

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Giovana Rech

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A INDUTORES DE CRISES EPILÉPTICAS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Rech, Giovana
Efeitos da exposição a indutores de crises
epilépticas sobre a bioenergética mitocondrial /
Giovana Rech. -- 2021.
98 f.
Orientador: Diogo Lösch de Oliveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Peixe-zebra. 2. Camundongo. 3. Encéfalo. 4.
Mitocôndria. 5. Bioenergética. I. Lösch de Oliveira,
Diogo, orient. II. Título.

Giovana Rech

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A INDUTORES DE CRISES EPILÉPTICAS SOBRE A
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre

2021

Dedico esta tese às pessoas que acreditam e colocam em prática a educação, o conhecimento e a sabedoria como aliados para construção de um mundo mais respeitoso.

“É que o analista, no decorrer das suas explicações acerca do amor como fator patogênico, na segunda-feira anterior, tratara justamente da epilepsia; esse mal que a humanidade, em tempos pré-analíticos, considerara ora uma prova sagrada, até mesmo profética, ora uma possessão do demônio, o dr. Krokowski qualificara-o em termos poéticos, mas também inexoravelmente científicos, como equivalente do amor e como orgasmo do cérebro;”

Thomas Mann (1875 – 1955)

Livro: A montanha mágica, capítulo: Dança macabra, p. 411

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha mãe – Maria Lúcia Zanotti Rech – que me deu a liberdade de optar pelo caminho menos confortável com o objetivo de me desenvolver profissionalmente. Obrigada por moldar meus valores, por provar que obstáculos podem ser fonte de motivação e me mostrar que devemos fazer o melhor que podemos nas condições existentes.

Agradeço ao meu querido pai – Roberto Antônio Rech – que é a figura mais compatível comigo em relação à personalidade (e sensibilidade), além do melhor exemplo de integridade, paciência e determinação.

Agradeço ao meu irmão – Vinícius Roberto Rech – por tantos anos de companheirismo e por trazer alegrias, ensinamentos e descontração à nossa família.

Agradeço ao meu incrível e sábio parceiro de vida – Matheus Parmegiani Jahn – que me ajudou na manutenção do equilíbrio entre a vida profissional e pessoal. De modo a discutir ciência e ensino e também compartilhar momentos agradáveis em casa, nessa quarentena infinita, e em lugares encantadores que tivemos – e ainda teremos – a chance de conhecer.

Agradeço à minha *belle famille* – Neusa, Júlio e Gabriel – pelo acolhimento tão genuíno que me faz sentir confortável, amparada e segura.

Agradeço às minhas inestimáveis amigas – Carol, Fran, Mila, Val, Gabi e Sara – que dispuseram de paciência e atenção para confissões, alegrias, apoio e comemorações.

Agradeço à minha primeira professora de bioquímica – Dra. Mirian Salvador – que despertou o meu interesse em metabolismo e ciência. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório onde me sinto em casa.

Agradeço ao meu orientador na França – Dr. Arnaud Mourier – que iluminou meu caminho diante de técnicas e conceitos. Foi quem me fez entender claramente a importância de pesquisa de qualidade. A chance de fazer parte de um grupo liderado por alguém motivador e confiante na ciência foi crucial para meu aprendizado.

Agradeço a todos meus colegas do laboratório 24, especialmente – Thai, Lu, Su, Kami e Re – por compartilharem momentos na bancada, pelos ensinamentos e pela colaboração.

Agradeço ao meu orientador – Dr. Diogo Losch de Oliveira – por ter aceitado me orientar e aberto os caminhos da minha trajetória na pesquisa, pela confiança depositada em mim que me tornaram mais resistente. Obrigada por me ensinar a importância do pensamento crítico e a prezar pela qualidade e aprimoramento do trabalho.

Obrigada aos funcionários (as) do Departamento de Bioquímica, do PPG Bioquímica e da UFRGS que proporcionaram um ambiente de aprendizagem e bom convívio para a minha experiência.

Agradeço às agências de fomento pelo financiamento deste trabalho: CAPES, CNPq e Fapergs.

