do miR-223. Investigações adicionais são necessárias para determinar o papel desses miRNAs circulantes, provavelmente relacionados à rotina atlética desses equinos.

Em condrócitos osteoartríticos humanos, o miR-103 inibiu a proliferação de condrócitos e a formação e maturação de condrócitos. A inibição de miR-103 suprimiu a produção de fatores catabólicos e citocinas pró-inflamatórias nos condrócitos com OA. Constatou-se que o miR-103 contribuiu para o desenvolvimento da osteoartrite ao direcionar e inibir diretamente a expressão de SOX6 (fator de transcrição 6) (CHEN; WU, 2019). SOX5, SOX6 são co-expressas durante a

diferenciação condrogênica e, em cooperação com SOX9, ativam a transcrição de colágeno tipo II e agrecano (HAAG et al., 2008).

Outro estudo sugere que o miRNA-103 contribui para a apoptose dos condrócitos, promovendo a progressão da OA pela regulação negativa da via de sinalização PI3K/AKT (citada anteriormente no miR-20), através da redução da atividade de SPHK1 (esfingosina quinase 1) (LI et al., 2019), visto que estimula eventos catabólicos na degradação da cartilagem mediada por IL-1 β (MINASHIMA et al., 2014).

No presente estudo, a ausência de expressão diferencial do eca-miR-103 no LS pode estar atribuída às lesões articulares leves dos equinos com a OA, com baixa degeneração da MEC e apoptose de condrócitos. Todavia torna-se necessário a verificação do papel desse miRNA circulante em equinos, visto que a expressão deste estava positivamente regulada no SV do presente estudo. Wardle et al. (2015), utilizando éguas de enduro em duas modalidades de treinamento, verificaram que não há relação do eca-miR-103 com o volume muscular ou reservas de gordura. Todavia, são esportes distintos, visto que o enduro é uma prova de longa duração e baixa/moderada intensidade, e a prova de Três Tambores é um exercício de curta duração e alta intensidade, com predominância de metabolismo anaeróbio.

O eca-miR-486-5p é um dos 10 miRNAs plasmáticos mais abundantes no cavalo (LEE et al., 2016), e o homólogo humano hsa-miR-486 é o segundo miRNA mais abundante no plasma humano, sendo bem conservado no plasma de mamíferos (WILLIAMS et al., 2013). Dentre os 10 miRNAs mais abundantes no plasma de voluntários humanos (miR-451, miR-486, miR-92a, miR-16, let-7b, miR-21, miR-19b, miR-25, miR-22 e miR-144) (WILLIAMS et al., 2013), dois miRNAs homólogos equinos foram identificados no presente estudo: eca-miR-19b (regulado positivamente no SV e LS) eca-miR-486-5p (regulado positivamente no SV) (MIRBASE, 2022).

Em humanos com OA, a expressão de miR-486 foi significativamente aumentada na cartilagem de joelho (SHI et al., 2018), côndilos femorais e platôs tibiais (YAN et al., 2021). A superexpressão de miR-486 promoveu um fenótipo catabólico em células SW1353 (linha celular de osteocondroma humano), supra-regulando as expressões dos genes ADAMTS4 (desintegrina e metaloproteinase de trombospondina 4) e MMP-13 (metaloproteinase-13 da matriz), e inibiu significativamente a expressão de SIRT6 (Sirtuin 6) (YANG et al., 2021), que tem um papel protetor na degeneração da cartilagem, suprimindo a senescência celular e as

respostas inflamatórias (WU et al., 2015). O tratamento com mimetizadores de miR-486 inibiu os níveis de expressão dos genes COL2A1 (Colágeno tipo II alfa 1) e ACAN (agrecano) (SHI et al., 2018).

Apesar do eca-miR-486-5p não ter sido identificado na intersecção dos miRNAs diferencialmente expressos do SV e LS, nossos dados sugerem que sua expressão também foi considerada importante, atuando como um biomarcador sistêmico para OA tibiotársica. Embora seu valor de *fold change* seja alto no SV, sem ter sido diferencialmente expresso no LS, este fato poderia ser explicado pelo baixo número de animais preconizados em estudos de microarranjo, cujos resultados podem ter sofrido influência de um dos cavalos com OA assintomática que apresentou menor valor em relação aos outros dois. Isto poderia ser indicativo de que este animal estaria em um estágio mais leve de OA em relação aos outros dois, cuja expressão do eca-miR-486-5p ainda era menor provavelmente devido à discreta degradação das estruturas articulares.

Com base nesses resultados, reitera-se a abordagem promissora do eca-miR-486 como biomarcador circulante para OA em equinos, visto sua atuação nociva na articulação, através da degradação articular na OA. Acredita-se que o aumento da expressão deste miRNA pode ser diretamente proporcional ao estágio da OA, ou seja, maior a expressão em quadros avançados de OA.

Alguns miRNAs diferencialmente expressos neste estudo também foram relatados em outras pesquisas (CAPPELLI et al., 2021; GIM et al., 2014; OLIVEIRA JR et al., 2021), relacionando-os com a atividade atlética (mir-15b, miR-17, miR-18a, mir-20a, miR-106b, mir-451 e miR-486-5p), o que desperta o interesse na correlação desses com a fisiologia do exercício e fisiopatogenia da OA. Ressalta-se que todos os equinos utilizados no presente estudo são atletas ativos, em treinamento e realizando competições para na modalidade de Três Tambores. Adicionalmente, nenhum animal apresentava qualquer tipo de sinal clínico de enfermidade ou claudicação.

A expressão do miR-17 foi regulada positivamente, e os genes LDHA (lactato desidrogenase) e GYS1 (glicogênio sintase 1) foram regulados negativamente no sangue de cavalos Puro Sangue Inglês após o exercício (30 minutos de trote), indicando envolvimento na via do metabolismo da glicose. Foi verificado que o miR-17 inibe a expressão de LDHA e GYS1 através da ligação na região 3' UTR de cada gene (GIM et al., 2014). Esses achados fornecem uma base para uma investigação

mais aprofundada do metabolismo do exercício de cavalos de corrida, e também nos equinos Quarto de Milha do presente estudo.

Ao se comparar amostras séricas de cavalos participantes de competições de enduro, considerados modelos para testar respostas metabólicas a esforços prolongados de intensidade moderada, observou-se a regulação positiva de quatro miRNAs circulantes em comum ao presente estudo (mir-15b, miR-18a, mir-20a, miR-106b e mir-451). Esses miRNAs estão envolvidos na modulação da miogênese, remodelação do músculo cardíaco e esquelético, angiogênese, contratilidade ventricular e na regulação da expressão gênica. São dados preliminares que proporcionam um novo cenário na definição de adaptações metabólicas para o estabelecimento de programas de treinamento eficientes (CAPPELLI et al., 2021).

Níveis crescentes de eca-miR-486-5p no plasma de cavalos árabes foram diferencialmente expressos durante e após uma corrida de competição de resistência (66 Km de distância) (OLIVEIRA JR et al., 2021). Esses resultados sugerem a atuação protetora deste miRNA durante o exercício de resistência de longa duração e baixa intensidade, e por estarem presentes em cavalos que participam da prova de Três tambores (curta duração e alta intensidade), deve desempenhar papel semelhante sobre os sistemas cardiovascular e musculoesquelético.

