

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental

BEATRIZ FRANÇA ISAAC DE OLIVEIRA

**ESTUDO DOS MICRORNAS 129, 139 E 181a NA EPILEPSIA IDIOPÁTICA EM
CÃES QUE REALIZAM TERAPIA MEDICAMENTOSA**

SÃO PAULO
2026

BEATRIZ FRANÇA ISAAC DE OLIVEIRA

**ESTUDO DOS MICRORNAS 129, 139 E 181a NA EPILEPSIA IDIOPÁTICA EM
CÃES QUE REALIZAM TERAPIA MEDICAMENTOSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Ambiental e Experimental da
Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do
título de Doutora em Patologia Ambiental e
Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto
Foganholi da Silva

SÃO PAULO

2026

Oliveira, Beatriz França Isaac de.

Estudo dos microRNAs 129, 139 e 181a na epilepsia idiopática em cães com terapia medicamentosa / Beatriz França Isaac de Oliveira. - 2026.

35 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2026.

Área de concentração: Patologia Integrada Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva.

1. Biomarcadores. 2. Cães. 3. Epilepsia. 4. microRNAs.

I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador). II. Silva, Rodrigo Augusto Foganholi da (coorientador). III. Título.

BEATRIZ FRANÇA ISAAC DE OLIVEIRA

**ESTUDO DOS MICRORNAS 129, 139 E 181a NA EPILEPSIA IDIOPÁTICA EM
CÃES QUE REALIZAM TERAPIA MEDICAMENTOSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Ambiental e Experimental da
Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do
título de Doutora em Patologia Ambiental e
Experimental.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Ísis dos Santos Dal-Bó

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Tabatha do Amaral Kalenski

DECLARAÇÃO DE USO DE IA

Durante a preparação deste trabalho os autores utilizaram Chat GPT e Language Tool com o objetivo de melhorar a redação.

Durante a preparação deste trabalho os autores utilizaram Chat GPT, Gemini e Language Tool com o objetivo de organizar, analisar e apresentar os dados.

Durante a preparação da apresentação final, os autores utilizaram Chat GPT com o objetivo de organizar a apresentação final do trabalho.

Declaração de IA não generativa na execução da pesquisa:

Durante a preparação deste trabalho os autores utilizaram Chat GPT com o objetivo de ampliar o alcance das buscas de artigos e publicações científicas.

Mesmo utilizando essas ferramentas, os autores revisaram e editaram o conteúdo segundo a necessidade, assumindo a plena responsabilidade do conteúdo deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio, incentivo e carinho de pessoas muito importantes ao longo desta trajetória.

À minha mãe, ao meu pai e à minha avó, expresso minha mais profunda gratidão por todo amor, apoio incondicional, incentivo e compreensão ao longo desta caminhada. Obrigada por acreditarem em mim, respeitarem meus sonhos e permanecerem ao meu lado, especialmente nos momentos mais difíceis. Vocês foram meu alicerce para que este sonho se tornasse possível.

Ao meu namorado, agradeço pelo companheirismo, paciência, incentivo e apoio constante. Obrigada por estar ao meu lado durante os desafios, pelas palavras de encorajamento e por tornar os dias mais leves em meio às incertezas e dificuldades desta jornada.

Aos meus amigos, agradeço pela amizade, pelas conversas, pelo apoio e pelos momentos de leveza que tornaram essa trajetória mais especial. Obrigada também pela compreensão nos momentos de ausência e pelas inúmeras formas de incentivo ao longo do caminho.

Aos meus professores, minha sincera gratidão pelos ensinamentos, orientações e pela contribuição essencial para minha formação acadêmica e profissional. O conhecimento compartilhado e a confiança depositada foram fundamentais para meu crescimento.

Aos meus colegas de pós-graduação e de profissão, agradeço pela parceria, troca de experiências, apoio e aprendizado compartilhado ao longo desta trajetória. Cada contribuição teve grande importância para esta conquista.

Aos meus animais, por serem fonte constante de amor, conforto e companhia. Mesmo sem compreenderem a dimensão deste momento, estiveram presentes nos dias difíceis, oferecendo acolhimento silencioso e tornando a caminhada mais leve.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram parte desta etapa tão importante da minha vida.

RESUMO

A epilepsia idiopática é uma condição neurológica recorrente em cães e cuja etiologia ainda não é totalmente compreendida, acreditando-se ter uma base genética. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs conhecidos por regular a expressão gênica pós-transcricional e desempenhar um papel crucial em processos celulares, incluindo diferenciação celular, proliferação e apoptose. Este estudo tem como objetivo investigar o papel dos microRNAs na epilepsia idiopática canina, com ênfase na expressão dos miRNAs 129 e 139 e 181a, buscando-se elucidar a relação entre tal expressão e a resposta ao tratamento medicamentoso. O estudo analisou amostras de sangue de cães diagnosticados com epilepsia idiopática e em tratamento, incluindo aqueles que realizavam monoterapia e politerapia, bem como animais hígidos para comparação. A coleta de dados clínicos e de tratamento dos animais foi realizada, com levantamento dos tipos de medicamentos utilizados. As amostras de plasma foram analisadas por PCR para determinar os níveis de expressão dos miRNAs 129, 139 e 181a. Os resultados encontrados nesse estudo mostraram que animais epiléticos idiopáticos tendiam a ter o miRNA 129 mais hiperexpresso em relação aos cães não epiléticos. Por sua vez, não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e de animais epiléticos em relação aos miRNAs 139 e 181a, indicando a necessidade de mais estudos para elucidação de sua possível relação com a epilepsia idiopática em cães.

Palavras-chave: biomarcadores; cães; epilepsia; microRNAs.

ABSTRACT

Idiopathic epilepsy is a recurrent neurological disorder in dogs whose etiology is not yet fully understood, although it is believed to have a genetic basis. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs known to regulate post-transcriptional gene expression, playing a crucial role in several cellular processes, including cell differentiation, proliferation, and apoptosis. This study aimed to investigate the role of microRNAs in canine idiopathic epilepsy, with emphasis on the expression of miRNAs 129, 139 and 181a, seeking to elucidate the relationship between their expression and the response to pharmacological treatment. Blood samples from dogs diagnosed with idiopathic epilepsy and undergoing treatment were analyzed, including animals receiving monotherapy and polytherapy, as well as healthy dogs used as a control group. Clinical and therapeutic data were collected, including information regarding the medications used. Plasma samples were analyzed by PCR to determine the expression levels of miRNAs 129, 139 and 181a. The results demonstrated that dogs with idiopathic epilepsy tended to present hyperexpression of miRNA 129 when compared to non-epileptic dogs. In contrast, no significant differences were observed between the control and epileptic groups regarding miRNAs 139 and 181a, indicating the need for further studies to better elucidate their possible relationship with idiopathic epilepsy in dogs.

Keywords: biomarkers; dogs; epilepsy; microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Expressão relativa do pré-miRNA 129, miRNA 129 ativo e a relação entre o ativo e o pré nos cães dos grupos controle e com epilepsia idiopática. Mann-Whitney.....	19
Figura 2- Expressão relativa do pré-miRNA 139, miRNA 139 ativo e a relação entre o ativo e o pré nos cães dos grupos controle e com epilepsia idiopática. Mann-Whitney.....	20
Figura 3- Expressão relativa do miRNA 181a ativo nos cães dos grupos controle e com epilepsia idiopática. Mann-Whitney.....	21
Figura 4- Expressão relativa do pré-miRNA 129, miRNA 129 ativo e a relação entre ativo e pré nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia. Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn.....	22
Figura 5- Expressão relativa de pré-miRNA 139, miRNA 139 ativo e a relação entre ativo e pré nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia. Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn.....	23
Figura 6- Expressão relativa de miRNA 181a ativo nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia. Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn.....	24
Figura 7- Gráfico de <i>Scatter Plot</i> , no qual os círculos verdes representam dados do grupo controle, quadrados azuis representam dados do grupo epiléticos com monoterapia e asteriscos vermelhos, epiléticos com politerapia.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	ARTIGO.....	12
	2.1 INTRODUÇÃO.....	12
	2.2 MÉTODOS.....	13
	2.3 RESULTADOS.....	17
	2.4 DISCUSSÃO.....	25
	2.5 CONCLUSÕES.....	29
	2.6 REFERÊNCIAS.....	30
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas não codificantes, com cerca de 19 a 20 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica no nível pós-transcricional e participam de diversos processos celulares, estando presentes tanto em tecidos normais quanto neoplásicos. Vêm sendo amplamente utilizados na medicina como biomarcadores, devido à sua especificidade tecidual, alterações de expressão em diferentes doenças, resistência à degradação, baixo custo e facilidade de obtenção de amostras. Podem ser detectados em diversos fluidos biológicos, como sangue, líquido, saliva, líquido amniótico, urina e leite. Além disso, têm sido investigados como fatores prognósticos, bem como potenciais alvos terapêuticos e diagnósticos (TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018; ANTÔNIO *et al.*, 2019; KOEHLER *et al.*, 2020; NARITA *et al.*, 2020; GHAFOURI-FARD *et al.*, 2022; VLIET *et al.*, 2024).

Os miRNAs atuam por meio da ligação complementar, total ou parcial, ao RNA mensageiro, levando à inibição da tradução proteica ou à sua degradação. Também desempenham papel como moduladores epigenéticos, regulando enzimas-chave envolvidas em processos como metilação do DNA e modificação de histonas. Dessa forma, estabelecem uma relação de retroalimentação com mecanismos epigenéticos, influenciando processos como diferenciação celular, proliferação e apoptose (TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018; YAO; CHEN; ZHOU, 2019; RASHID *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2024).