RESUMO

As epilepsias afetam aproximadamente 1% da população mundial, sendo que 80% dos pacientes habitam países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e de 20 a 30% ou não tem acesso ou não respondem aos tratamentos disponíveis. As epilepsias causam grande prejuízo à qualidade de vida dos pacientes pelos sintomas associados e os problemas acometem também familiares e cuidadores visto que essas doenças ainda são muito estigmatizadas. Embora as etiologias das epilepsias sejam conhecidas em sua maioria, algumas causas desconhecidas desencadeiam episódios de crises epiléticas. O metabolismo encefálico de forma geral é investigado para esclarecimento da fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas, mais especificamente a função e/ou disfunção mitocondrial vem tendo muito mais atenção da comunidade científica. A disfunção mitocondrial é apontada como um fator de risco em alguns tipos de epilepsias genéticas, mas em casos de epilepsias adquiridas o seu papel permanece elusivo. Técnicas sofisticadas como a respirometria de alta resolução são empregadas e aprimoradas constantemente para a avaliação da função mitocondrial. Nesse contexto, avaliamos por meio de diferentes estratégias investigativas o efeito de indutores de crises epiléticas em modelos animais (peixe-zebra e camundongos) sobre a função mitocondrial. As questões deste estudo são: i) Os indutores de crises promovem danos mitocôndrias durante e após as crises epiléticas? ii) O pentilenotetrazol possui algum outro efeito sobre mitocôndrias além do estresse oxidativo já demonstrado? Os resultados observados mostram que o efeito agudo de pentilenotetrazol *in vitro* quando adicionado ao meio contendo células intactas e dissociadas de tecido encefálico de peixe-zebra aumenta a eficiência de acoplamento (p/O_2), o que pode indicar uma hidrólise aumentada de ATP neuronal. Também observamos aumento na capacidade de reserva no grupo *status epilepticus* induzido por ácido caínico *in vivo*, o que pode estar relacionado à capacidade mitocondrial de responder a um aumento na demanda de energia, especialmente em neurônios. Além disso, buscamos entender o papel das variações da concentração Ca^{2+} empregando concentrações de 500nm (repouso) e 5 μ M (ativação) em homogeneizado de tecido encefálico de peixe-zebra adulto. Nós observamos que a bioenergética mitocondrial é prejudicada de forma concentração-dependente, o estado 3, estado 4 e o desacoplamento são diminuídos pela presença de ambas concentrações de Ca^{2+} , corroborando com a diminuição do controle respiratório, indicativo de integridade mitocondrial. No entanto, o entendimento do papel do Ca^{2+} no metabolismo encefálico e na bioenergética permanece como perspectiva deste trabalho. Após, realizamos o isolamento de mitocôndrias a partir de fígado e encéfalo de camundongos e observamos que as mesmas mitocôndrias são afetadas quando expostas diretamente ao pentilenotetrazol, especificamente o complexo I é inibido, independente de desidrogenases e transporte e por mecanismo diferente a inibição causada por rotenona. Inferimos que as mitocôndrias encefálicas são mais sensíveis ao pentilenotetrazol porque concentrações mais baixas foram capazes de diminuir a atividade do complexo I em comparação com as mitocôndrias hepáticas. Por fim, o presente trabalho traz evidências que sustentam o conceito de que crises epiléticas estão relacionadas com comprometimento de funções mitocondriais, o que de forma translacional pode indicar contribuição da disfunção mitocondrial para a condição clínica de pacientes diagnosticados com epilepsias adquiridas. Isto é, indica-se considerar o dano mitocondrial como parte da fisiopatologia de epilepsias adquiridas. Dessa forma, a prevenção e/ou o reparo do dano mitocondrial podem ser estratégias de prevenção e tratamento adicionados às diretrizes clínicas.

Palavras-chave: peixe-zebra, camundongo, encéfalo, mitocôndria, bioenergética

ABSTRACT

Epilepsies affect approximately 1% of the world population, 80% of the patients live in underdeveloped or developing countries and 20% to 30% either do not have access to or do not respond to available treatments. Epilepsies impair the quality of life of patients due to associated symptoms; the problems also affect family members and caregivers as these diseases are still highly stigmatized. Although the etiologies of epilepsies are mostly known, some unknown causes trigger seizure episodes. Brain metabolism, in general, is investigated to clarify the pathophysiology of several neurodegenerative diseases. More specifically, mitochondrial function and/or dysfunction has been receiving much more attention from the scientific community. Mitochondrial dysfunction is identified as a risk factor in some types of genetic epilepsies, but its role remains elusive in cases of acquired epilepsies. Sophisticated techniques such as high-resolution respirometry are constantly applied and improved to assess mitochondrial function. In this context, we evaluated through different investigative strategies the effect of SE inducers in animal models (zebrafish and mice) on mitochondrial function. The questions of this study are: i) Do seizure inducers promote mitochondrial damage during and after epileptic seizures? ii) Does pentylenetetrazole have any other effects on mitochondria besides the oxidative stress already reported? We observed that the acute exposure to PTZ *in vitro* in the medium containing intact and dissociated cells from zebrafish brain tissue increases the coupling efficiency (p/O_2), which may indicate an increased hydrolysis of neuronal ATP. We also observed an increase in reserve capacity in the SE group induced by kainic acid *in vivo*, which may be related to the mitochondrial ability to respond to an increase in energy demand, especially neurons. We also sought to understand the role of variations in Ca^{2+} concentration using concentrations of 500nm (resting) and 5 μ M (activation) in adult zebrafish brain tissue homogenate. We observed that mitochondrial bioenergetics is concentration-dependently impaired, state 3, state 4 and uncoupled are impaired by the presence of both concentrations of Ca^{2+} , corroborating to the decrease in respiratory control, indicative of mitochondrial integrity. However, the understanding of the role of Ca^{2+} in brain metabolism and bioenergetics remains a perspective of this work. Afterwards, we performed the isolation of mitochondria from the liver and brain of mice and observed that the same mitochondria are affected when directly exposed to PTZ, specifically complex I is inhibited, independent of dehydrogenases and transport and by a different mechanism of the inhibition caused by rotenone. We imply that brain mitochondria are more sensitive to pentylenetetrazole because lower concentrations were able to impair complex I activity compared to liver mitochondria. Finally, the present work provides evidence that supports the concept that epileptic seizures are related to impairment of mitochondrial functions, which in a translational way may indicate the contribution of mitochondrial dysfunction to the clinical condition of patients diagnosed with acquired epilepsies. In other words, we should consider mitochondrial damage as part of the pathophysiology of acquired epilepsies. Thus, the prevention and/or repair of mitochondrial damage can be prevention and treatment strategies added to clinical guidelines.