Com base nos artigos mencionados em diversas espécies (humanos, ratos e camundongos), sugere-se que os miRNAs indicados nesse estudo podem ser considerados como biomarcadores para osteoartrite tibiotársica em equinos Quarto de Milha, modulando diversos genes-alvos cujas vias metabólicas possuem papel fundamental na reparação e preservação da integridade das estruturas homeostase articulares. O presente trabalho fornece indicativos robustos para pesquisas futuras a fim de elucidar o papel dos miRNAs presentes no LS e SV de equinos, visto a escassez de material científico publicado nesta espécie até o momento.

8 CONCLUSÃO

Foram identificados miRNAs expressos no sangue venoso e no líquido sinovial da articulação tibiotársica de equinos Quarto de Milha atletas sadios e com osteoartrite tibiotársica primária traumática subclínica. A identificação aumentada da expressão dos miRNAs eca-miR-15a, eca-miR-15b, eca-miR-17, eca-miR-18a, eca-miR-19b, eca-miR-20a, eca-miR-106a, eca-miR-106b, eca-miR-191, eca-miR-361-5p, eca-miR-450b-5p, eca-miR-451 e eca-miR-486-5p podem ser utilizados como biomarcadores para detecção da osteoartrite tibiotársica primária traumática subclínica em equinos de maneira menos invasiva e sistêmica, a partir de amostras de sangue venoso, o que pode ser clinicamente aplicável na triagem de pacientes equinos predispostos a desenvolver a enfermidade pelo tipo de atividade (trabalho/esporte) a que se destinam.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. A.; GANDHI, R.; POTLA, P.; KESHAVARZI, S.; ESPIN-GARCIA, O.; SHESTOPALOFF, K.; PASTRELLO, C.; BETHUNE-WADDELL, D.; LIVELY, S.; PERRUCCIO, A. V.; RAMPERSAUD, Y. R.; VEILLETTE, C.; ROCKEL, J. S.; JURISICA, I.; APPLETON, C. T.; KAPOOR, M. Sequencing identifies a distinct signature of circulating microRNAs in early radiographic knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 28, n. 11, p. 1471-1481, nov. 2020. DOI: 10.1016/j.joca.2020.07.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458420310815>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- ALINI, M.; EISENSTEIN, S. M.; ITO, K.; LITTLE, C.; KETTLER, A.; MASUDA, K.; MELROSE, J.; RALPHS, J.; STOKES, I.; WILKE, H. J. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration. **European Spine Journal**, Heidelberg, v. 17, p. 2-9, 2008. DOI: 10.1007/s00586-007-0414-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17632738/>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ALLAS, L.; BROCHARD, S.; ROCHOUX, Q.; RIBET, J.; DUJARRIER, C.; VEYSSIERE, A.; LANDAS, J. A.; GRARD, O.; LECLERCQ, S.; VIVIEN, D.; EA, H.-K.; MAUBERT, E.; COHEN-SOLAL, M.; BOUMEDIENE, K.; AGIN, V.; BAUGÉ, C. EZH2 inhibition reduces cartilage loss and functional impairment related to osteoarthritis. **Scientific Reports**, Londres, v. 10, n. 19577, nov. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-76724-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-76724-9>. Acesso em: 12 fev. 2022.
- ALVES, A. L. G. Semiologia do sistema locomotor de equinos. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 448-476.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, Londres, v. 431, p. 350-355, set. 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature02871>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- AUER, J. A. Tarsus. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine surgery**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 1388-1408.
- BACCARIN, R. Y. A.; MORAES, A. P. L.; VEIGA, A. C. R.; FERNANDES, W. R.; AMAKU, M.; SILVA, L. C. L. C.; HAGEN, S. C. F. Relação entre exame clínico e radiográfico no diagnóstico da osteoartrite equina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 73-81, set. 2012. DOI: 10.11606/issn.2318-3659.v49i1p73-81. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/286420284_Relacao_entre_exame_clinico_e_radiografico_no_diagnostico_da_osteoartrite_equina. Acesso em: 20 jan. 2022.

BARREY, E.; RIVIÈRE, J.; MORGENTHALER, C.; ROSSIGNOL, F.; MESPOULHÈS-RIVIÈRE, C.; ROBERT, C. Differential expression of microRNAs in synovial fluid as biomarkers of osteochondrosis in equine hock joints. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 94, n. 4, p. 52-53, set. 2016. DOI: 10.2527/jas2016.94supplement452a

Disponível em: https://academic.oup.com/jas/article-abstract/94/suppl_4/52/4740954?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 12 fev. 2022.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 281-297, jan. 2004. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14744438/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, The Netherlands, v. 12, p. 846-860, nov. 2011. DOI: 10.1038/nrg3079. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg3079>. Acesso em: 19 fev. 2022.

BUECHLI, M. E.; LAMARRE, J.; KOCH, T. G. MicroRNA-140 expression during chondrogenic differentiation of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, v. 22, n. 8, p. 1288-1296, abr. 2013. DOI: 10.1089/scd.2012.0411. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23157248/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

BUZA, T.; ARICK, M.; WANG, H.; PETERSON, D. G. Computational prediction of disease microRNAs in domestic animals. **BMC Research Notes**, Londres, v. 7, n. 403, p. 1-13, jun. 2014. Disponível em: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-403>. Acesso em: 20 jan. 2022.

CADBY, J. A.; DAVID, F.; VAN DE LEST, C.; BOSCH, G.; VAN WEEREN, P. R.; SNEDEKER, J. G.; VAN SCHIE, H. T. M. Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 45, p. 642-648, set. 2013. DOI: 10.1111/evj.12035. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23448172/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

CAPPELLI, K.; MECOCCHI, S.; CAPOMACCIO, S.; BECCATI, F.; PALUMBO, A. R.; TOGNOLONI, A.; PEPE, M.; CHIARADIA, E. Circulating transcriptional profile modulation in response to metabolic unbalance due to long-term exercise in equine athletes: a pilot study. **Genes**, Basel, v. 12, n. 12, p. 1-12, dez. 2021. DOI: 10.3390/genes12121965. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34946914/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

CASTANHEIRA, C.; BALASKAS, P.; FALLS, C.; ASHRAF-KHARAZ, Y.; CLEGG, P.; BURKE, K.; FANG, Y.; DYER, P.; WELTING, T. J. M.; PEFFERS, M. J. Equine synovial fluid small non-coding RNA signatures in early osteoarthritis. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 17, n. 1, p. 1-12, jan. 2021. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02707-7>. Acesso em: 20 jan. 2022.

CHEN, J.; WU, X. MicroRNA-103 contributes to osteoarthritis development by targeting Sox6. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 118, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109186. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219324163>. Acesso em: 10 fev. 2022.

COPPELMAN, E. B.; DAVID, F. H.; TOTH, F.; ERNST, N. S.; TRUMBLE, T. N. The association between collagen and bone biomarkers and radiographic osteoarthritis in the distal tarsal joints of horses. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 52, n. 3, p. 391-398, maio 2020. DOI: 10.1111/evj.13187. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31596508/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

CORTEZ, M. A.; BUESO-RAMOS, C.; FERDIN, J.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K.; CALIN, G. A. MicroRNAs in body fluids the mix of hormones and biomarkers. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Londres, v. 8, n. 8, p. 467-477, 2011. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.76. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21647195/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

CUI, L.; HAN, Y.; FANG, L.; LIU, X.; ZHANG, C.; LI, R.; WANG, J. Effect of miR-106a mimics on osteoarthritis in rats. **Chinese Journal of Rheumatology**, Taiyuan, v. 12, p. 167-170, 2021. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/wpr-884384>. Acesso em: 13 fev. 2022.