Os miRNAs possuem precursores, sendo o primeiro o pri-miRNA, que será processado pela Drosha no núcleo para gerar outro precursor, o miRNA pré, que, por sua vez, será processado pelo Dicer para formar o miRNA ativo (SCHMITTGEN *et al.*, 2008). Os pré-miRNAs podem ter alterações de comprimento, além de diferenças na dimensão do laço terminal, incompatibilidades internas e protuberâncias que influenciam diretamente no seu reconhecimento e na exatidão da clivagem pelo Dicer (DING; WANG, 2025).

Na epilepsia, os miRNAs parecem desempenhar papel relevante ao participarem de processos como apoptose, inflamação, estresse oxidativo, autofagia e disfunção de células da glia. Além disso, influenciam diretamente a arquitetura neuronal, incluindo dendritos, axônios, canais iônicos e neurotransmissores (XIE *et al.*, 2023; VLIET *et al.*, 2024; EKER, 2026). A desregulação astrocitária, associada à progressão de doenças do sistema nervoso central, também pode estar relacionada à ação dos miRNAs, sugerindo seu potencial como alvo terapêutico em epilepsia refratária (MENG *et al.*, 2025).

A neuroinflamação desempenha papel central na epilepsia, envolvendo tanto mecanismos periféricos quanto centrais, com comprometimento da barreira hematoencefálica e aumento da excitabilidade neuronal. Esse processo pode levar a alterações estruturais, morte neuronal e reorganização sináptica, além de contribuir para a recorrência e a progressão das crises (XIE *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2024). Nesse contexto, os miRNAs também estão envolvidos em lesões encefálicas agudas associadas à epilepsia, como alterações vasculares, trauma encefálico e *status epilepticus*, reforçando seu potencial como possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos (TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018; BRENNAN; HENSHALL, 2020; XIE *et al.*, 2023).

Estudos em modelos animais e em pacientes epiléticos já identificaram mais de 100 miRNAs desregulados em sangue e tecido encefálico (TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018).

O miRNA 129 está associado à modulação da excitabilidade neuronal, atuando principalmente na redução de sinapses excitatórias. É expresso em neurônios hipocámpais e participa do controle de canais iônicos de potássio. Estudos demonstraram sua relação com epilepsia refratária, sendo identificado no plasma e em tecidos encefálicos de pacientes com aumento da frequência de crises (RAJMAN *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2016; BRENNAN; HENSHALL, 2020).

O miRNA 139, além de seu papel em neoplasias, é associado à epilepsia do lobo temporal, atuando na regulação de proteínas relacionadas à refratariedade medicamentosa. É expresso em dendritos e sinapses, participando da maturação e sobrevivência neuronal. Em algumas condições neurológicas, incluindo epilepsia, pode apresentar expressão reduzida. Também está envolvido na modulação de receptores NMDA, influenciando a plasticidade sináptica e a excitabilidade neuronal (HUANG *et al.*, 2014; ALSHARIF; XIA; LI, 2016; SONAWANE; VSIANSKY; BRÁZDIL, 2024).

O miRNA 181a apresenta expressão aumentada em contextos epiléticos e está ligado à inflamação, morte celular e ativação de células gliais. Sua inibição foi associada à redução da apoptose e da ativação inflamatória, possivelmente por meio da via SIRT1. Alterações desse miRNA foram identificadas tanto no plasma quanto no hipocampo, sugerindo envolvimento na epileptogênese e como potencial marcador prognóstico (TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018; KONG *et al.*, 2020; FARD *et al.*, 2022; RUAN *et al.*, 2023; VASILIEVA *et al.*, 2023; XIE *et al.*, 2023; MENG *et al.*, 2025; EKER, 2026).

As alterações neurológicas são frequentes na clínica de pequenos animais, sendo relatado que 0,82% dos cães apresentam ao menos um episódio epiléptico ao longo da vida (RÜDEN *et al.*, 2023). A epilepsia é caracterizada por descargas neuronais anormais e recorrentes, resultantes de desequilíbrio entre mecanismos excitatórios e inibitórios, podendo causar alterações comportamentais, motoras e autonômicas (DE RISIO *et al.*, 2015; PLONEK *et al.*, 2022; KÄHN *et al.*, 2023; SILVESTRINO *et al.*, 2025).

As crises epiléticas podem ser classificadas como focais ou generalizadas, podendo a forma focal evoluir para a generalização. A epilepsia idiopática é definida pela ausência de causa estrutural ou metabólica identificável, sendo o diagnóstico baseado na exclusão de outras etiologias (DE RISIO *et al.*, 2015; PLONEK *et al.*, 2022). Essa forma representa a causa mais comum em cães, correspondendo a aproximadamente 53,8% dos casos (SILVESTRINO *et al.*, 2025).

O diagnóstico baseia-se em avaliação clínica, exames laboratoriais e, quando necessário, exames complementares como ressonância magnética e análise de líquido. O tratamento é indicado conforme a frequência e a gravidade das crises, sendo o fenobarbital, o brometo de potássio e o levetiracetam as principais opções terapêuticas (PODELL *et al.*, 2016). Apesar disso, até 40% dos animais podem apresentar refratariedade ao tratamento, caracterizada pela ausência de controle adequado das crises mesmo com uso de múltiplos fármacos (GARCÍA-GRANÇA *et al.*, 2024; KADLER *et al.*, 2025).

Atualmente, não há terapias capazes de modificar a progressão da doença, sendo o tratamento voltado ao controle das crises. Nesse contexto, a identificação de biomarcadores, como os miRNAs, pode contribuir para melhor compreensão da doença e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (RÜDEN *et al.*, 2023).

Até o momento, há escassez de estudos avaliando a expressão de miRNAs em cães com epilepsia idiopática, especialmente em relação ao uso de monoterapia e politerapia. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos miRNAs 129m 139 e 181a em cães com epilepsia idiopática submetidos a diferentes protocolos terapêuticos.

2 ARTIGO

ESTUDO DOS MICRORNAS 129, 139 E 181a NA EPILEPSIA IDIOPÁTICA EM CÃES COM TERAPIA MEDICAMENTOSA

BEATRIZ FRANÇA ISAAC DE OLIVEIRA¹, RODRIGO AUGUSTO FOGANHOLI DA SILVA¹, EDUARDO FERNANDES BONDAN¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente:

e-mail: biafrancavet6@gmail.com

2.1 INTRODUÇÃO

Estudos conduzidos em humanos e modelos experimentais em ratos demonstraram alterações na expressão de diferentes miRNAs durante a epileptogênese e na epilepsia crônica, sugerindo seu potencial como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e até como alvos terapêuticos. Entretanto, a expressão diferencial desses miRNAs e sua relação com os diferentes perfis clínicos da epilepsia ainda demandam maior investigação (XIE *et al.*, 2023; VLIET *et al.*, 2024; EKER, 2026).

A epilepsia idiopática canina é uma das doenças neurológicas crônicas mais frequentes em cães, sendo ainda escassos os estudos que investigam a associação entre miRNAs e resposta terapêutica. Até o momento, apenas o estudo de García-Gracia *et al.* (2025) avaliou a relação entre refratariedade ao tratamento e miRNAs em cães com epilepsia idiopática. Os autores investigaram os miRNAs 16, 21, 27, 93-5p, 132, 142 e 574, observando diferenças significativas entre cães refratários e o grupo controle para os miRNAs 16, 27, 93-5p, 142 e 574. Em cães responsivos ao tratamento, apenas o miRNA 142 apresentou alteração significativa em relação aos controles, enquanto os miRNAs 16, 93-5p, 132 e 574 demonstraram potencial prognóstico na distinção entre cães responsivos e refratários à terapia antiepiléptica, sugerindo possível aplicação futura como biomarcadores de refratariedade ao tratamento nessa condição neurológica.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar, em cães com epilepsia idiopática submetidos a diferentes protocolos terapêuticos, a expressão dos miRNAs 129, 139

e 181a, os quais já foram previamente identificados em ratos e em seres humanos como envolvidos na epilepsia refratária e na neuroinflamação (ALSHARIF; XIA; LI, 2016; BRENNAN; HENSHALL, 2020; EKER, 2026; FARD *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2025; RAJMAN *et al.*, 2017; RUAN *et al.*, 2023; SONAWANE; VSIANSKY; BRÁZDIL, 2024 SUN *et al.*, 2016; TIWARI; PEARISO; GROSS, 2018; VASILIEVA *et al.*, 2023; XIE *et al.*, 2023;).

2.2 MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIP sob protocolo número 2800080824 e a divulgação do estudo foi realizada por redes sociais, principalmente por WhatsApp, para tutores e médicos veterinários.

Foram aceitos cães com idades entre 3 a 6 anos de idade, que realizavam tratamento para controle de crises epiléticas de origem idiopática, apresentando exame neurológico interictal sem alterações, além de resultados de hemograma e exames de ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina-aminotransferase, bilirrubina, proteína total, albumina, colesterol, triglicérides, ácidos biliares, sódio, potássio, cloreto, cálcio e urinálise dentro dos parâmetros de normalidade, já realizando acompanhamento com médico veterinário especialista em neurologia. Além disso foram aceitos cães fora dessa faixa etária com 1 a 12 anos de idade que possuíam ressonância magnética comprobatória de não terem outras causas que poderiam desencadear a crise epilética. Todos esses animais faziam uso de monoterapia ou politerapia para controle das crises, realizando a terapia medicamentosa com pelo menos a dose inicial descrita em literatura ou tinham a mensuração sérica dos fármacos. Não foram aceitos no presente estudo cães com epilepsia estrutural e reativas.