Keywords: zebrafish, mouse, brain, mitochondria, bioenergetics

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPARs – Receptores ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AIF – *Apoptosis-inducing factor*
ATP – Adenosina-5'-trifosfato
CB1 – Receptores canabinóides do tipo 1
COR – Consumo de oxigênio residual
CRISPR/Cas9 – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9*
CRR – Capacidade respiratória de reserva
CTE – Capacidade do sistema de transferência de elétrons/respiração máxima
Dpf - Dias pós-fertilização
EEG – Eletroencefalografia
ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FCCP – Cianeto de carbonil-4- (trifluorometoxi) fenil-hidrazona
GABA_A – Receptores ácido γ -aminobutírico
H⁺ leak – Vazamento de prótons
ILAE – *International League Against Epilepsy*
MCU – *Mitochondrial calcium uniporter*
mHCX – H⁺-Ca²⁺ exchanger
mNCX – Na⁺-Ca²⁺ exchanger
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NMDARs – Receptores N-metil-D-aspartato
OXPHOS – fosforilação oxidativa
p/O₂ – Eficiência de acoplamento
PPAR γ – receptores gamma ativados por proliferadores de peroxissoma
PTP – Poro de transição de permeabilidade
PTZ – Pentilenotetrazol
SE – *Status epilepticus*
SNC – Sistema Nervoso Central
RCR – *Respiratory Control Ratio*
VDAC – *Voltage dependent anion channel*

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
SUMÁRIO.....	XI
PARTE I: INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. EPILEPSIAS	1
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DAS EPILEPSIAS	4
1.3. MITOCÔNDRIA.....	8
1.3.1. <i>Origem, características e funções</i>	8
1.3.2. <i>Sistema de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa</i>	11
1.3.3. <i>Bioenergética mitocondrial</i>	11
1.4. DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E EPILEPSIAS	13
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	16
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
PARTE II: ARTIGOS CIENTÍFICOS	18
CAPÍTULO I.....	19
CAPÍTULO II.....	30
CAPÍTULO III	39
PARTE III: DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	61
4. DISCUSSÃO.....	62
5. CONCLUSÕES.....	69
6. PERSPECTIVAS	70
7. REFERÊNCIAS	71
8. ANEXO I: Carta de aceite do CEUA	85
9. ANEXO II: Trabalhos publicados em coautoria	86

PARTE I: INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA, HIPÓTESE E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPILEPSIAS

As epilepsias compõem um grupo de doenças neurológicas não-transmissíveis caracterizadas por recorrentes eventos de descargas elétricas anormais e excessivas no encéfalo, desencadeando crises epiléticas, também conhecidas como convulsões, que são um dos tipos de epilepsias; as crises epiléticas podem ser parciais, que atingem partes específicas do encéfalo, ou generalizadas, normalmente associadas à perda da consciência e controle autônomo (WHO, 2021).

Do ponto de vista histórico, um dos primeiros relatos conhecidos sobre as epilepsias foi feito há mais de 3000 anos – entre 1067 a 1046 a.C. Os sinais característicos desencadeados no paciente causavam estranhamento às outras pessoas, um dos possíveis motivos era pelo contexto cultural de forte alinhamento às crenças. Dessa forma, a crise epilética foi descrita como um evento em que os pacientes eram possuídos por demônios e fantasmas – os termos “*to seize*”, do inglês agarrar, ou “*to possess*”, possuir, e na voz passiva “*be possessed*”, possuído(a), indicam a origem do termo “*seizure*” que significa convulsão/apreensão (Wilson & Reynolds, 1990). A desassociação das epilepsias com eventos divinos ou sobrenaturais iniciou com Hipócrates (460-390 a.C.). Ele questionou as definições anteriores e apresentou conceitos mais lúcidos e evidentes em relação a possível etiologia, sintomas, prognóstico e terapia para essas condições (Magiorkinis et al., 2010). Já nos séculos XVI e XVII, Paracelso, le Pois e Sylvius começaram a investigar mais profundamente as causas das epilepsias e então definidas como uma desordem idiopática (que não tem relação com outra doença) (Panteliadis et al., 2017). Curiosamente, doenças mentais despertam atenção quando afetam pessoas conhecidas e admiradas; algumas personalidades que marcaram a história, como Napoleão Bonaparte (1769-1821) e o escritor russo Fiódor Dostoiévski (1821-1881) conviviam com episódios de crises epiléticas. Artistas destacados, diagnosticados com epilepsia, contribuíram para estreitar a associação das epilepsias com a criatividade para composição musical e poética tornando esse um intrigante fenômeno para a comunidade científica (Chirchiglia et al., 2019). Um dos mais renomados escritores brasileiros, Joaquim Maria Machado de Assis (1835–1909), sofria com crises epiléticas e muito do enigma em torno da sua personalidade se deu pela sua tentativa legítima de esconder a sua condição de saúde da sociedade indiscreta. Naqueles anos, o que reflete até hoje, os termos empregados para descrever um paciente com epilepsia não eram coerentes e a mídia acabava associando as epilepsias até com a criminalidade. Inclusive, a recomendação aos pacientes de não casar e não gerar filhos foi difundida para evitar

“proliferar esses genes problemáticos” (Yacubian & Caboclo, 2011). Apesar do estigma perturbador para personalidades em evidência e influentes, ao menos a curiosidade sobre essa desordem intrigante contribuiu para despertar um interesse maior no entendimento fisiopatológico; e por volta desse momento, com contribuição do expressivo avanço tecnológico, as pesquisas aprofundaram.

As pesquisas avançaram consideravelmente no século XIX, quando foram descritos diferentes tipos de epilepsias e o diagnóstico passou a ser realizado com auxílio da eletroencefalografia (EEG). Além disso, ao longo dos anos foram incorporadas outras estratégias de diagnóstico, tais como tomografia computadorizada, ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons (Panteliadis et al., 2017).