D'ADAMO, S.; CETRULLO, S.; MINGUZZI, M.; SILVESTRI, Y.; BORZI, R. M.; FLAMIGNI, F. Review article: microRNAs and autophagy: fine players in the control of chondrocyte homeostatic activities in osteoarthritis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Londres, article ID 3720128, p. 1-16, jun. 2017. DOI: 10.1155/2017/3720128. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5497632/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

DENKO, C. W.; BOJA, B.; MOSKOWITZ, R. W. Growth promoting peptides in osteoarthritis and diffuse idiopathic skeletal hyperostosis - insulin, insulin-like growth Factor-I, growth hormone. **Journal of Rheumatology**, v. 21, n. 9, p. 1725-1730, 1994.

DESJARDIN, C.; VAIMAN, A.; MATA, X.; LEGENDRE, R.; LAUBIER, J.; KENNEDY, S.P.; LALOE, D.; BARREY, E.; JACQUES, C.; CRIBIU, E.P.; SCHIBLER, L. Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology. **BMC Genomics**, Londres, v. 15, n. 798, p. 1-11, set. 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-798. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265792017_Next-generation_sequencing_identifies_equine_cartilage_and_subchondral_bone_miRNAs_and_suggests_their_involvement_in_osteochondrosis_physiopathology. Acesso em: 20 jan. 2022.

Di FILIPPO, P. A.; MEIRELES, M. A. D.; RIBEIRO, L. M. F.; de LANNES, S. T.; MEIRELES, N. F. T.; 2, VIANA, I. S.; HOKAMURA, H. K. Influence of exercise, age, body weight, and growth on the development of tarsal osteoarthritis in young mangalarga marchador horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, Philadelphia, v. 80, p. 36-39, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.06.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080618306683>. Acesso em: 26 jan. 2022.

DOUGHERTY, E. R. Small sample issues for microarray-based classification. **Comparative and Functional Genomics**, New York, v. 2, p. 28-34, fev. 2001. DOI: 10.1002/cfg.62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2447190/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

FENG, X.; LU, J.; WU, Y.; XU, H. MiR-18a-3p improves cartilage matrix remodeling and inhibits inflammation in osteoarthritis by suppressing PDP1. **The Journal of Physiological Sciences**, Tokyo, v. 72, n. 3, p. 1-10, fev. 2022. DOI: 10.1186/s12576-022-00827-3. Disponível em: <https://jps.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12576-022-00827-3>. Acesso em: 12 fev. 2022.

FRISBIE, D. D. Synovial joint biology and pathobiology. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine surgery**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 1096-1113.

FRISBIE, D. D.; AL-SOBAYIL, F.; BILLINGHURST, R. C.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 10, p. 1196-204, 2008. DOI: 10.1016/j.joca.2008.03.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18442931/#:~:text=Results%3A%20Exercise%20induced%20a%20significant,osteocalcin%20and%20Col%20I%20concentrations.&text=For%20each%20of%20these%20biomarkers,compared%20to%20exercise%20Dalong%20horses>. Acesso em: 26 jan. 2022.

GAÁL, Z.; FODOR, J.; OLÁH, A.; RADOVITS, T.; MERKELY, B.; MAGYAR, J.; CSERNOCH, L. Evaluation of muscle-specific and metabolism regulating microRNAs in a chronic swimming rat model. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Dordrecht, dez. 2021. DOI: 10.1007/s10974-021-09612-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10974-021-09612-y>. Acesso em: 12 fev. 2022.

GABALLAH, A.; HUSSEIN, N. A.; RISK, M.; ELSAWY, N.; ELBASIRY, S. Correlation between synovial vascular endothelial growth factor, clinical, functional and radiological manifestations in knee osteoarthritis. **The Egyptian Rheumatologist**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 29-34, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.ejr.2015.01.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110116415000241>. Acesso em: 12 fev. 2022.

GENECARDS. **The human gene database**. Rehovot: Weizmann Institute of Science, 2022. Disponível em: <https://www.genecards.org/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

GIACHETTO, P. F. **A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2010. 35 p. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/885253/1/doc111.pdf>.

Acesso em: 26 jan. 2022.

GIM, J. A.; AYARPADIKANNAN, S.; EO, J.; KWON, Y. J.; CHOI, Y.; LEE, H. K.; PARK, K. D.; YANG, Y. M.; CHO, B. W.; KIM, H. S. Transcriptional expression changes of glucose metabolism genes after exercise in thoroughbred horses. **Gene**, Amsterdam, v. 547, n. 1, p. 152-158, ago. 2014. DOI: 10.1016/j.gene.2014.06.051.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24971503/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

GIT, A.; DVINGE, H.; SALMON-DIVON, M.; OSBORNE, M.; KUTTER, K.; HADFIELD, J.; BERTONE, P.; CALDAS, C. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. **RNA**, New York, v. 16, p. 991-1006, maio 2010.

DOI: 10.1261/rna.1947110. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20360395/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

HAAG, J.; GEBHARD, P. M.; AIGNER, T. SOX Gene expression in human osteoarthritic cartilage. **Pathobiology**, Leipzig, v. 175, p. 175-199, jan. 2008. DOI: 10.1159/000124980. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Pdf/124980>.

Acesso em: 12 fev. 2022.

HAMILTON, J. L.; NAGAO, M.; LEVINE, B. R.; CHEN, D.; OLSEN, B. R.; IM, H.-J. Targeting VEGF and its receptors for the treatment of osteoarthritis and associated pain. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 31, n. 5, p. 911-924, mar. 2016. DOI: <https://DOI.org/10.1002/jbmr.2828>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27163679/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HE, W.; CHENG, Y. Inhibition of miR-20 promotes proliferation and autophagy in articular chondrocytes by PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 97, p. 607-615, jan. 2018. DOI:

10.1016/j.biopha.2017.10.152. Disponível em: Acesso em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217343214?via%3Dihub>. 10 fev. 2022.