Foram avaliados dois grandes grupos, os animais do grupo controle (n=14, Tabela 1) e os animais do grupo de epiléticos idiopáticos (n=14). Dentro deste grupo, existiam indivíduos que usavam monoterapia (n=5, Tabela 1) e politerapia (n=9, Tabela 1). O cálculo mínimo de animais utilizados no estudo por grupo seria de 11 indivíduos, considerando a existência de 3 grupos.

Tabela 1. Dados referentes aos animais participantes do estudo.

Grupo	Idade	Raça	Medicamentos
Controle	3 anos	SRD	Nenhum
Controle	3 anos	SRD	Nenhum
Controle	5 anos	Poodle	Nenhum
Controle	6 anos	Maltês	Nenhum
Controle	5 anos	Golden	Nenhum
Controle	4 anos	SRD	Nenhum
Controle	6 anos	Yorkshire	Nenhum
Controle	6 anos	Yorkshire	Nenhum
Controle	10 anos	SRD	Nenhum
Controle	7 anos	SRD	Nenhum
Controle	6 anos	Yorkshire	Nenhum
Controle	11 anos	Fox Paulistinha	Nenhum
Controle	12 anos	SRD	Nenhum
Controle	7 anos	Cavalier	Nenhum
Monoterapia	3 anos	Cavalier	Fenobarbital
Monoterapia	4 anos	Dálmata	Fenobarbital
Monoterapia	3 anos	Dascshund	Fenobarbital
Monoterapia	3 anos	SRD	Fenobarbital
Monoterapia	6 anos	Border Collie	Fenobarbital
Politerapia	4 anos	SRD	Fenobarbital, Brometo de potássio, Levetiracetam.
	1 a 6		
Politerapia	meses	Pastor de Shetland	Fenobarbital, Levetiracetam
Politerapia	12 anos	Spitz Alemão	Fenobarbital, Levetiracetam
		Welsh Corgi	
Politerapia	3 anos	Pembroke	Fenobarbital, Levetiracetam
Politerapia	3 anos	Spitz Alemão	Fenobarbital, Brometo de potássio, Levetiracetam.
Politerapia	4anos	Buldogue Inglês	Fenobarbital, Brometo de potássio, Levetiracetam.
Politerapia	2 anos	Chihuahua	Fenobarbital, Levetiracetam
Politerapia	2 anos	Border Collie	Fenobarbital, Brometo de potássio, Levetiracetam.
Politerapia	10 anos	Lhasa Apso	Fenobarbital, Levetiracetam

Os médicos veterinários que indicaram pacientes para a presente investigação assinaram o termo de anuência, enquanto os responsáveis dos animais que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

Foi realizada a coleta de sangue do animal nas veias periféricas cefálica ou jugular, com agulha hipodérmica e seringa de 3 mL. A amostra foi armazenada em tubos com EDTA de 2 mL, sendo centrifugados logo após a coleta. Foi coletado 0,5 mL de sobrenadante, no caso o plasma, e armazenado em microtubos tipo Eppendorf, os quais foram armazenados primeiramente em *freezer* à temperatura de -20° C, para posterior congelamento a -80° C, com subsequente extração do material.

Foram extraídos 0,250 mL de plasma de cada Eppendorf, colocados em novos Eppendorfs, homogeneizado com Trizol e mantido no gelo. Seguiu-se adição de 0,2 mL de clorofórmio, com posterior centrifugação do material a 12.000 g a 4° C por 15 minutos, sendo coletado o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 0,8 mL de álcool isopropílico e realizada nova centrifugação sob mesma velocidade e temperatura. Ao final da etapa, foi possível visualizar o *pellet* esbranquiçado de RNA. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e deixou-se o tubo com o *pellet* secar, sendo o RNA ressuspensionado com 100 microlitros de água estéril e armazenado novamente em *freezer* a -80° C. As amostras foram descongeladas em gelo para a realização da mensuração por meio de espectrofotômetro de microvolume para RNA, com utilização de água ultrapura para a calibragem do aparelho e depois feita a avaliação das amostras. Foi realizada a diluição dos miRNAs (Tabela 2) a serem utilizados no PCR. As amostras de miRNAs diluídas foram pipetadas em novo Eppendorf com adição de água. Foi realizado o PCR com um *pool* de amostras controles e miRNAs, além de SYBR e água ultrapura, sendo adicionados 2 microlitros de cDNA/plasma, 2 microlitros de água ultrapura, 1 microlitro de primer e 5 microlitros de SYBR em cada poço da placa. Primeiramente, colocou-se a 60° C no PCR para avaliar se iriam anelar com o *pool* de plasma; após isso, foram sendo rodadas as placas. O miRNA RNU6 foi utilizado como controle endógeno das amostras. Foram utilizadas placas de PCR de 96 poços para a análise dos miRNAs. O pré-miRNA 129 e sua forma ativa, assim como o pré-miRNA 139 e sua forma ativa, apresentaram hibridização à temperatura de 58 °C. O miRNA 181a ativo foi processado à temperatura de 62 °C, enquanto o pré-miRNA 181a não apresentou hibridização em nenhuma das temperaturas testadas. O miRNA RNU6 foi utilizado como controle endógeno. A partir desse processo, obteve-se a expressão relativa dos miRNAs.

Tabela 2- Desenho dos miRNAs.

Nome da sequência	Sequência	Escala (nmol)	Número de bases
D - cfa-mir-181a1- P/F	AACATTCAACGCTGTCGGT	25	19
D - cfa-mir-181a1- P/R	AATCAACGGTCGATGGTT	25	18
D - cfa-mir-181a1- A/F	CGGCGGAACATTCAACGCTGTC	25	22
D - cfa-mir-181a1- A/R	CCACTCCAGCATAGGTCACGCTTATGGAGCCTGGGACGTGACC TATGCTG	25	50
D - cfa-mir-129 1 - P/F	CTTTTTCGGTCTGGGCTTG	25	20
D - cfa-mir-129 1- P/R	TACTTTTTGGGGTAAGGGCT	25	20
D - cfa-mir-129 1- A/F	CGGCGGCTTTTTGCGGTCTGGG	25	22
D - cfa-mir-129 1- A/R	GCAAGCAGCATAGGTCACGCTTATGGAGCCTGGGACGTGACCT ATGCTG	25	49
D - cfa-mir-139 - P/F	AACCGTGGCTTTCGATTGTT	25	20
D - cfa-mir-139 - P/R	GCGACCATGGCTGTAGACTGTTAC	25	24
D - cfa-mir-139 - A/F	CGGCGGGCGACCATGGCTGTAGA	25	23
D - cfa-mir-139 -A/R	TAACAGCAGCATAGGTCACGCTTATGGAGCCTGGGACGTGACC TATGCTG	25	50

A análise estatística foi realizada por meio do programa Grand Graph Prism, sendo avaliada primeiramente a normalidade dos dados pelo método de Shapiro Wilk, utilizando-se o nível de significância α igual a 0,05. Como p foi $> 0,05$, foi realizada análise por meio do teste de Mann-Whitney para comparação de 2 grupos (controle e epilético). Para análises envolvendo 3 grupos (controle, epiléticos com monoterapia e epiléticos com politerapia) foi realizado o método de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação de Dunn, considerando-se $p < 0,05$. Também foi realizada análise dos componentes principais (PCA) utilizando o aplicativo PAST, no qual foram avaliados os valores de pré-miRNA 129, miRNA 129 ativo, pré-miRNA 139, miRNA 139 ativo e miRNA 181a ativo, a fim de buscar a simplificação das variáveis do estudo. Os resultados foram então transformados em log para uma melhor análise.

2.3 RESULTADOS

A expressão relativa dos miRNAs 129, 139 e 181a é apresentada na Tabela 3.

Pelo teste de Shapiro-Wilk, os dados não apresentaram normalidade, sendo então realizados testes não paramétricos de Mann-Whitney entre os grupos controle e de animais epiléticos em relação ao pré-miRNA 129 e miRNA 129 ativo, bem como quanto à relação entre eles.

Não foi observada diferença entre o grupo controle e de cães epiléticos quanto à expressão relativa do pré-miRNA 129 ($p = 0,1818$). Na expressão relativa do miRNA 129 ativo, foi notada maior expressão no grupo de cães com epilepsia ($p = 0,0003$) em comparação ao grupo controle. Foi encontrada também maior relação da expressão relativa entre o miRNA ativo 129 e o pré-miRNA 129 nos cães do grupo epilético em relação aos do grupo controle ($p < 0,0001$), com maior dispersão desses dados no grupo de epiléticos (Fig. 1).

Tabela 3- Expressão relativa dos miRNAs 129, 139 e 181a em cães saudáveis e com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia ou à politerapia.