Atualmente, a classificação das epilepsias é ajustada de acordo com a respectiva fisiopatologia e é frequentemente revisada pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (*International League Against Epilepsy - ILAE*), sendo a organização norteadora do diagnóstico e do tratamento, e colaboradora da divulgação científica; de qualquer forma, é necessário salientar o consenso que existem formas de epilepsias não classificadas (Fisher et al., 2017). A etiologia das epilepsias é organizada nas seguintes categorias: epilepsia idiopática, presumivelmente de origem genética; epilepsia sintomática, de causa genética ou adquirida; epilepsia provocada, causada por fatores ambientais; e epilepsia criptogênica, de causa não identificada. As causas potenciais, propriamente ditas, são excepcionalmente variadas, como: tumores encefálicos, infecções encefálicas, traumas, febre entre inúmeras outras (Shorvon, 2011).

A prevalência de epilepsias no mundo atualmente varia de 4 a 10 a cada 1000 pessoas. Aproximadamente 50 milhões de pessoas de todas as idades, são portadoras de epilepsia, sendo que destes, 80% estão em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO, 2021). Dados epidemiológicos são escassos no que concerne as epilepsias no Brasil. Em 1986, na cidade de São Paulo, a prevalência de epilepsias era em média de 11,9 a cada 1000 habitantes (Junior et al., 1986). Em 1992, em indivíduos acima de 1 ano a prevalência era de 16,5 a cada 1000 habitantes na área urbana de Porto Alegre (Fernandes et al., 1992); Em 2004 a prevalência de epilepsias na população urbana de São José do Rio Preto – SP era de 18,6 a cada 1000 habitantes (Borges et al., 2004). Em outro estudo conduzido por Noronha e colaboradores em 2007 no estado de São Paulo, a prevalência ao longo da vida era de 9,2 a cada 1000 habitantes e a prevalência de epilepsias ativas de 5,4 a cada 1000 habitantes, sendo maior em classes sociais mais carentes (7,5 a cada 1000 em comparação com 1,6 a cada 1000 para as classes mais

favorecidas) e a prevalência também foi maior em idosos (8,5 a cada 1000 habitantes). Desses pacientes, 38% com epilepsias ativas receberam o tratamento inadequado sendo que 19% receberam o correto tratamento, indicando epilepsias refratárias (Noronha et al., 2007).

O aprimoramento da abordagem terapêutica diminuiu globalmente a mortalidade, a prevalência e as incapacidades geradas pelas epilepsias, de acordo com o seguimento de uma análise sistemática no período de 1990 a 2016. No entanto, recursos insuficientes geram falhas no tratamento, o que pode explicar a maior proporção de epilepsias graves e mortalidade em pacientes vivendo em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, comparado a pacientes em países desenvolvidos (Beghi et al., 2019). Uma das formas de controle das epilepsias são os tratamentos farmacológicos que, por sua vez, são geralmente seguros, eficazes, de baixo custo e acessíveis. Porém, aproximadamente 20 a 30% dos pacientes diagnosticados, principalmente crianças e adolescentes, ou não tem acesso ao tratamento ou apresentam síndromes epiléticas farmacorresistentes (WHO, 2021).

Ademais, devido as características das epilepsias os pacientes estão mais sujeitos ao desemprego, demissões e incapacidades (Souza et al., 2018). As crises epiléticas não controladas, em detrimento da qualidade de vida dos pacientes, agravam pela complexa relação com outras comorbidades (Hingray et al., 2019; Kanner, 2016; Watkins et al., 2019). Na verdade, algumas comorbidades são 8 vezes mais frequentes em pacientes portadores de epilepsias comparados à população geral, entre elas: depressão, ansiedade, demência, enxaqueca, doenças cardíacas, úlceras e artrites (Keezer et al., 2016). A longo prazo o problema ultrapassa o âmbito pessoal e provoca impactos negativos na vida familiar, profissional e social. Os familiares e cuidadores, dependendo da gravidade da condição do paciente, podem sofrer consequências proporcionais em função da atenção e preocupação dispendida com o paciente (Baranowski, 2018; Edelstein et al., 2019); inclusive em crianças e adolescentes que podem apresentar desabilidades intelectuais e deficiências sensoriais (Olusanya et al., 2020). Mesmo diante de tantos avanços nos diagnósticos e tratamentos – que vão além do alcance farmacológico – ainda hoje, por influência cultural e histórica, principalmente os pacientes acometidos por epilepsia, mas seguramente também familiares e cuidadores sofrem preconceitos pelo estigma relacionado às crises epiléticas, o que indica a necessidade de entendimento e comunicação dessas condições (Chakraborty et al., 2021).

Enquanto as epilepsias de etiologia conhecida podem ser tratadas seguindo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Epilepsia (PORTARIA CONJUNTA Nº 17, DE 21 DE JUNHO DE 2018); outros casos permanecem sob investigação, como os de etiologia indefinida

e de episódios refratários. São exemplos de investigação recente de potenciais estratégias terapêuticas: a microbiota como um alvo terapêutico e a disbiose como potencial e complexo fator de risco para desencadeamento de crises epiléticas (Lum et al., 2020); a dieta cetogênica – mesmo que o mecanismo de ação não esteja esclarecido – para tratamento de pacientes que apresentam crises refratárias (Dabke & Das, 2020; Meira et al., 2019; Wells et al., 2020; Zarnowska, 2020); o tratamento com canabidiol frente às epilepsias refratárias em crianças e adolescentes (Hausman-Kedem et al., 2018; Raucci et al., 2020); a memantina como potencial neuroprotetora evitando a neurodegeneração diante de *status epilepticus* (SE) (Zenki et al., 2018); abordagens não farmacológicas como a efetividade estimulação vagal (Rydenhag & Ben-menachem, 2018) e intervenção cirúrgica em pacientes com epilepsia do lobo temporal (Zimmermann et al., 2020).