HEIDARI, M.; JOHNSTONE, D. M.; BASSETT, B.; GRAHAM, R. M.; CHUA, A. C. G.; HOUSE, M. J.; COLLINGWOOD, J. F.; BETTENCOURT, C.; HOULDEN, H.; RYTEN, M.; TRINDER, D.; MILWARD, E. A. Brain iron accumulation affects myelin-related molecular systems implicated in a rare neurogenetic disease family with neuropsychiatric features. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 21, p. 1599-1607, nov. 2016. DOI: 10.1038/mp.2015.192. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26728570/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

HERMANN, S.; BUSCHMANN, D.; KIRCHNER, B.; BORRMANN, M.; BRANDES, F.; KOTSCHOTEC, S.; BONINC, M.; LINDEMANN, A.; REITHMAIR, M.; SCHELLING, G.; PFAFFL, M. W. Transcriptomic profiling of cell-free and vesicular microRNAs from matched arterial and venous sera. **Journal of Extracellular Vesicles**, Hoboken, v. 8, n. 1, p. 1670935, set. 2019. DOI: 10.1080/20013078.2019.1670935. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31632620/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

HITACHI, K.; TSUCHIDA, K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. **Frontiers Physiology**, Lausanne, v. 4, n. 408, p. 1-7, jan. 2014. DOI: 10.3389/fphys.2013.00408. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893574/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

HOLLIS, A. R.; STARKEY, M. P. MicroRNAs in equine veterinary science. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 50, n. 6, p. 721-726, nov. 2018. DOI: 10.1111/evj.12954. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29672919/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

HUA, Z.; LV, Q.; YE, W.; WONG, C-K. A.; CAI, G.; GU, D.; JU, Y.; ZHAO, C.; WANG, J.; YANG, B. B.; ZHANG, Y. MiRNA-Directed Regulation of VEGF and Other Angiogenic Factors under Hypoxia. **PLoS One**, San Francisco, v. 1, n. 1, dez. 2006. DOI: 10.1371/journal.pone.0000116. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762435/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HUANG, N. C.; YANG, T. S.; BUSA, P.; LIN, C. L.; FANG, Y. C.; CHEN, I. J.; WONG, C. S. Detection and evaluation of serological biomarkers to predict osteoarthritis in anterior cruciate ligament transection combined medial meniscectomy rat model. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 22, n. 19, p. 1-12, ago. 2021. DOI: <https://DOI.org/10.3390/ijms221910179>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10179>. Acesso em: 26 jan. 2022.

HWANG, H. S.; KIM, H. A. chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 11, p. 26035-26054, out. 2015. DOI: 10.3390/ijms161125943. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/11/25943>. Acesso em: 12 fev. 2022.

JI, Q.; QI, D.; XU, X.; XU, Y.; GOODMAN, S. B.; KANG, L.; SONG, Q.; FAN, Z.; MALONEY, W. J.; WANG, Y. Cryptotanshinone Protects Cartilage against Developing Osteoarthritis through the miR-106a-5p/GLIS3 Axis. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 11, p. 170-179, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.02.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992348/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

KAMM, J. L.; FRISBIE, D. D.; MCILWRAITH, C. W.; ORR, K. E. Gene biomarkers in peripheral white blood cells of horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 74, n. 1, p. 115-21, jan. 2013. DOI: 10.2460/ajvr.74.1.115. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23270355/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

KEGG PATHWAY DATABASE. **Kyoto encyclopedia of genes and genomes**. Kyoto: Kanehisa Laboratories, 2022. Disponível em: <https://www.kegg.jp/brite/ecb00001+100314872>. Acesso em: 21 jan. 2022.

LABENS, R.; SCHRAMME, M. C. A.; BARR, A. R. S. Orthopaedics 1. Diagnosis of lameness/diseases of joints and bones. In: MAIR, T.; LOVE, S.; SCHUMACHER J.; SMITH, R.; FRAZER, G. **Equine Medicine, Surgery and Reproduction**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2012. p. 309-328. DOI: 10.1016/B978-0-7020-2801-4.00015-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028014000158>. Acesso em: 20 fev. 2022.

LEE, S.; HWANG, S.; YU, H. J.; OH, D.; CHOI, Y. J.; KIM, M. C.; KIM, Y.; RYU, D. Y. Expression of microRNAs in horse plasma and their characteristic nucleotide composition. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, jan. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0146374. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/289488691_Expression_of_microRNAs_in_Horse_Plasma_and_Their_Characteristic_Nucleotide_Composition. Acesso em: 20 jan. 2022.

LI, W.; RUAN, K. MicroRNA detection by microarray. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 394, p. 1117-1124, jan. 2009. DOI: 10.1007/s00216-008-2570-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132354/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

LI, F.; YAO, J.; HAO, Q.; DUAN, Z. miRNA-103 promotes chondrocyte apoptosis by down-regulation of Sphingosine kinase-1 and ameliorates PI3K/AKT pathway in osteoarthritis. **Bioscience Reports**, Londres, v. 39, n. 10, out. 2019. DOI: 10.1042/BSR20191255. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6822578/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

LI, Y.; YUAN, F.; SONG, Y.; GUAN, X. miR-17-5p and miR-19b-3p prevent osteoarthritis progression by targeting EZH2. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Athens, v. 20, n. 2, p. 1653-1663, ago. 2020. DOI: 10.3892/etm.2020.8887. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7388554/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

LIAN, W.-S.; KO, J.-Y.; WU, R.-W.; SUN, Y.-C.; CHEN, Y. S.; WU, S. L.; WENG, L.-H.; JAHR, H.; WANG, F. S. MicroRNA-128a represses chondrocyte autophagy and exacerbates knee osteoarthritis by disrupting Atg12. **Cell Death & Disease**, Londres, v. 9, n. 919, p. 1-14, set. 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0994-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0994-y>. Acesso em: 10 fev. 2022.

LIU-BRIAN, R.; TERKELTAUB, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 11, n. 1, p. 35-44, jan. 2015. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.162. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25266449/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

LIU-STRATTON, Y.; ROY, S.; SEM, C. K. DNA microarray technology in nutraceutical and food safety. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 29-42, abr. 2004. DOI: 10.1016/j.toxlet.2003.08.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15068823/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

LOTZ, M. K.; OTSUKI, S.; GROGAN, S. P.; SAH, R.; TERKELTAUB, R.; D'LIMA, D. Cartilage cell clusters. **Arthritis & Rheumatology**, Hoboken, v. 62, n. 8, p. 2206-2218, ago. 2010. DOI: 10.1002/art.27528. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2921934/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

LU, X.; LIN, J.; JIN, J.; QIAN, W.; WENG, X. Hsa-miR-15a exerts protective effects against osteoarthritis by targeting aggrecanase-2 (ADAMTS5) in human chondrocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 37, n. 2, p. 509-16, Fev. 2016. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2446. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26707794/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

McALINDEN, A.; VARGHESE, N.; WIRTHLIN, L.; CHANG, L.-W. Differentially expressed microRNAs in chondrocytes from distinct regions of developing human cartilage. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. 1-14, set. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0075012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3767648/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

McALLISTER, M. J.; CHEMALY, M.; EAKIN, A. J.; GIBSON, D. S.; MCGILLIGAN, V. E. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 26, n. 5, p. 612-619, mai. 2018. DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.901. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458418310604>. Acesso em: 12 fev. 2022.

McCOY, A. M. animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 52, n. 5, p. 803-818, set. 2015. DOI: 10.1177/0300985815588611. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26063173/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

McILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. **Bone and Joint Research**, Londres, v. 1, n. 11, p. 297-309, nov. 2012a. DOI: 10.1302/2046-3758.111.2000132. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23610661/#:~:text=The%20horse%20provides%20twe%20useful,then%20test%20these%20putative%20therapies>. Acesso em: 20 jan. 2022.

McILWRAITH, C. W. Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures. In: STASHAK, T. S. **Adams' lameness in horses**. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 459-644.