Amostra	pré- miRNA 129	miRNA 129 ativo	miRNA 129 ativo/ pré-miRNA 129	pré- miRNA 139	miRNA 139 ativo	miRNA 139 ativo/ pré-miRNA 139	miRNA 181a ativo
C1	1,06	1,13	1,07	0,72	1,00	1,39	1,28
C2	1,04	1,57	1,52	1,05	0,79	0,75	1,28
C3	0,92	1,18	1,29	0,60	1,17	1,93	0,71
C4	0,88	1,06	1,20	0,64	0,93	1,45	1,69
C5	1,89	1,59	0,84	1,11	0,70	0,63	1,14
C6	1,58	1,33	0,84	1,23	0,86	0,69	1,61
C7	0,76	1,33	1,75	0,75	0,92	1,23	0,52
C8	1,38	1,34	0,97	1,58	1,61	1,02	0,84
C9	1,21	0,52	0,43	1,46	1,96	1,34	0,77
C10	1,45	1,61	1,11	0,90	1,04	1,16	1,24
C11	0,65	0,77	1,18	1,70	0,75	0,44	1,33
C12	1,27	0,45	0,36	1,54	1,05	0,68	1,12
C13	0,92	0,93	1,01	1,15	1,33	1,16	0,84
C14	0,58	1,48	2,54	1,15	0,99	0,86	1,13
A1	0,96	1,17	1,21	1,00	0,45	0,44	0,77
A2	0,31	3,01	9,76	0,92	2,45	2,65	0,20
A3	4,24	26,10	6,16	3,67	2,18	0,59	6,94
A4	1,61	6,53	4,05	0,28	1,62	5,72	1,86
A5	4,45	16,03	3,60	1,13	6,44	5,72	3,79
B1	0,36	0,63	1,78	0,39	0,76	1,93	0,40
B2	1,52	2,61	1,72	1,54	2,02	1,32	0,15
B3	0,78	1,53	1,97	0,20	0,33	1,63	0,43
B4	9,65	77,71	8,05	28,76	24,06	0,84	4,72
B5	4,53	58,19	12,84	46,47	34,35	0,74	3,51
B6	3,00	17,84	5,95	7,17	5,30	0,74	5,26
B7	0,59	1,67	2,81	0,38	0,62	1,63	0,86
B8	2,54	13,91	5,48	4,97	4,16	0,84	3,62
B9	1,21	2,56	2,11	0,42	0,68	1,63	0,59

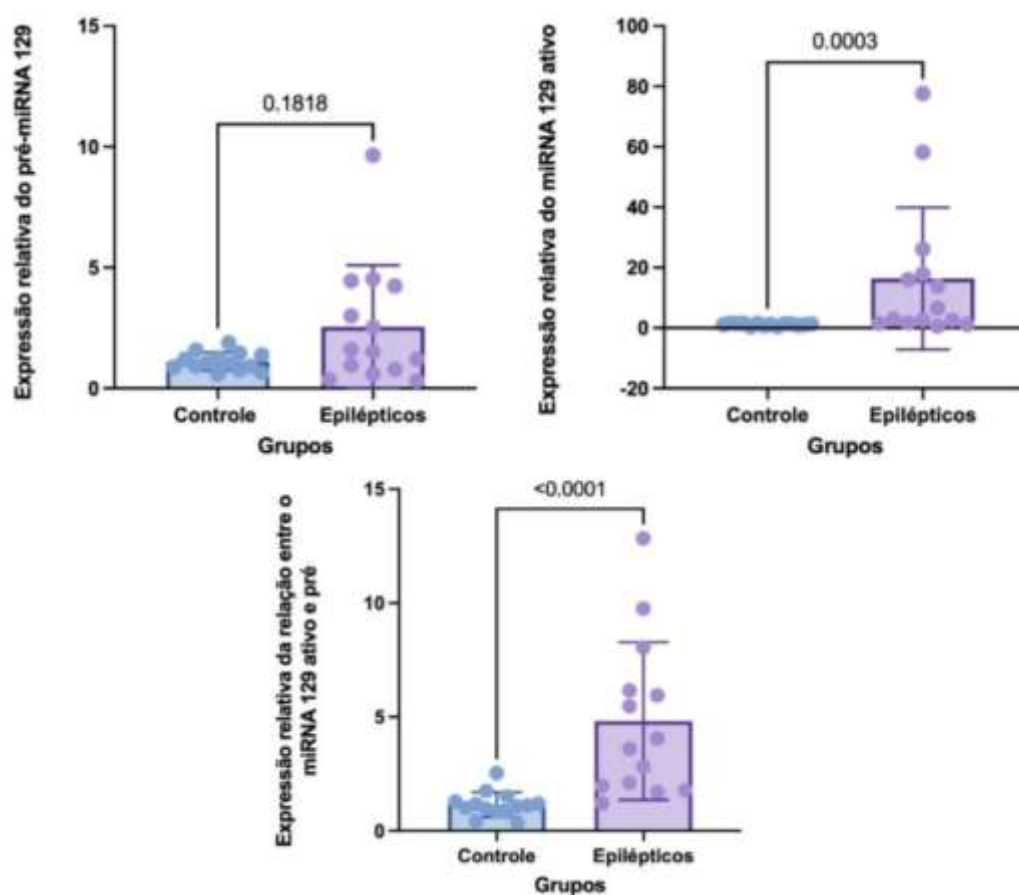


Figura 1. Expressão relativa do pré-miRNA 129, miRNA 129 ativo e a relação entre o ativo e o pré nos cães dos grupos controle e com epilepsia idiopática. Mann-Whitney.

Não foi verificada diferença entre os grupos controle e com epilepsia idiopática quanto à expressão relativa do pré-miRNA 139 ($p = 0,9909$), bem como quanto à expressão relativa do miRNA 139 ativo ($p = 0,1936$) e à relação entre ambos ($p = 0,2404$) (Fig. 2).

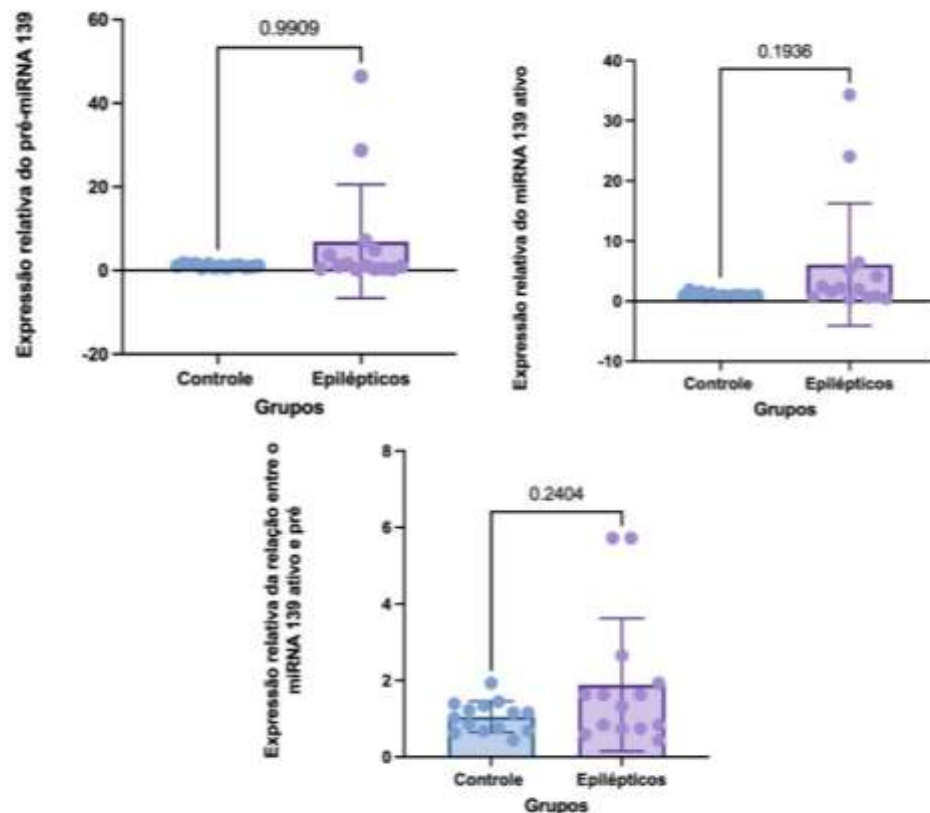


Figura 2. Expressão relativa do pré-miRNA 139, miRNA 139 ativo e a relação entre o ativo e o pré nos cães dos grupos controle e com epilepsia idiopática. Mann-Whitney.

Somente o miRNA 181a ativo foi anelado, não sendo possível realizar a análise do pré-miRNA 181a e a determinação da relação entre eles. Quanto à expressão relativa do miRNA 181a ativo, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos controle e de cães com epilepsia idiopática ($p=0,7089$) (Fig. 3).

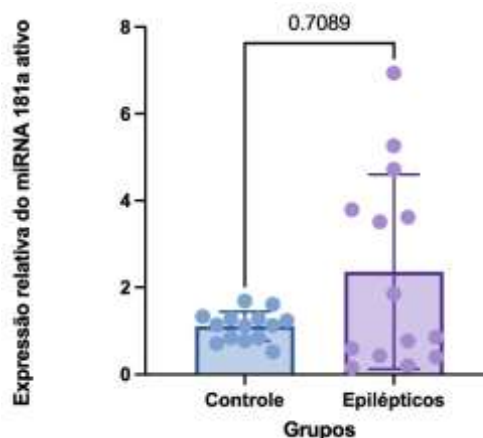


Figura 3. Expressão relativa do miRNA 181a ativo nos cães dos grupos controle e com epilepsia idiopática. Mann-Whitney.

Após análise inicial considerando-se 2 grupos (com e sem epilepsia idiopática), foi considerada a existência de 3 grupos (controle, epiléticos com monoterapia e epiléticos com politerapia). Novamente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar normalidade dos dados, porém alguns grupos não apresentaram normalidade. Com isso, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn para comparação entre tais grupos.