Motivados pela pandemia causada pelo SARS-CoV-2, recentemente algumas investigações especulam se epilepsias são fatores de risco para o desenvolvimento mais grave da COVID-19 (Millevert et al., 2021); no entanto, devido às informações limitantes, a cautela e cuidado com pacientes diagnosticados com epilepsias segue com recomendações ainda mais preventivas visto a possibilidade da manifestação de estresse, depressão, ansiedade e aumento de frequências de crises (Asadi-pooya et al., 2021; French et al., 2020; Van Hees et al., 2020). Por outro lado, mesmo que se apresente em casos raros, crises epiléticas podem ser causadas por complicações da COVID-19, como principalmente por: febre, hipóxia, descarga de citocinas e eventos cerebrovasculares (Nikbakht et al., 2020; Vohora et al., 2020).

Diante do atual cenário, é impreterível o entendimento pleno do mecanismo bioquímico desencadeador e mantedor de crises epiléticas assim como as consequentes perturbações. Só com o domínio integral da (s) fisiopatologia (s) será possível o aprimoramento da estratégia e conduta terapêutica realizada pelos profissionais da saúde a fim de controle absoluto diante das epilepsias; bem como contribuir para estreitar a lacuna entre a associação dos mecanismos biológicos com os sinais e sintomas físicos e subjetivos dos pacientes.

1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DAS EPILEPSIAS

A investigação sobre epilepsias lança mão de distintas estratégias experimentais a fim de obter modelos racionais com potencial condição translacional.

Uma das estratégias validadas *in vitro* é o emprego de baixas concentrações de Mg^{2+} em meio de cultura. Isto é, um meio de cultura ausente de 1 mM de $MgCl_2$ promove atividade epileptiforme e consequente aumento de concentrações de Ca^{2+} intracelular em neurônios (Kim

et al., 2016). Dessa forma, respostas celulares são indicativos de possíveis mecanismos que ocorrem em uma crise epiléptica. Empregando essa condição, Deshpande e colaboradores identificaram que endocanabinoides promovem inibição de *status SE in vitro* mediante ativação de receptores canabinóides do tipo 1 (CB₁) (Deshpande et al., 2007). Em outro estudo, Nagarkatti e colaboradores determinaram as alterações na dinâmica do Ca²⁺ no modelo de SE *in vitro* ao longo do tempo e observaram que após SE *in vitro*, dantrolene, via inibição de receptor de rianodina, impediu o aumento das concentrações de Ca²⁺ intracelular, diminuiu a morte neuronal e evitou a manifestação de descargas epileptiformes recorrentes e espontâneas (Nagarkatti et al., 2010). Sun e colaboradores observaram a regulação positiva do microRNA-134 – definido pelo papel na progressão de epilepsias – e reversão da regulação quando presente o antagonista (Ant-134) em cultura de neurônios expostos a baixos níveis de Mg²⁺ (Sun et al., 2017).

Similarmente, modelos de SE validados *in vitro* são empregados para investigação do metabolismo encefálico diante de desafio em meio despolarizante ou composto indutor de epilepsia. Por exemplo, Eloqayli e colaboradores empregaram 10mM de pentilenotetrazol (PTZ) – um antagonista receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA_A) – em cultura de neurônios de camundongos e relacionaram com prejuízo nas funções mitocôndrias e metabólicas (Eloqayli et al., 2002). O mesmo grupo de pesquisa observou prejuízos metabólicos causados por 10mM de PTZ *in vitro* também em cultura de astrócitos de camundongos (Qu et al., 2005). Empregando 40mM de PTZ em cultura de neurônios de *Helix aspersa*, Giachello e colaboradores observaram a consequente atividade epileptiforme e aumento da fosforilação da sinapsina (Giachello et al., 2013). Zang e colaboradores empregaram astrócitos de hipocampo de rato e trataram com 10 mM de PTZ em intervalos de tempo até 24h. O tratamento com PTZ aumentou a expressão de mRNA e a proteína de pleiotrofina que pode estar envolvida na epileptogênese (Zhang et al., 2014). A investigação *in vitro* também colabora para prospectar compostos potencialmente neuroprotetores, como no caso do composto JM-20 que apresentou efeitos protetores em neurônios granulares cerebelares de ratos quando adicionado ao meio contendo também glutamato e 40mM de PTZ (Nuñez-figueredo et al., 2014). Em outro estudo, Sheng e colaboradores observaram efeitos protetores do composto otofilosídeo N (isolado de *Cynanchum otophyllum*) diante da lesão neuronal induzida por PTZ empregando neurônios corticais de camundongos *in vitro* (Sheng et al., 2016).

No que diz respeito aos modelos *in vivo*, a disponibilidade de sistemas biológicos complexos comparáveis a humanos para estudo de epilepsia, como principalmente ratos,

camundongos e peixe-zebra, proporcionam desenvolver aprofundados estudos neuroquímicos e comportamentais. Tradicionalmente o uso de indutores de crises epiléticas, mimetizando epilepsias adquiridas, e modelos genéticos *knockout* em roedores foram e continuam sendo os modelos mais aplicados. Dentre os indutores de crises epiléticas em roedores frequentemente empregados estão a pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico que induz SE (Pasquetti et al., 2019); a combinação lítio-pilocarpina, vantajosa pela redução da mortalidade dos animais (Hillert et al., 2014; Imran et al., 2015; Lévesque et al., 2016; Zenki et al., 2018); o ácido caínico, um agonista de receptores cainato e agonista parcial de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) (Burtscher et al., 2015; Cavalheiro et al., 1982; Zaja-Milatovic et al., 2008; Y. Zhang et al., 2020); ácido homocisteíco, um agonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) (Folbergrová et al., 2005, 2007, 2010); o já mencionado PTZ (Branco et al., 2013; Hansen et al., 2004; Huang et al., 2001; B. H. Wang et al., 2018; Zhu et al., 2016), entre outros.