MIN, N.; MA, J.; SHI, L.; WANG, L.; LIU, C.; ZHANG, Y.; XUE, Q. miR-223 promotes cartilage differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and protects against osteoarthritis by suppressing NLRP-3 expression. **Archives of Medical Science**, Poznan, p. 1-7, set. 2020. DOI: 10.5114/aoms.2020.100640. Disponível em: <https://www.archivesofmedicalscience.com/miR-223-promotes-cartilage-differentiation-r-nof-bone-marrow-derived-mesenchymal,127271,0,2.html>. Acesso em: 10 fev. 2022.

MINASHIMA, T.; CAMPBELL, K. A.; HADLEY, S. R.; ZHANG, Y.; KIRSCH, T. The role of ANK interactions with MYBBP1a and SPHK1 in catabolic events of articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 22, n. 6, p. 852-861, jun. 2014. DOI: 10.1016/j.joca.2014.04.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24747173/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

MIRBASE. **The microRNA database**. Release 22.1. Manchester: Sam Griffiths-Jones Lab, 2022. Disponível em: <http://www.mirbase.org/>. Acesso em: 21 jan. 2022.

MISKA, E. A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; TOWNSEND, M.; YOSHII, A.; SESTAN, N.; RAKIC, P.; CONSTANTINE-PATON, M.; HORVITZ, H. R. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. **Genoma Biology**, Londres, v. 5, n. 9, p. 1-13, ago. 2004. DOI: 10.1186/gb-2004-5-9-r68. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15345052/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

MIYAKI, S.; SATO, T.; INOUE, A.; OTSUKI, S.; ITO, Y.; YOKOYAMA, S.; KATO, Y.; TAKEMOTO, F.; NAKASA, T.; YAMASHITA, S.; TAKADA, S.; LOTZ, M. K.; UENO-KUDO, H.; ASAHARA, H. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 11, p. 1173-1185, jun. 2010. DOI: 10.1101/gad.1915510. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20466812/#:~:text=Interestingly%2C%20miR%2D140\(%2D,and%20fibrillation%20of%20articular%20cartilage.&text=We%20show%20that%20miR%2D140,%2Drelated%20OA%2Dlike%20changes](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20466812/#:~:text=Interestingly%2C%20miR%2D140(%2D,and%20fibrillation%20of%20articular%20cartilage.&text=We%20show%20that%20miR%2D140,%2Drelated%20OA%2Dlike%20changes). Acesso em: 20 jan. 2022.

MURATA, K.; YOSHITOMI, H.; TANIDA, S.; ISHIKAWA, M.; NISHITANI, K.; ITO, H.; NAKAMURA, T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 12, p. 1-14, mai. 2010. DOI: 10.1186/ar3013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911870/#:~:text=Synovial%20fluid%20miRNAs%20of%20RA,higher%20than%20those%20of%20OA>. Acesso em: 20 jan. 2022.

NAKASA, T.; SHIBUYA, H.; NAGATA, Y.; NIIMOTO, T.; OCHI, M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v. 63, n. 6, p. 1582-1590, jun. 2011. DOI: 10.1002/art.30321. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21425254/#:~:text=Conclusion%3A%20Our%20findings%20indicate%20that,for%20bone%20destruction%20in%20RA>. Acesso em: 20 jan. 2022.

NTOUMOU, E.; TZETIS, M.; BRAOUDAKI, M.; LAMBROU, G.; POULOU, M.; MALIZOS, K.; STEFANOY, N.; ANASTASOPOULOU, L.; TSEZOU, A. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. **Clinical Epigenetics**, Londres, v. 9, n. 127, p. 1-15, dez. 2017. DOI: 10.1186/s13148-017-0428-1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5728069/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

NUGENT, M. MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 24, n. 4, p. 573-580, abr. 2016. DOI: 10.1016/j.joca.2015.10.018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26576510/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

OLIVEIRA JR, G. P.; PORTO, W. F.; PALU, C. C.; PEREIRA, L. M.; REIS, A. M. M.; MARÇOLA, T. G.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; FRANCO, O. L.; PEREIRA, R. W. Effects of endurance racing on horse plasma extracellular particle miRNA. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 53, n. 3, p. 618-627, maio 2021. DOI: 10.1111/evj.13300. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32484928/#:~:text=Results%3A%20Endurance%20racing%20increased%20EP,15%20hours%20after%20the%20race>. Acesso em: 20 jan. 2022.

ORR, C.; SOUSA, E.; BOYLE, D. L.; BUCH, M. H.; BUCKLEY, C. D.; CAÑETE, J. D.; CATRINA, A. I.; CHOY, E. H. S.; EMERY, P.; FEARON, U.; FILER, A.; GERLAG, D.; HUMBY, F.; ISAACS, J. D.; JUST, S. A.; LAUWERYS, B. R.; LE GOFF, B.; MANZO, A.; MCGARRY, T.; MCINNES, I. B.; NAJM, A.; PITZALIS, C.; PRATT, A.; SMITH, M.; TAK, P. P.; THURLINGS, R.; FONSECA, J. E.; VEALE, D. J. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 13, n. 8, p. 463-475, jul. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2017.115>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PACHOLEWSKA, A.; MACH, N.; MATA, X.; VAIMAN, A.; SCHIBLER, L.; BARREY, E.; GERBER, V. Novel equine tissue miRNAs and breed-related miRNA expressed in serum. **BMC Genomics**, Londres, v. 17, n. 831, out. 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-3168-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080802/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

PARKINSON, N. J.; BUECHNER-MAXWELL, V. A.; WITONSKY, S. G.; PLEASANT, R. S.; WERRE, S. R.; AHMED, S. A. Characterization of basal and lipopolysaccharide-induced microRNA expression in equine peripheral blood mononuclear cells using next-generation sequencing. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. 1-23, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0177664. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28552958/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PEFFERS, M. J.; LIU, X.; CLEGG, P. D. Transcriptomic signatures in cartilage ageing. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 15, n. 4, R98, p. 1-17, ago. 2013. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4278>. Acesso em: 20 jan. 2022.

PRITCHARD, C. C.; CHENG, H. H.; TEWARI, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 13, n. 5, p. 358-369, abr. 2012. DOI: 10.1038/nrg3198. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22510765/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

PRITCHARD, C. C.; Kroh, E.; Wood, B.; Arroyo, J. D.; Dougherty, K. J.; Miyajima, M.; Tait, J. F.; Tewari, M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. **Cancer Prevention Research**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 492-497, mar. 2012. DOI: 10.1158/1940-6207. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22158052/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

PUBMED. **National Library of Medicine**. Bethesda, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 24 jan. 2022.

RIGOGLOU, S.; PAPAVALASSILOU, A. G. The NF- κ B signalling pathway in osteoarthritis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 45, n. 11, p. 2580-2584, nov. 2013. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.08.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272513002860?via%3Di> hub. Acesso em: 12 fev. 2022.

SCHULTZE, J. L.; BEYER, M. myelopoiesis reloaded: single-cell transcriptomics leads the way. **Immunity**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 18-20, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.12.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26789920/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

SCHUMACHER, J.; WILHITE, R. How to inject the tarsal joint. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. **AAEP Proceedings**. Lexington: AAEP, 2012. v. 58, p. 446-450. Disponível em:

https://aaep.org/sites/default/files/issues/proceedings-12proceedings-How_to_Make_Rational_Choices_for_Intra-Articular_Injections-Schumacher_-_John_-_Tarsal_Joints.pdf. Acesso em: 20 jan. 2022.