Não foi encontrada diferença em relação à expressão relativa do pré-miRNA 129 ($p=0,3980$) e nem nas comparações entre grupos - controle versus monoterapia ($p = 0,911$); controle versus politerapia ($p = 0,7273$); monoterapia versus politerapia ($p > 0,9999$).

A expressão relativa do miRNA 129 ativo foi maior nos grupos de cães com epilepsia idiopática em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0026$), sendo $p=0,0296$ na comparação entre os submetidos à monoterapia e os controles e $p=0,0082$ entre os submetidos à politerapia e os controles. Não foi encontrada diferença entre os cães epiléticos submetidos à monoterapia e à politerapia ($p > 0,9999$). Dessa forma, o pré-miRNA 129 parece estar, de forma geral, mais hiperexpresso nos cães epiléticos, porém sem diferença entre os que realizam monoterapia ou politerapia.

Na avaliação da relação entre a expressão relativa do miRNA 129 ativo e do pré-miRNA 129 também se encontrou diferença significativa ($p=0,002$), sendo $p=0,0069$ na comparação entre os submetidos à monoterapia e os controles e $p=0,0011$ entre os controles e os submetidos à politerapia. Não foi encontrada diferença entre os cães epiléticos submetidos à monoterapia e à politerapia ($p>0,9999$) (Fig. 4).

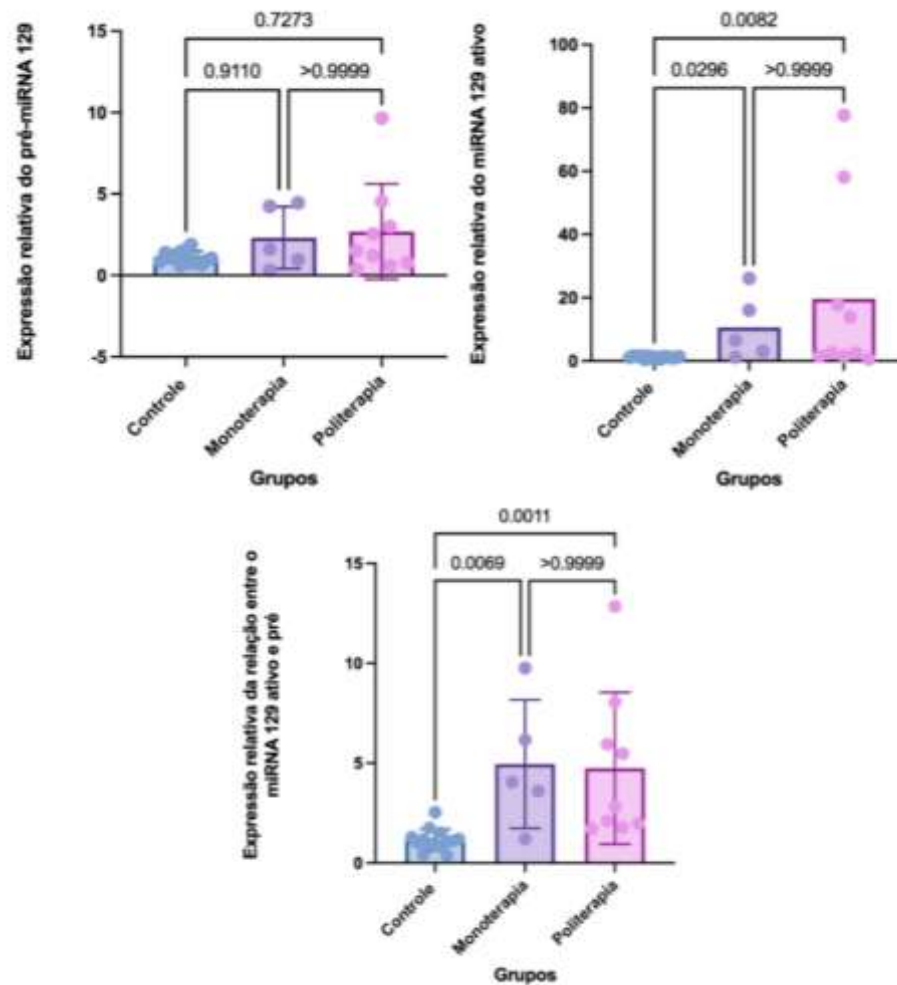


Figura 4. Expressão relativa do pré-miRNA 129, miRNA 129 ativo e a relação entre ativo e pré nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia. Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn.

Não foi observada diferença entre os grupos controle e com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e à politerapia quanto à expressão relativa do pré-miRNA 139 ($p=0,847$), bem como entre os controles e os epiléticos submetidos à monoterapia e à politerapia ($p>0,9999$). Na avaliação do miRNA 139 ativo também não foi encontrada diferença entre grupos ($p=0,3396$) (Fig. 5), sendo $p=0,4905$ na comparação entre os cães submetidos à monoterapia e os controles e $p>0,9999$ entre os controles e os submetidos à politerapia. Igualmente não houve diferença significativa na relação entre a expressão relativa do miRNA 139 ativo e do pré-miRNA 139 nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia ($p=0,4736$) (Fig.

5), sendo $p=0,8930$ entre os submetidos à monoterapia e os controles e $p>0,9999$ entre os controles e os submetidos à politerapia (Fig. 5).

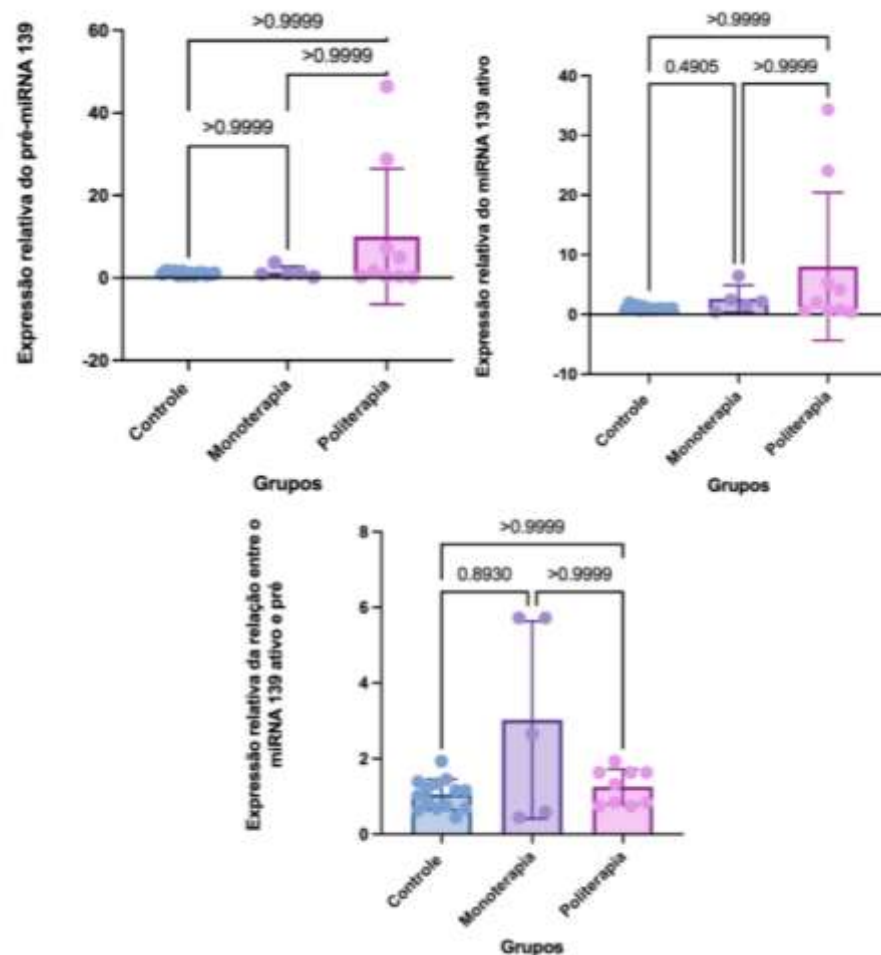


Figura 5. Expressão relativa de pré-miRNA 139, miRNA 139 ativo e a relação entre ativo e pré nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia. Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn.

Conforme previamente mencionado, como apenas o miRNA 181a ativo foi anelado, não foi possível realizar a análise do pré-miRNA 181a e a determinação da relação entre eles. Na expressão do miRNA 181a ativo não houve diferença entre os grupos ($p=0,7373$) (Fig. 6), sendo $p > 0,9999$ na comparação entre controles e submetidos à monoterapia e entre controles e submetidos à politerapia.

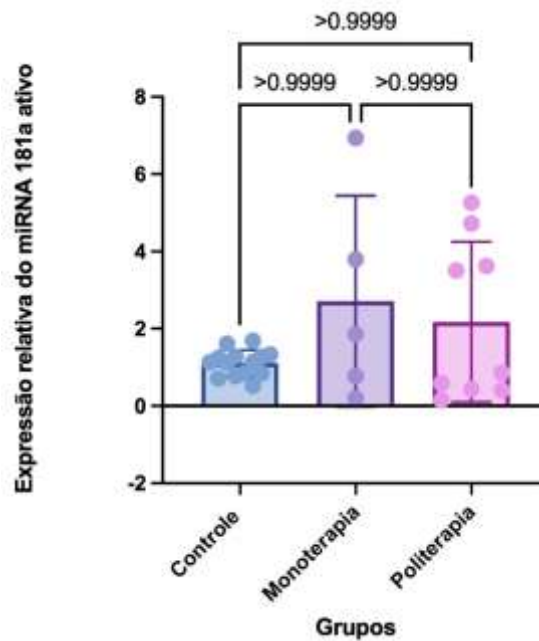


Figura 6. Expressão relativa de miRNA 181a ativo nos cães dos grupos controle, com epilepsia idiopática submetidos à monoterapia e com epilepsia idiopática submetidos à politerapia. Kruskal-Wallis, seguido por teste de Dunn.