Modelos emergentes como o peixe-zebra estão sendo amplamente empregados na área biomédica e em neurociências (Fontana et al., 2018; Kalueff et al., 2014; Teame et al., 2019); e especificamente pela possibilidade de induzir epilepsias agudas e modelar epilepsias genéticas (Grone & Baraban, 2015; Mussulini et al., 2016). O uso de modelos alternativos a roedores pode preencher lacunas científicas relacionada aos mecanismos neuroquímicos e características comportamentais ainda sob investigação (Kundap et al., 2017).

Também conhecido como paulistinha ou do inglês *zebrafish*, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo pertencente à família Cyprinidae, natural do sul da Ásia – Índia, Bangladesh e Nepal – onde a variação de temperatura é ampla, entre 6 a 38 °C, indicando que esse animal se caracteriza pela capacidade adaptativa de sobrevivência nessas diferentes condições; na idade adulta tem tamanho aproximado de 3 a 4 cm e vive em média de 3 anos e 6 meses, chegando a 5 anos (Spence et al., 2008). As vantagens no emprego do peixe-zebra em relação a outros modelos se dão pelo seu tamanho reduzido, possibilidade de obtenção de considerável número de ovos diariamente, custo e espaço menores para manutenção e versatilidade e dualidade larva-adulto (Grone & Baraban, 2015); a fertilização externa, os embriões transparentes e o rápido desenvolvimento larval – sendo de 48h a 72h para a eclosão e então alcançar o estágio larval (Kimmel et al., 1995), bem como a permeabilidade do córion por substâncias do meio (Vallverdú-Queralt et al., 2015) propiciam também estudos sobre desenvolvimento, ensaios toxicológicos, de teratogenicidade (Braga et al., 2015; Cerbaro et al., 2020; Grünspan et al., 2018), na área ecotoxicológica (Bhagat et al., 2020; Fu et al., 2021; Juan-

García et al., 2021; Koual et al., 2021; Lerebours et al., 2010); e *screening* de drogas antiepilépticas (Afrikanova et al., 2013; Baraban et al., 2007; Santana et al., 2012).

Porém, os Sistema Nervoso Central (SNC) e imune são imaturos durante as fases de desenvolvimento bem como as respostas comportamentais são simplificadas (Wong et al., 2010); por sua vez, o peixe-zebra adulto possui estrutura encefálica conhecida (Braga et al., 2013) e visualmente dividida em: telencéfalo, tectum óptico, cerebelo (Zenki et al., 2014). O SNC é desenvolvido e as respostas comportamentais mais complexas em relação à larva (Baggio et al., 2018; Dos Santos et al., 2020; Zenki et al., 2020). Esses fatores contribuem para a aplicação do modelo animal em investigação de inúmeras doenças neurodegenerativas (Martín-Jiménez et al., 2015) e inclusive as epilepsias (Kundap et al., 2017; Mussulini et al., 2013). Existe também a possibilidade de edição gênica por técnicas como *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) associated protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9)* que possibilitam a geração de linhagens mutantes (Grone & Baraban, 2015; Hoshijima et al., 2019) e que apresentam epilepsias (Baraban et al., 2013; Zabinyakov et al., 2017). Ademais, o completo genoma do peixe-zebra foi codificado e comparado ao genoma humano, e observou-se que aproximadamente 70% dos genes humanos possui um ortólogo no peixe-zebra (Howe et al., 2013). Nesse sentido, no aspecto translacional, a neurotransmissão modulatória – mediada por receptores acoplados a proteína G - é um objeto de investigação em doenças neurodegenerativas e sabe-se que no peixe-zebra maior quantidade desse receptores são expressos quando comparado aos mamíferos; porém, muitos receptores, alvo de ligação e sinalização como por exemplo GABA, glutamato, serotonina, dopamina e noradrenalina são muito semelhantes (Panula et al., 2010; Rico et al., 2011). Para modelos de SE induzido em peixe-zebra adulto, emprega-se principalmente: ácido cálcico (Mussulini et al., 2018) e PTZ (Mussulini et al., 2013), que também é aplicado em larvas (Afrikanova et al., 2013; Sheng et al., 2016). É possível também a indução de crises epiléticas por hipertermia em larva, considerando a febre uma das causas das epilepsias (Hunt et al., 2012). O peixe-zebra é um modelo apropriado para identificar uma ampla variedade de anticonvulsivantes potenciais (Berghmans et al., 2007). Em formas genéticas de epilepsia: larvas de peixe-zebra – com 4 a 6 dias pós-fertilização (dpf) - são empregadas no modelo de Síndrome de Dravet – anteriormente conhecida como epilepsia mioclônica severa da infância – lançando mão da linhagem mutante *Scn1Lab* (para canal de sódio voltagem dependente) os quais apresentam hiperatividade com comportamento convulsivo, sendo um exemplo de modelo genético (Kumar et al., 2016). A hibridização *in situ* – uma técnica que possibilita a identificação dos locais de expressão de

genes específicos de interesse – foi padronizada em embriões de peixe-zebra (Thisse & Thisse, 2008) e aplicada no esclarecimento da fisiopatologia de epilepsias focais (Swaminathan et al., 2018).