SI, H.; ZENG, Y.; ZHOU, Z.; PEI, F.; LU, Y.; CHENG, J.; SHEN, B. Expression of miRNA-140 in chondrocytes and synovial fluid of knee joints in patients with osteoarthritis. **Chinese Medical Sciences Journal**, Beijing, v. 31, n. 4, p. 207-212, nov. 2016. DOI: 10.1016/s1001-9294(17)30002-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28065216/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

SHAPIRO, I. M.; LAYFIELD, R.; LOTZ, M.; STTEMBRE, C.; WHITEHOUSE, C. Boning up on autophagy. **Autophagy**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 7-19, nov. 2013. DOI: 10.4161/auto.26679. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/auto.26679>. Acesso em: 11 fev. 2022.

SHI, J.; GUO, K.; SU, S.; LI, C. miR-486-5p is upregulated in osteoarthritis and inhibits chondrocyte proliferation and migration by suppressing SMAD2. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 18, n.1, p. 502-508, abr. 2018. DOI: 10.3892/mmr.2018.8931. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8931>. Acesso em: 11 fev. 2022.

SKIÖLDEBRAND, E.; EKMAN, S.; HULTÉN, L. M.; SVALA, E.; BJÖRKMAN, K.; LINDAHL, A.; LUNDQVIST, A.; ÖNNERFJORD, P.; SIHLBOM, C.; RÜETSCHI, U. Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: a new biomarker for the early stages of osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, Londres, v. 49, n. 5, p. 662-667, set. 2017. DOI: 10.1111/evj.12666. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28097685/#:~:text=Conclusions%3A%20The%20increase%20in%20the,articular%20cartilage%20associated%20with%20OA>. Acesso em: 26 jan. 2022.

SONDAG, G. R.; HAQQI, T. M. The Role of MicroRNAs and their targets in osteoarthritis. **Current Rheumatology Reports**, Philadelphia, v. 18, n. 8, p. 1-23, ago. 2016. DOI: 10.1007/s11926-016-0604-x. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294969/#:~:text=Micro%20ribonucleic%20acids%20\(microRNAs%20or,\(UTR\)%20of%20target%20mRNAs](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294969/#:~:text=Micro%20ribonucleic%20acids%20(microRNAs%20or,(UTR)%20of%20target%20mRNAs). Acesso em: 20 jan. 2022.

SUN, Y.; BAO, X.; CHEN, H.; ZHOU, L. MicroRNA-128-3p suppresses interleukin-1 β -stimulated cartilage degradation and chondrocyte apoptosis via targeting zinc finger E-box binding homeobox 1 in osteoarthritis. **Bioengineered**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 1736-1745, jan. 2022. DOI: 10.1080/21655979.2021.2019879. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8805990/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SUN, K.; LUO, J.; GUO, J.; YAO, X.; JING, X.; GUO, F. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 28, n. 4, p. 400-409, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.joca.2020.02.027. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458420300790>. Acesso em: 10 fev. 2022.

SWINGLER, T. E.; NIU, L.; SMITH, P.; PADDY, P.; LE, L.; BARTER, M. J.; YOUNG, D. A.; CLARK, I. M. The function of microRNAs in cartilage and osteoarthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, v. 37, n. 5, suppl. 120, p. 40-47, set.-out. 2019. PMID: 31621575. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31621575/#:~:text=MicroRNAs%20are%20small%20double%2Dstranded,and%20cartilage%20homeostasis%20with%20age.&text=Micr oRNAs%20have%20been%20proposed%20as,this%20differs%20amongst%20patient%20cohorts>. Acesso em: 20 jan. 2022.

TANG, L.; DING, J.; ZHOU, G.; LIU, Z. LncRNA-p21 promotes chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by acting as a sponge for miR-451. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 18, n.6, p. 5295-5301, dez. 2018. DOI: 10.3892/mmr.2018.9506. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.9506>. Acesso em: 12 fev. 2022.

TE MOLLER, N. C. R.; VAN WEEREN, P. R. How exercise influences equine joint homeostasis. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 222, p. 60-67, mar. 2017. DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.03.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28392152/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

TEW, S. R.; McDERMOTT, B. T.; FENTEM, R. B.; PEFFERS, M. J.; CLEGG, P. D. Transcriptome-wide analysis of messenger RNA decay in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. **Arthritis and Rheumatology**, Hoboken, v. 66, n. 1, p. 3052-3061, nov. 2014. DOI: 10.1002/art.38849. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25155964/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

THOMASSIAN, A. Afecções do aparelho locomotor (osso e articulações). In: THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2005. p. 96-136.

THOMSON, J. M.; PARKER, J. S.; HAMMOND, S. M. Microarray analysis of miRNA gene expression. **Methods in Enzymology**, New York, v. 427, p. 107-22, 2007. DOI: 10.1016/S0076-6879(07)27006-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720481/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

TYLER, R. D.; COWELL, R. L.; CLINKENBEARD, K. D.; MACALLISTER, C. G. Hematologic values in horses and interpretation of hematologic data. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 461-484, dez. 1987. DOI: 10.1016/s0749-0739(17)30659-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3322521/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

VAN DER KOLK, J. H.; PACHOLEWSKA, A.; GERBER, V. The role of microRNAs in equine medicine: a review. **The Veterinary Quarterly**, Abingdon, v. 35, n. 2, p. 88-96, fev. 2015. DOI: 10.1080/01652176.2015.1021186. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/272517178_The_role_of_microRNAs_in_equine_medicine_a_review. Acesso em: 20 jan. 2022.

VERMA, P.; DALAI, K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 112, n. 12, p. 3507-3514, dez. 2011. DOI: 10.1002/jcb.23298. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/DOI/10.1002/jcb.23298>. Acesso em: 10 fev. 2022.

VERSCHURE, P. J.; VAN NOORDEN, C. J.; VAN MARLE, J.; VAN DER BERG, W. B. Articular cartilage destruction in experimental inflammatory arthritis: insulin-like growth factor-1 regulation of proteoglycan metabolism in chondrocytes. **Histochemical Journal**, London, v. 28, n. 12, p. 835-857, dez. 1996. DOI: 10.1007/BF02331388. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9015706/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

WALSH, D. A.; BONNET, C. S.; TURNER, E. L.; WILSON, D.; SITU, M.; MCWILLIAMS, D. F. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, Londres, v. 15, n. 7, p. 743-51, jul. 2007. DOI: 10.1016/j.joca.2007.01.020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17376709/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

WALSH, D. A.; MCWILLIAMS, D. F.; TURLEY, M. J.; DIXON, M. R.; FRANSES, R. E.; MAPP, P. I.; WILSON, D. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology**, Oxford, v. 49, n. 10, p. 1852-1861, out. 2010. DOI: 10.1093/rheumatology/keq188. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2936950/>. Acesso em: 12 fev. 2022.

WANG, A.; HU, N.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; SU, C.; LV, Y.; SHEN, Y. **BMC Medical Genomics**, Londres, v. 12, n. 201, p. 1-11, dez. 2019. DOI: 10.1186/s12920-019-0649-6. Disponível em: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-019-0649-6>. Acesso em: 10 fev. 2022.