Na análise de PCA avaliando primeiramente os grupos controle, epiléticos com monoterapia e epiléticos com politerapia quanto aos resultados do pré-miRNA 129, miRNA 129 ativo, pré-miRNA 139, miRNA 139 ativo e miRNA 181a ativo, foi visualizado uma distribuição mais concentrada do grupo controle se comparado aos epiléticos (Fig.7).

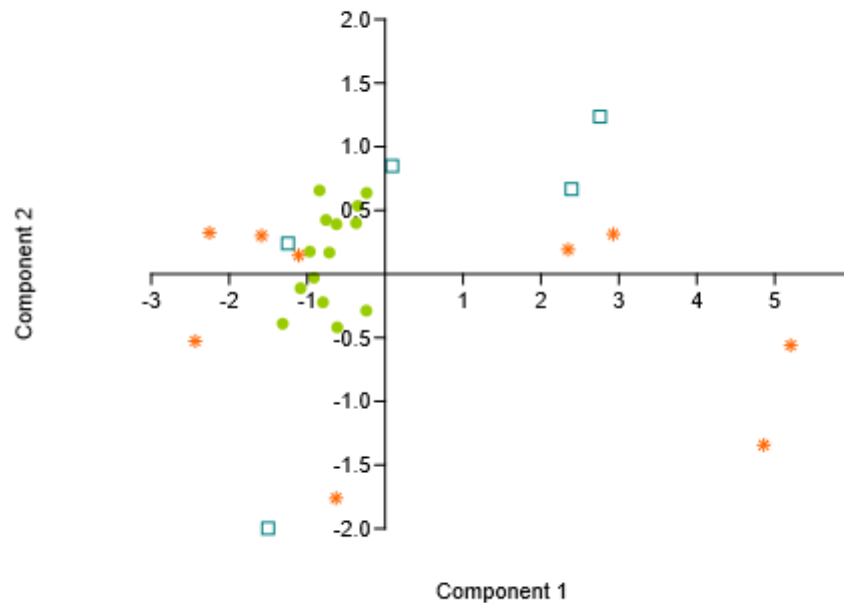


Figura 7- Gráfico de *Scatter Plot*, no qual os círculos verdes representam dados do grupo controle, quadrados azuis representam dados do grupo epiléticos com monoterapia e asteriscos vermelhos, epiléticos com politerapia.

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo referentes ao miRNA 129 ativo e à relação entre o ativo e o pré-miRNA em cães epiléticos mostram-se relevantes uma vez que corroboram os achados no plasma e no tecido nervoso em humanos com epilepsia refratária descritos por Sun *et al* (2016). Nesse contexto, cães epiléticos parecem apresentar hiperexcitabilidade neuronal relacionada à hiperexpressão do miRNA 129 em relação aos animais controles.

Por sua vez, a hipoeexpressão do miRNA 129 foi observada em pacientes humanos com autismo e certos tipos de epilepsia, como a epilepsia do lobo temporal, sendo sugerido que tal diminuição levaria a falhas no silenciamento de genes-alvo, o que resultaria na hiperexcitabilidade característica de tais condições patológicas (BRENNAN; HENSHALL, 2020). Tal contradição em relação ao presente estudo poderia estar associada à isoforma

avaliada e à diferença do material analisado, já que eles utilizaram a isoforma miRNA 129-2-3p e no presente estudo foi utilizado o miRNA 129.

O miRNA 129-2-3p, em particular, parece contribuir para a epilepsia por meio da regulação da expressão da subunidade $\alpha 1$ do receptor inibitório GABA A (GABRA1), mais do que interferindo na expressão de receptores de glutamato. No modelo experimental de epilepsia induzida por ácido kaínico, verificou-se concomitante redução da expressão de receptores GABRA1 em neurônios hipocampais primários de ratos tratados com ácido kaínico e aumento do nível de miRNA 129-2-3p como visualizado no trabalho de WANG *et al.* (2021).

É descrito que o miRNA 129, especificamente o 129-5p e o 129-1-3p, atua como um importante regulador da sinalização glutamatérgica e da plasticidade neural, normalmente tendo como alvo as subunidades de receptores NMDA (NMDARs) para modular neuroplasticidade, memória e declínio cognitivo. Sua relação com receptores glutamatérgicos é geralmente inibitória no nível pós-transcricional como visto por RAJAMAN *et al.* (2017).

No presente estudo, entretanto, não se identificou diferença na expressão do miRNA 129 entre os grupos de cães epiléticos submetidos à monoterapia e à politerapia, o que talvez esteja relacionado ao baixo número de animais em cada grupo. Se a diferença na expressão do miRNA 129 ativo for comparada entre o grupo controle e os grupos de animais epiléticos, os que realizam politerapia parecem apresentar uma expressão maior em relação ao grupo controle do que os que realizam monoterapia, sendo, portanto, necessário aumentar a amostragem, principalmente na comparação entre os grupos, além da necessidade de avaliação de mais informações clínicas da população considerada, como *clusters*, *status epilepticus* e período entre as crises.

García-Garcia *et al.* (2024) também analisaram miRNAs em cães epiléticos refratários, observando que o miRNA 132 demonstrou alta sensibilidade para o reconhecimento dos animais refratários ao tratamento em relação aos cães sensíveis por estar hiperexpresso nos primeiros. No estudo, foram utilizados 9 cães sensíveis ao tratamento, 6 cães com refratariedade e 8 cães hígidos, com um n amostral inferior em relação à presente investigação.

Em humanos e modelos animais refratários à medicação, assim como na epilepsia do lobo temporal, o miRNA 139 parece estar hipoexpresso, como descrito por Alsharafí *et al.* (2016). Em nosso estudo, porém, não foram observadas diferenças significativas entre grupos na expressão do miRNA 139, podendo tal ausência estar relacionada com a espécie animal analisada e com o fato de que os animais epiléticos já estavam fazendo tratamento medicamentoso para controle das crises. Além disso, não dispomos de informações sobre o

quão refratários esses cães realmente eram, avaliando interações, *clusters*, *status epilepticus* e período interictal. Também deve ser considerado que a análise foi feita por meio do plasma e não do tecido, o que pode interferir diretamente nos resultados obtidos pela expressão de padrões distintos, como, por exemplo, tentativas do organismo de compensação mediante liberação de miRNA 139 na circulação como estratégia de neuroproteção do tecido encefálico diante da queda desse miRNA na região após um quadro de hiperexcitabilidade. Adicionalmente, a circulação periférica tem dinâmicas diferentes do tecido encefálico, além de, nem todo miRNA atravessar a barreira hematoencefálica e o plasma poder sofrer interferências diante de quadros inflamatórios, hemólise e outras condições do organismo. Brennan *et al.* (2020) demonstraram que miRNAs plasmáticos alterados em modelos experimentais e em pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentavam provável origem em neurônios e micróglia, sugerindo que biomarcadores circulantes podem refletir alterações patológicas encefálicas, pois estão associados ao complexo Argonaute2- RISC em neurônios e micróglia, corroborando essa tese.

Na análise estatística realizada, mesmo retirando-se os resultados *outliers*, o miRNA 139 não apresentou aumento no valor de p. Com isso, pode-se acreditar que esse miRNA realmente não esteja alterado nos cães epiléticos e nem nos animais que utilizam monoterapia e politerapia. Entretanto, para tal hipótese ser melhor embasada seria necessária uma amostragem maior de animais no estudo.

O miRNA 181a está relacionado diretamente com a resposta neuroinflamatória, apresentando-se hiperexpresso no hipocampo de ratos epiléticos no estudo de Kong *et al.* (2020). Observou-se em ratos epiléticos que a inibição do miRNA-181a-5p foi capaz de reduzir a ativação astrocitária e microglial, bem como o estresse oxidativo tecidual, por ativação de SIRT1. No presente estudo, a análise do plasma não identificou alterações significativas na expressão do miRNA 181a ativo. Esse achado pode estar relacionado ao consumo do miRNA no foco epileptogênico, ou seja, no tecido encefálico, sem refletir em aumento direto no plasma. Outra hipótese é a ocorrência de uma resposta compensatória periférica, na qual o miRNA estaria hiperexpresso no tecido encefálico para participação na resposta inflamatória, enquanto o organismo modularia sua expressão periférica na tentativa de limitar o dano inflamatório.

Além disso, outros fatores podem interferir nesses resultados, como a fase da doença e a intensidade da resposta neuroinflamatória apresentada por cada animal. Deve-se considerar ainda que os cães epiléticos incluídos no presente estudo utilizavam terapia medicamentosa para controle das crises, com o objetivo de reduzir episódios de *cluster* e *status epilepticus* e,

consequentemente, a neuroinflamação associada a esses eventos. Por fim, até o momento, não existem estudos avaliando o miRNA 181a na espécie estudada, o que limita a comparação dos resultados e a definição de um padrão para esses animais.

Na análise de PCA, observou-se maior dispersão dos animais epiléticos em politerapia e monoterapia, do que no grupo controle, indicando possível maior variabilidade biológica ou molecular nos cães epiléticos. Tal achado é um possível indicativo de diferenças individuais relacionadas à gravidade clínica, à refratariedade terapêutica, ao tempo de evolução ou à própria resposta aos anticonvulsivantes, fatores frequentemente associados à necessidade de múltiplas medicações, com isso exigindo uma análise mais cuidadosa a partir de informações adicionais.