Diante de todas essas estratégias de investigação e modelos comentados, algumas questões permanecem com aspectos a serem explorados e esclarecidos, como por exemplo o papel do metabolismo encefálico e as funções mitocôndrias na fisiopatologia das epilepsias (Kovács et al., 2018). Enquanto alguns trabalhos indicam alterações bioenergéticas envolvidas nas epilepsias (Burtscher et al., 2015, 2018; Carrasco-Pozo et al., 2015; Rahn et al., 2014) há evidências que demonstram o contrário (Imran et al., 2015).

1.3. MITOCÔNDRIA

1.3.1. *Origem, características e funções*

Importantes teorias e evidências sustentaram o conhecimento da origem da mitocôndria; hipóteses surgiram entre o século XX até os anos 1960 quando se propôs que organelas eucarióticas, incluindo mitocôndrias e cloroplastos, evoluíram de bactérias endossimbióticas (Sagan, 1967). Nos anos 70 e 80, análises filogenéticas de genes e proteínas evidenciaram a origem endossimbiótica das mitocôndrias pela proveniência procariótica que se diferenciava das características nucleares eucariótica (Bonnen et al., 1977; Yang et al., 1985). Dessa forma, a célula eucariota anaeróbica primitiva evoluiu com uma bactéria púrpura endossimbiótica – da classe alphaproteobacteria – e obteve então a capacidade de realizar catabolismo aeróbico com auxílio da maquinaria bacteriana (Roger et al., 2017). Em 1898, Carl Benda nomeou as organelas que observara no citoplasma celular de mitocôndria (do grego *mitos* (fio) e *chondros* (grãos)) (Benda, 1898).

Mesmo que a maioria das proteínas mitocondriais sejam codificadas no núcleo celular, em função da sua origem bacteriana, as mitocôndrias possuem características condizentes e peculiares: a maquinaria genética – conhecido como DNA mitocondrial – sintetiza 13 proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons (Kramer & Bressan, 2018). Isso é relevante, por exemplo, para a clínica, visto que é possível que o DNA mitocondrial seja um alvo de antibióticos provocando disfunção mitocondrial (Kalghatgi et al., 2013; Yin et al., 2018); e por outro lado um alvo terapêutico para a remissão de alguns tipos de câncer via mitocôndria (Lamb et al., 2015).

A morfologia das mitocôndrias presentes nas células se caracteriza pela presença de membrana externa que limita com o ambiente citoplasmático e membrana interna que bordeia

a matriz mitocondrial (Brandt et al., 2017). As mitocôndrias interagem com as demais organelas e membranas da célula (Lackner, 2019). São organelas dinâmicas que possuem maquinaria para as atividades antagônicas de fissão e fusão. Esses processos ocorrem em relação à demanda energética celular e também como um controle de qualidade, isto é, eliminação de organelas disfuncionais por mitofagia (Westermann, 2010). Em neurônios o transporte de mitocôndrias nos axônios é particularmente crucial visto que as organelas podem ser encaminhadas a locais de maior demanda energética (Hollenbeck & Saxton, 2005). As funcionalidades mitocondriais alteram de acordo com regiões encefálicas (Petersen et al., 2019). Além disso, evidências indicam a união estável de complexos mitocondriais em supercomplexos ou respirassomos (Cruciat et al., 2000; Schägger & Pfeiffer, 2000); mas isso não necessariamente promove aumento da performance bioenergética (Lobo-Jarne et al., 2018; Mourier et al., 2014).

A biossíntese de ATP é, sem dúvida, a mais conhecida e reportada função das mitocôndrias, mas essas organelas desempenham outras funções no contexto celular, como: homeostase do Ca^{2+} , controle de apoptose, produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO), metabolismo e biossíntese de substratos (Herst et al., 2017).

O Ca^{2+} , por sua vez, possui versátil função sinalizadora, controlando o metabolismo, viabilidade celular, envolvido na fertilização, proliferação celular, contração, secreção, entre outros (Berridge et al., 2000; Rizzuto et al., 2012). A manutenção da concentração de Ca^{2+} intracelular se dá através do aprimorado sistema de transporte (Bernardi & von Stockum, 2012). A concentração de Ca^{2+} no citoplasma é mantida em torno de 100 nM quando em repouso, e pode aumentar até a 1 μM em situações de ativação, em contraste com a concentração extracelular de aproximadamente 1-2 mM (Berridge et al., 2000; Kannurpatti, 2017); essas concentrações variam de acordo com o tipo celular (Fernandez-sanz et al., 2019). No processo de tamponamento do Ca^{2+} realizado pelas mitocôndrias, o Ca^{2+} passa através das membranas mitocondriais externa e interna: transportadores – canais iônicos dependente de voltagem (VDAC – *voltage dependent anion channel*) – localizados na membrana externa das mitocôndrias são essenciais para a captação de Ca^{2+} para o espaço intermembrana ou liberação para o citosol e inclusive, a abertura dos canais é controlada pelas concentrações de Ca^{2+} (Báthori et al., 2006; Shoshan-Barmatz et al., 2010). O Ca^{2+} entra na matriz mitocondrial via o transportador mitocondrial uniporter de Ca^{2+} (MCU – *Mitochondrial calcium uniporter*) (Baughman et al., 2011; Drago et al., 2011; Marchi & Pinton, 2014; Pan et al., 2013; Stefani et al., 2014); e então o Ca^{2+} atua como cofator e modula desidrogenases do ciclo do ácido cítrico – glicerol 3-fosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e

oxoglutarato desidrogenase – , a F₁–F₀ ATP sintase inclusive possui sítio de ligação para Ca²⁺ na subunidade β sendo a biossíntese de ATP também regulada de acordo com as concentrações de Ca²⁺ (Fernandez-sanz et al., 2019; Nichols & Denton, 1995). Na matriz mitocondrial o acúmulo da maior quantidade de Ca²⁺ ocorre pela formação de precipitados com fosfato (Starkov, 2010); o efluxo do excesso de Ca²⁺ da matriz mitocondrial ocorre através de trocadores Na⁺-Ca²⁺ (mNCX) e H⁺-Ca²⁺ (mHCX) de forma lenta para o citoplasma (Crompton et al., 1977; Kannurpatti, 2017; Rizzuto et al., 2012). Ademais, alterações na homeostase de Ca²⁺ são características de doenças neurodegenerativas, como na doença de Huntington (Cherubini et al., 2020).