WARDLE, S. L.; BAILEY, M. E. S.; KILIKEVICIUS, A.; MALKOVA, D.; WILSON, R. H.; VENCKUNAS, T.; MORAN, C. N. Plasma MicroRNA levels differ between endurance and strength athletes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 4, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0122107. Disponível em: <https://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/21729?mode=simple#.Ygpl0GhKjIU>. Acesso em: 14 fev. 2022.

WEN, C; XU, L.; XU, X.; WANG, D.; LIANG, Y.; DUAN, L. Insulin-like growth factor-1 in articular cartilage repair for osteoarthritis treatment. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 23, n. 277, p. 1-9, out. 2021. DOI: 10.1186/s13075-021-02662-0. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-021-02662-0>. Acesso em: 10 fev. 2022.

WILLIAMS, Z.; BEN-DOV, I. Z.; ELIAS, R.; MIHAILOVIC, A.; BROWN, M.; ROSENWAKS, Z.; TUSCHL, T. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 110, n. 11, p. 4255-4260, mar. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1214046110. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23440203/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

WU, Y.; CHEN, L.; WANG, Y.; LI, W.; LIN, Y.; YU, D.; ZHANG, L.; LI, F.; PAN, Z. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- κ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development. **Scientific Reports**, v. 5, n. 17602, p. 1-11, dez. 2015. DOI: 10.1038/srep17602. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4671011/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

YAN, J.; ZHOU, Y.; LIANG, X.; JING, B.; ZHAO, Z. MicroRNA-486 promotes a more catabolic phenotype in chondrocyte-like cells by targeting SIRT6. **Bone & Joint Research**, Londres, v. 10, n. 7, p. 459-466, jul. 2021. DOI: 10.1302/2046-3758.107.BJR-2019-0251.R4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8333035/>. Acesso em: 11 fev. 2022.

YAN, S. J.; WANG, M.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; ZHOU, C.; JIN, L.; ZHANG, Y.; QIU, X.; M. A., B.; FAN, Q. MicroRNA-34a affects chondrocyte apoptosis and proliferation

by targeting the SIRT1/p53 signaling pathway during the pathogenesis of osteoarthritis. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 38, n. 1, p. 201-209, jul. 2016. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2618. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899008/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

YANG, Q.; ZHOU, Y.; CAI, P.; FU, W.; WANG, J.; WEI, Q.; LI, X. Downregulation of microRNA-23b-3p alleviates IL-1 β -induced injury in chondrogenic CHON-001 cells. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v. 13, p. 2503-2512, jul. 2019. doi: 10.2147/DDDT.S211051. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6664255/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

YIN, C.-M.; SUEN, W.-C.-W.; LIN, S.; WU, X.-M.; LI, G.; PAN, X.-H. Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity. **Bone & Joint Research**, Londres, v. 6, n. 11, nov. 2017. DOI: 10.1302/2046-3758.611.BJR-2017-0090.R1. Disponível em: <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/full/10.1302/2046-3758.611.BJR-2017-0090.R1>. Acesso em: 13 fev. 2022.

ZHAO, H.; GONG, N. miR-20a regulates inflammatory in osteoarthritis by targeting the I κ B β and regulates NK- κ B signaling pathway activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 518, n. 4, p. 632-637, ago. 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.109. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31451219/>. Acesso em: 10 fev. 2022.

APÊNDICE A - Lista dos 354 miRNAs presentes no “Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip”, já anotados para a espécie equina (*Equus caballus*)

| | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| eca-miR-1 | eca-miR-1282 | eca-miR-142-3p |
| eca-miR-100 | eca-miR-1289 | eca-miR-142-5p |
| eca-miR-101 | eca-miR-1291a | eca-miR-143 |
| eca-miR-103 | eca-miR-1291b | eca-miR-144 |
| eca-miR-105 | eca-miR-1296 | eca-miR-145 |
| eca-miR-106a | eca-miR-1298 | eca-miR-1461 |
| eca-miR-106b | eca-miR-129a-3p | eca-miR-1468 |
| eca-miR-107a | eca-miR-129a-5p | eca-miR-146a |
| eca-miR-107b | eca-miR-129b-3p | eca-miR-146b-3p |
| eca-miR-10a | eca-miR-129b-5p | eca-miR-146b-5p |
| eca-miR-10b | eca-miR-1301 | eca-miR-147b |
| eca-miR-1179 | eca-miR-1302 | eca-miR-148a |
| eca-miR-1180 | eca-miR-1302b | eca-miR-148b-3p |
| eca-miR-1185 | eca-miR-1302c | eca-miR-148b-5p |
| eca-miR-1193 | eca-miR-1302d | eca-miR-149 |
| eca-miR-1197 | eca-miR-1302e | eca-miR-150 |
| eca-miR-1204 | eca-miR-130a | eca-miR-151-5p |
| eca-miR-122 | eca-miR-130b | eca-miR-153 |
| eca-miR-124 | eca-miR-132 | eca-miR-154 |
| eca-miR-1244 | eca-miR-133a | eca-miR-155 |
| eca-miR-1248 | eca-miR-133b | eca-miR-1597 |
| eca-miR-1255b | eca-miR-134 | eca-miR-15a |
| eca-miR-125a-3p | eca-miR-135a | eca-miR-15b |
| eca-miR-125a-5p | eca-miR-135b | eca-miR-16 |
| eca-miR-125b-5p | eca-miR-136 | eca-miR-17 |
| eca-miR-1261 | eca-miR-137 | eca-miR-181a |
| eca-miR-126-3p | eca-miR-138 | eca-miR-181b |
| eca-miR-1264 | eca-miR-139-3p | eca-miR-182 |
| eca-miR-126-5p | eca-miR-139-5p | eca-miR-183 |
| eca-miR-127 | eca-miR-140-3p | eca-miR-1839 |
| eca-miR-1271 | eca-miR-140-5p | eca-miR-184 |
| eca-miR-128 | eca-miR-141 | eca-miR-1842 |

| | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| eca-miR-186 | eca-miR-206 | eca-miR-301b-5p |
| eca-miR-187 | eca-miR-208a | eca-miR-302a |
| eca-miR-188-3p | eca-miR-208b | eca-miR-302b |
| eca-miR-188-5p | eca-miR-20a | eca-miR-302c |
| eca-miR-1892 | eca-miR-20b | eca-miR-302d |
| eca-miR-1898 | eca-miR-21 | eca-miR-30b |
| eca-miR-18a | eca-miR-211 | eca-miR-30c |
| eca-miR-18b | eca-miR-212 | eca-miR-30d |
| eca-miR-1902 | eca-miR-214 | eca-miR-30e |
| eca-miR-1905a | eca-miR-215 | eca-miR-31 |
| eca-miR-1905b | eca-miR-216a | eca-miR-32 |
| eca-miR-1905c | eca-miR-216b | eca-miR-323-3p |
| eca-miR-190a | eca-miR-217 | eca-miR-323-5p |
| eca-miR-190b | eca-miR-218 | eca-miR-324-3p |
| eca-miR-191 | eca-miR-219-5p | eca-miR-324-5p |
| eca-miR-1912 | eca-miR-22 | eca-miR-326 |
| eca-miR-192 | eca-miR-221 | eca-miR-328 |
| eca-miR-193a-3p | eca-miR-222 | eca-miR-329 |
| eca-miR-193a-5p | eca-miR-223 | eca-miR-330 |
| eca-miR-193b | eca-miR-224 | eca-miR-331 |
| eca-miR-194 | eca-miR-23a | eca-miR-335 |
| eca-miR-195 | eca-miR-23b | eca-miR-337-3p |
| eca-miR-196a | eca-miR-24 | eca-miR-337-5p |
| eca-miR-196b | eca-miR-25 | eca-miR-338-3p |
| eca-miR-197 | eca-miR-26a | eca-miR-338-5p |
| eca-miR-199a-3p | eca-miR-27a | eca-miR-33a |
| eca-miR-199a-5p | eca-miR-27b | eca-miR-33b |
| eca-miR-199b-3p | eca-miR-28-3p | eca-miR-340-3p |
| eca-miR-199b-5p | eca-miR-28-5p | eca-miR-340-5p |
| eca-miR-19a | eca-miR-296 | eca-miR-342-3p |
| eca-miR-19b | eca-miR-299 | eca-miR-342-5p |
| eca-miR-200a | eca-miR-29a | eca-miR-345-3p |
| eca-miR-200b | eca-miR-29b | eca-miR-345-5p |
| eca-miR-200c | eca-miR-29c | eca-miR-346 |
| eca-miR-204b | eca-miR-301a | eca-miR-34a |
| eca-miR-205 | eca-miR-301b-3p | eca-miR-34b-3p |

| | | |
|----------------|-----------------|----------------|
| eca-miR-34b-5p | eca-miR-424 | eca-miR-502-3p |
| eca-miR-34c | eca-miR-429 | eca-miR-502-5p |
| eca-miR-350 | eca-miR-431 | eca-miR-503 |
| eca-miR-361-3p | eca-miR-432 | eca-miR-504 |
| eca-miR-361-5p | eca-miR-433 | eca-miR-505 |
| eca-miR-362-3p | eca-miR-448 | eca-miR-507 |
| eca-miR-362-5p | eca-miR-449a | eca-miR-508-3p |
| eca-miR-363 | eca-miR-450a | eca-miR-508-5p |
| eca-miR-365 | eca-miR-450b-3p | eca-miR-509-5p |
| eca-miR-367 | eca-miR-450b-5p | eca-miR-514 |
| eca-miR-369-3p | eca-miR-450c | eca-miR-532-3p |
| eca-miR-369-5p | eca-miR-451 | eca-miR-532-5p |
| eca-miR-370 | eca-miR-454 | eca-miR-539 |
| eca-miR-371-3p | eca-miR-485-3p | eca-miR-541 |
| eca-miR-371-5p | eca-miR-485-5p | eca-miR-542-3p |
| eca-miR-374a | eca-miR-486-3p | eca-miR-542-5p |
| eca-miR-374b | eca-miR-486-5p | eca-miR-543 |
| eca-miR-376a | eca-miR-487a | eca-miR-544 |
| eca-miR-376b | eca-miR-487b | eca-miR-544b |
| eca-miR-376c | eca-miR-488 | eca-miR-545 |
| eca-miR-377 | eca-miR-489 | eca-miR-551a |
| eca-miR-378 | eca-miR-490-3p | eca-miR-551b |
| eca-miR-379 | eca-miR-490-5p | eca-miR-568 |
| eca-miR-380 | eca-miR-491-3p | eca-miR-582-3p |
| eca-miR-381 | eca-miR-491-5p | eca-miR-582-5p |
| eca-miR-382 | eca-miR-492 | eca-miR-590-3p |
| eca-miR-383 | eca-miR-493a | eca-miR-590-5p |
| eca-miR-384 | eca-miR-493b | eca-miR-592 |
| eca-miR-409-3p | eca-miR-494 | eca-miR-598 |
| eca-miR-409-5p | eca-miR-495 | eca-miR-615-3p |
| eca-miR-410 | eca-miR-496 | eca-miR-615-5p |
| eca-miR-411 | eca-miR-497 | eca-miR-628a |
| eca-miR-412 | eca-miR-499-3p | eca-miR-632 |
| eca-miR-421 | eca-miR-499-5p | eca-miR-652 |
| eca-miR-423-3p | eca-miR-500 | eca-miR-653 |
| eca-miR-423-5p | eca-miR-501-5p | eca-miR-655 |

| | | |
|----------------|-----------------|----------------|
| eca-miR-656 | eca-miR-763 | eca-miR-885-3p |
| eca-miR-660 | eca-miR-764-3p | eca-miR-885-5p |
| eca-miR-664 | eca-miR-764-5p | eca-miR-889 |
| eca-miR-670 | eca-miR-767-3p | eca-miR-92a |
| eca-miR-671-3p | eca-miR-767-5p | eca-miR-92b |
| eca-miR-671-5p | eca-miR-769a-3p | eca-miR-93 |
| eca-miR-672 | eca-miR-769a-5p | eca-miR-95 |
| eca-miR-675 | eca-miR-769b | eca-miR-96 |
| eca-miR-684 | eca-miR-770-5p | eca-miR-98 |
| eca-miR-7 | eca-miR-802 | eca-miR-99a |
| eca-miR-703 | eca-miR-872 | eca-miR-99b |
| eca-miR-708 | eca-miR-873 | eca-miR-9a |
| eca-miR-711 | eca-miR-874 | |
| eca-miR-758 | eca-miR-876-3p | |
| eca-miR-761 | eca-miR-876-5p | |

APÊNDICE B – Sequência madura de nucleotídeos de cada miRNA regulado positivamente nas amostras de sangue venoso e de líquido sinovial, que podem ser utilizados como biomarcadores sistêmicos para osteoartrite tibiotársica

| Ordem | miRNA | SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS* |
|--------------|------------------------|-----------------------------------|
| 1 | eca-miR-15a | uagcagcacauaaugguuugug |
| 2 | eca-miR-15b | uagcagcacaucaugguuuaca |
| 3 | eca-miR-17 | caaagugcuuacagugcagguag |
| 4 | eca-miR-18a | uaaggugcaucuagugcagauag |
| 5 | eca-miR-19b | ugugcaaauccaugcaaaacuga |
| 6 | eca-miR-20a | uaaagugcuuauagugcagguag |
| 7 | eca-miR-106a | caaagugcuuacagugcagguag |
| 8 | eca-miR-106b | uaaagugcugacagugcagau |
| 9 | eca-miR-191 | caacggaaucccaaaagcagcug |
| 10 | eca-miR-361-5p | uuaucagaaucuccagggguac |
| 11 | eca-miR-450b-5p | uuuugcaauauguuccugaaua |
| 12 | eca-miR-451 | aaaccguuaccauuacuguguu |

Fonte: MIRBASE, 2022.

ANEXO A – Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da expressão de miRNAs circulantes e da articulação tibiotársica em equinos**", Processo FOA nº 0251-2020, sob responsabilidade de Juliana Regina Peiró apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 29 de Abril de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 29 de Março de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 29 de Abril de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the expression of circulating miRNAs and in the tibiotarsal articulation in horses**", Protocol FOA nº 0251-2020, under the supervision of Juliana Regina Peiró presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 29, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 29, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 29, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B – Depósito da patente

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.