Possivelmente, para estudos futuros, deve-se considerar o aumento do tamanho amostral e a inclusão de variáveis clínicas mais detalhadas, como histórico de internações por crises em *cluster* e/ou *status epilepticus*, assim como o momento da última crise, uma vez que esses fatores podem influenciar os perfis de expressão de miRNAs, por conta da ocorrência de neuroinflamação, hiperexcitabilidade e até mesmo apoptose neuronal.

A diferença apresentada entre a expressão do pré-miRNA e do miRNA ativo pode estar diretamente relacionada à instabilidade dessas moléculas no plasma, uma vez que alterações estruturais no pré-miRNA, como modificações na conformação da estrutura *hairpin*, pareamentos imperfeitos de bases ou variações na sequência nucleotídica podem interferir na sua ligação com as proteínas transportadoras e, assim comprometer a sua estabilidade e detecção, conforme descrito por Ding e Wang (2025). Essas variações estruturais podem reduzir a estabilidade do miRNA maduro e dificultar sua hibridização eficiente com sequências-alvo ou sondas utilizadas em análises moleculares, contribuindo para diferenças nos níveis de expressão detectados entre o pré-miRNA e o miRNA ativo, conforme identificado no presente trabalho.

A terapia anticonvulsivante também pode interferir diretamente nos perfis de expressão observados, uma vez que fármacos antiepiléticos, como o fenobarbital, podem aumentar a ação inibitória do GABA no sistema nervoso central. Já o brometo de potássio atua aumentando a hiperpolarização da membrana neuronal, a fim de reduzir a excitabilidade celular, e o levetiracetam modula a liberação de neurotransmissores e, ao mesmo tempo, reduz a sincronização neuronal, podendo ocasionar interferência direta nos miRNAs.

2.5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram hiperexpressão do miRNA pré 129 e do miRNA 129 ativo nos cães com epilepsia idiopática em relação aos cães saudáveis, tanto nos que realizavam monoterapia quanto naqueles submetidos à politerapia, sugerindo possível envolvimento desse miRNA na fisiopatologia da doença.

Não foram encontradas, no entanto, diferenças entre cães epiléticos e não-epiléticos em relação aos demais miRNAs investigados (139 e 181a). Estudos adicionais com maior tamanho amostral e melhor caracterização clínica dos animais são necessários para confirmação de tais constatações.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não possuem conflitos de interesse financeiros, pessoais ou institucionais que possam ter influenciado os resultados ou a interpretação dos dados apresentados neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos colaboradores envolvidos neste estudo pelas contribuições científicas e suporte durante o desenvolvimento da pesquisa. Agradecem aos médicos veterinários Elídia Zotelli dos Santos, Carla Sarkis e Luis Felipe Moya Gomes, que contribuíram com o encaminhamento dos casos clínicos, tornando possível a composição da casuística deste estudo. Aos técnicos de laboratório Leonardo Mourão Carvalho, Suzana Maria Bezerra, Cleide Marques da Silva Santa e Natalia Bispo Vieira de Melo, pelo apoio técnico e aos responsáveis dos animais participantes, pela confiança e colaboração.

2.6 REFERÊNCIAS

- ALSHARAFI, W. A.; XIAO, B.; LI, J. MicroRNA-139-5p negatively regulates NR2A-containing NMDA receptor in the rat pilocarpine model and patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2016; 57:1931-1940. <https://doi.org/10.1111/epi.13568>
- BRENNAN, G. P.; HENSHALL, D. C. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2020; 16:506-519. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0369-8>
- DING, S.; WANG, P. The life of microRNAs: Biogenesis, function and decay in cancer. *Biomolecules* 2025; 15:1-30. <https://doi.org/10.3390/biom15101393>
- EKER, E. D. Identification of new miRNA biomarkers for epilepsy: A qRT-PCR-based profiling study. *Bratisl Lek Listy.* 2026; 127:1-21. <https://doi.org/10.1007/s44411-026-00521-5>.
- GARCÍA-GRACIA, M.; MORENO-MARTINEZ, L.; HERNAIZ, A.; USÓN, S.; MORAL, J.; SANZ-RUBIO, D.; ZARAGOZA, P.; PALACIO, J.; ROSADO, B.; OSTA, R.; GARCÍA-BELENQUER, S.; BURRIEL, I. M. Analysis of plasma-derived exosomal microRNAs as potential biomarkers for canine idiopathic epilepsy. *Animals* 2024; 14:1-15. <https://doi.org/10.3390/ani14020252>
- KONG, H.; WANG, H.; ZHUO, Z.; LI, Z.; TIAN, P.; WU, J.; LIU, J.; CHEN, Z.; ZHANG, J.; LUO, Q. Inhibition of miR-181a-5p reduces astrocyte and microglia activation and oxidative stress by activating SIRT1 in immature rats with epilepsy. *Lab Invest.* 2020; 100:1223-1237. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0444-1>.
- RAJMAN, M.; METGE, F.; FIORE, R.; KHUDAYBERDIEV, S.; AKSOY-AKSEL, A.; BICKER, S.; RESCHKE, C. R.; RAOOF, R.; BRENNAN, G. P.; DELANTHY, N.; FARELL, M. A.; O'BRIEN, D. F.; BAUER, S.; NORWOOD, B.; VENO, M. T.; KRÜGER, M.; BRAUN, T.; KJEMS, J.; ROSENOW, F.; HENSHALL, D. C.; DIETRICH, C.; SCHRATT, G. A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. *Embo J.* 2017; 36:1771-1787. <https://doi.org/10.15252/embj.201695748>

SUN, Y.; WANG, X.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; CHE, N.; LUO, X.; TAN, Z.; SUN, X.; LI, X.; Yang, K.; Wang, G.; LUAN, L.; LIU, Y.; ZHENG, X.; WEI, M.; CHENG, H.; YIN, J. Expression of microRNA-129-2-3p and microRNA 935 in plasma and brain tissue of human refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 2016; 127:276-283.
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2016.09.016>

VLIET, E. A. V.; SCHEPER, M.; MILLS, J. D.; PUHAKKA, N.; SZYDLOWSKA, K.; FERRACIN, M.; LOVISARI, F.; SOUKUPOVA, M.; ZUCCHINI, S.; SRIVASTAVA, P. K.; JOHNSON, M. R.; LUKASIUK, K.; GORTER, J. A.; ARONICA, E.; PITKÄNEN, A.; SIMONATO, M. Circulating microRNAs and isomiRs as biomarkers for the initial insult and epileptogenesis in four experimental epilepsy models: The EPITARGET study. *Epilepsia.* 2024; 65:3406-3420. <https://doi.org/10.1111/epi.18134>

WANG, G. Y.; LUAN, Z. L.; CHE, N. W.; YAN, D. B.; SUN, X. W.; ZHANG, C.; YIN, J. Inhibition of microRNA-129-2-3p protects against refractory temporal lobe epilepsy by regulating GABRA1. *Brain Behav.* 2021; 11(7): e02195. <https://doi.org/10.1002/brb3.2195>.

XIE, G.; CHEN, H.; HE, C.; HU, S.; XIAO, X.; LUO, Q. The dysregulation of miRNAs in epilepsy and their regulatory role in inflammation and apoptosis. *Funct Integr Genomics* 2023; 23(6):276. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01220-y>

REFERÊNCIAS

- ALSHARAFI, W. A.; XIAO, B.; LI, J. MicroRNA-139-5p negatively regulates NR2A-containing NMDA receptor in the rat pilocarpine model and patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 57, n. 11, p. 1931-1940, 2016.
- ANTÔNIO, L. G. L.; FREITAS-LIMA, P.; DA SILVA, G. P.; ASSIRATI JR, J. A.; MATIAS, C. M.; CIRINO, M. L. A.; TIRAPELLI, L. F.; VELASCO, T. R.; SAKAMOTO, A. C.; CARLOTTI JR, C. G.; TIRAPELLI, D. P. C. Expression of MicroRNAs miR-145, miR181c, miR199a and miR1183 in the Blood and Hippocampus of Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 69, n. 4, p. 580-587, 2019.
- BÉLEN, R.; JORGE, P.; CAROLINA, M.; SYLVIA, G-B. Neurobehavioral comorbidities in canine idiopathic epilepsy: new insights into cognitive and emotional domains. **Animals**, v. 15, n.1592, p.1-18, 2025.
- BRENNAN, G. P.; HENSHALL, D. C. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. **Nature Reviews. Neurology**, v. 16, n. 9, p. 506-519, 2020.
- CHARALAMBOUS, M.; MUÑANA, K.; PATTERSON, E. E.; PLATT, S. R.; VOLK, H. A. ACVIM Consensus statement on the management of status epilepticus and cluster seizures in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 38, n. 1, p.19- 40, 2024.
- CHEN, Y.; MATESKI, J.; GERACE, L.; WHEELER, J.; BURL, J.; PRAKASH, B.; SVEDIN, C.; AMRICK, R.; ADAMS, B. D. Non-coding RNAs and neuroinflammation: implications for neurological disorders. **Experimental Biology and Medicine**, v. 28, n.248, p.1- 23, 2024.
- DE RISIO, L.; BHATTI, S.; MUÑANA, K.; PENDERIS, J.; STEIN, V.; TIPOLD, A.; BERENDT, M.; FARQUHAR, R.; FISCHER, A.; LONG, S.; MANDIGERS, P. J. J.; MATIASSEK, K.; PACKER, R. M. A.; PAKOZDY, A.; PATTERSON, N.; PLATT, S.; PODELL, M.; POTSCHKA, H.; BATLLE, M. P.; RUSBRIDGE, C.; VOLK, H. A. International veterinary epilepsy task force consensus proposal: diagnostic approach to epilepsy in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 148, p. 1-11, 2015.
- DING, S.; WANG, P. The life of microRNAs: biogenesis, function and decay in cancer. **Biomolecules**, v. 15, p. 1-30, 2025.
- EKER, E. D. Identification of new miRNA biomarkers for epilepsy: A qRT-PCR-based profiling study. **Bratislava Medical Journal**. p. 1-21, 2026.
- ERLEN, A.; POTSCHKA, H.; VOLK, H. A.; SAUTER-LOUIS, C.; O'Neill, D.G. Seizure occurrence in dogs under primary veterinary care in the UK: prevalence and risk factors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 5, p.1665-1667.

FENG, Y.; YANG, H.; YUE, Y.; TIAN, F. MicroRNAs and target genes in epileptogenesis. *Epilepsia*, v. 61, n.10, p.2086-2096, 2020.

GARCÍA-GRACIA, M.; MORENO-MARTINEZ, L.; HERNAIZ, A.; USÓN, S.; MORAL, J.; SANZ-RUBIO, D.; ZARAGOZA, P.; PALACIO, J.; ROSADO, B.; OSTA, R.; GARCÍA-BELENQUER, S.; BURRIEL, I. M.; Analysis of plasma-derived exosomal microRNAs as potential biomarkers for canine idiopathic epilepsy. **Animals**, v. 14, n. 252, p. 1-15, 2024.

GHAFOURI-FARD, S.; HUSSEN, B. M.; ABAK, A.; TAHERI, M.; KHOSHNOUD. Aberrant expression of miRNAs in epilepsy. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 6, p. 5057-5074, 2022.

HUANG, Y.; JIANG, J.; ZHENG, G.; CHEN, J.; LU, H.; GUO, H.; WU, C. miR-139-5p modulates cortical neuronal migration by targeting Lis1 in a rat model of focal cortical dysplasia. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, p. 1407-1414, 2014.

KADLER, G. T.; LINDEN, A. Z.; GAITERO, L.; JAMES, F. M. K. Diffusion tensor imaging for detecting biomarkers of idiopathic epilepsy in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 1480860, 2024.

KÄHN, C.; MEYERHOFF, N.; MELLER, S.; NESSLER, J. N.; VOLK, H. A.; CHARALAMBOUS, M. The postictal phase in canine idiopathic epilepsy: Semiology, management, and impact on the quality of life from the owners' perspective. **Animals**, v. 14, n.103, p. 1-14, 2024.

KOEHLER, J.; SANDEY, M.; PRASAD, N.; LEVY, S. A.; WANG, X.; WANG, X. Differential expression of miRNAs in hypoxia ("HypoxamiRs") in three canine high-grade glioma cell lines. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 104, p. 1-12, 2020.

KONG, H.; WANG, H.; ZHUO, Z.; LI, Z.; TIAN, P.; WU, J.; LIU, J.; CHEN, Z.; ZHANG, J.; LUO, Q. Inhibition of miR-181a-5p reduces astrocyte and microglia activation and oxidative stress by activating SIRT1 in immature rats with epilepsy. **Laboratory investigation**, v. 100, n. 9, p. 1223-1237, 2020.

MENG, J.; LUO, W.; ZHANG, N.; YU, M.; HE, Y.; CHEN, C.; SHUE, H.; YU, L. Silencing epileptic storms: targeting miRNA-lncRNA crosstalk in astrocytes and microglia to disarm neuroinflammatory triggers. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 18, p. 1-15, 2025.

NARITA, M.; NISHIDA, H.; ASAHINA, R.; NAKATA, K.; YANO, H.; DICKINSON, P. J.; TANAKA, T.; AKIYOSHI, H.; MAEDA, S.; KAMISHINA, H. Expression of microRNAs in plasma and in extracellular vesicles derived from plasma for dogs with glioma and dogs with other brain diseases. **American Journal of Veterinary Research**, v. 81, n.4, p. 355-360, 2020.

PLONEK, M.; DIAZ-ESPINEIRA, M. M.; STASSEN, Q. E. M.; SANTIFORT, K. M.; LEEGWATER, P. A. J.; MANDIGERS, P. J. J. Phenotypic characterization of idiopathic epilepsy and epilepsy of unknown cause in Irish Setters. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 1066094, 2022.

- PODELL, M.; VOLK, H. A.; BERENDT, M.; LÖSCHER, W.; MUÑANA, K.; PATTERSON, E. E.; PLATT, S. R. 2015 ACVIM Small animal consensus statement on seizure management in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 477-490, 2016.
- RAJMAN, M.; METGE, F.; FIORE, R.; KHUDAYBERDIEV, S.; AKSOY-AKSEL, A.; BICKER, S.; RESCHKE, C. R.; RAOOF, R.; BRENNAN, G. P.; DELANTHY, N.; FARELL, M. A.; O'BRIEN, D. F.; BAUER, S.; NORWOOD, B.; VENO, M. T.; KRÜGER, M.; BRAUN, T.; KJEMS, J.; ROSENOW, F.; HENSHALL, D. C.; DIETRICH, C.; SCHRATT, G. A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 12, p. 1771-1787, 2017.
- REN, L.; ZHU, R.; LI, X. Silencing miR-181a produces neuroprotection against hippocampus neuron cell apoptosis post-status epilepticus in a rat model and in children with temporal lobe epilepsy. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p.1-11, 2016.
- RUAN, Y.; DENG, X.; LIU, J.; XIAO, X.; YANG, Z. Identification of miRNAs in extracellular vesicles as potential diagnostic markers for pediatric epilepsy and drug-resistant epilepsy via bioinformatics analysis. **Frontiers in Pediatrics**, v. 11, p. 1-12, 2023.
- RÜDEN, E. L.; POTSCHKA, H.; TIPOLD, A.; STEIN, V. M.; The role of neuroinflammation in canine epilepsy. **The Veterinary Journal**, v. 298-299, p. 1-9, 2023.
- SCHMITTGEN, T. D.; LEE, E. J.; JIANG, J.; SARKAR, A.; YANG, L.; ELTON, T. S.; CHEN, C. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. **Methods**, v. 44, n. 1, p. 31-38, 2008.
- SILVESTRINO, M.; PIROLO, M.; BIANCO, A.; CASTELLANA, S.; SAMBRO, L. D.; TARALLO, V. D.; GUARDABASSI, L.; ZATELLI, A.; GERNONE, F. Idiopathic epilepsy in dogs is associated with dysbiotic faecal microbiota. **Animal Microbiome**, v. 7, n.31, p.1-8, 2025.
- SONAWANE, S.; VSIANSKY, V.; BRÁZDIL, M. MicroRNA-mediated regulation of neurotransmitter receptors in epilepsy: a systematic review. **Epilepsy & Behavior**, v. 158, p. 1-7, 2024.
- SUN, Y.; WANG, X.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; CHE, N.; LUO, X.; TAN, Z.; SUN, X.; LI, X.; Yang, K.; Wang, G.; LUAN, L.; LIU, Y.; ZHENG, X.; WEI, M.; CHENG, H.; YIN, J. Expression of microRNA-129-2-3p and microRNA 935 in plasma and brain tissue of human refractory epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 127, p. 276-283, 2016.
- TIWARI, D.; PEARISO, K.; GROSS, C.; MicroRNA- Induced silencing in epilepsy: Opportunities and challenges for clinical application. **Developmental Dynamics**, v. 247, n. 1, p. 94-110, 2018.

VASILIEVA, A. A.; TIMECHKO, E. E.; LYSOVA, K. D.; PARAMOVA, A. I.; YAKIMOV, A. M.; KANTIMIROVA, E. A.; DMITRENKO, D. V.; Micro RNAs as potential biomarkers of post- traumatic epileptogenesis: A systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p.1-27, 2023.

VLIET, E. A. V.; SCHEPER, M.; MILLS, J. D.; PUHAKKA, N.; SZYDLOWSKA, K.; FERRACIN, M.; LOVISARI, F.; SOUKUPOVA, M.; ZUCCHINI, S.; SRIVASTAVA, P. K.; JOHNSON, M. R.; LUKASIUK, K.; GORTER, J. A.; ARONICA, E.; PITKÄNEN, A.; SIMONATO, M. Circulating microRNAs and isomiRs as biomarkers for the initial insult and epileptogenesis in four experimental epilepsy models: The EPITARGET study. **Epilepsia**, v. 65, p.3406- 3420, 2024.

WANG, G. Y.; LUAN, Z. L.; CHE, N. W.; YAN, D. B.; SUN, X. W.; ZHANG, C.; YIN, J. Inhibition of microRNA-129-2-3p protects against refractory temporal lobe epilepsy by regulating GABRA1. **Brain and Behavior**, v. 11, n. 7, e02195, 2021.

XIE, G.; CHEN, H.; HE, C.; HU, S.; XIAO, X.; LUO, Q. The dysregulation of miRNAs in epilepsy and their regulatory role in inflammation and apoptosis. **Functional & Integrative Genomics**, v. 23, n. 3, p. 1-17, 2023.

YAO, Q.; CHEN, Y.; XIANG, Z. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 11-17, 2019.