A mitocôndria tem um papel na apoptose que por sua vez trata-se de um processo comum em distintas situações: fisiológicas, patológicas e em tratamentos específicos (Kerr et al., 1972; Lockshin & Williams, 1964). O processo ocorre por meio da ativação de uma cascata sinalizadora (Galluzzi et al., 2012) e o controle está estreitamente relacionado ao influxo de Ca²⁺ nas mitocôndrias (Hajnóczky et al., 2003; Rapizzi et al., 2002). O acúmulo excessivo de Ca²⁺ na mitocôndria provoca a liberação de algumas proteínas – citocromo c, Smac/Diablo, fator indutor de apoptose (AIF – *apoptosis-inducing factor*), endonuclease G – através de poro de transição de permeabilidade (PTP). Normalmente essas proteínas pró-apoptóticas situam no espaço intermembrana e que quando liberadas para o citosol e/ou núcleo provocam ativação de caspases e nucleases ou inativando inibidores do processo (Contreras et al., 2010; Gupta et al., 2009; Halestrap, 2009; X. Wang, 2009).

A produção de ERO é inerente ao processo de respiração celular (Cadenas & Davies, 2000); já o desequilíbrio da homeostase redox – excessivo aumento de ERO – compõe a regulação da sinalização celular (Hamanaka & Chandel, 2010; Murphy, 2009) e parte da resposta imune (West et al., 2011). Porém, o contínuo desequilíbrio sem a neutralização das ERO causa subsequente estresse oxidativo e desencadeia danos e disfunções mitocondriais, associados à doenças neurodegenerativas (Jiang et al., 2016) e também às epilepsias (Ambrogini et al., 2019; Liang et al., 2012; Pearson-Smith & Patel, 2017; Waldbaum & Patel, 2010).

O metabolismo, por sua vez, também pode ser regulado nas mitocôndrias; na matriz mitocondrial estão localizadas as enzimas do ciclo do ácido cítrico que a partir da oxidação de piruvato geram coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) subsequentemente essas doam elétrons à cadeia transportadora de elétrons com a finalidade de biossintetizar ATP e ocorre também parte das vias biossintéticas da pirimidina e dos lipídios (β-oxidação do ácido graxo), de

aminoácidos e cofatores (Nunnari & Suomalainen, 2012); e síntese de heme e aglomerados de Fe-S (Lill & Mühlenhoff, 2008).

As mitocôndrias interagem com praticamente todas as outras organelas, dessa forma existe uma influência mitocondrial refletida no contexto celular (Lackner, 2019). As funções mitocondriais comentadas até então, na verdade, podem ocorrer de forma interconectada (Nunnari & Suomalainen, 2012). O metabolismo é adaptável à demanda energética em situações normais e em doenças (Smith et al., 2018).

1.3.2. Sistema de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

Na membrana interna estão localizados os complexos proteicos –complexos I ao IV - responsáveis pelo sistema de transporte de elétrons. O sistema leva elétrons a partir de coenzimas reduzidas – NADH e FADH₂ – até oceptor final, o oxigênio molecular (O₂). Esse processo ocorre concomitantemente ao bombeando de H⁺ para o espaço intermembranas. A fosforilação oxidativa (OXPHOS), por sua vez, é promovida pela F₁F₀-ATP sintase, também identificada como complexo V, com sua característica catalítica rotativa. O acúmulo de H⁺ no espaço intermembranas gera a força próton-motriz crucial para a biossíntese de ATP a partir de ADP e Pi (Leslie et al., 1999).

1.3.3. Bioenergética mitocondrial

Ao analisar restritamente o consumo de O₂ pelas células sabemos que se trata de uma reação de transferência final de elétrons no complexo IV da cadeia respiratória para o (O₂), reduzindo-o a H₂O. Com essa medida de consumo podemos inferir outras informações sobre as funções mitocôndrias (Makreka-Kuka et al., 2015). Incluindo função e disfunção de complexos da cadeia transportadora de elétrons (Jaber et al., 2020).

Diferentes amostras podem ser empregadas para medir o consumo de O₂, como: células intactas, células permeabilizadas, homogenato de tecido, mitocôndrias isoladas, entre outras (Larsen et al., 2014; Makreka-Kuka et al., 2015). A avaliação do consumo de O₂ empregando células intactas – vantajosas pela manutenção do ambiente celular – designa as taxas de: respiração celular de rotina, eficiência de acoplamento (p/O_2), vazamento de prótons (H^+ leak), capacidade do sistema de transferência de elétrons/respiração máxima (CTE), capacidade respiratória de reserva (CRR) e consumo de oxigênio residual (COR), obtidas com a adição de substratos e inibidores da cadeia transportadora de elétrons (Brand & Nicholls, 2011). O modelo esquemático está representado na figura 1.

Representação esquemática do protocolo de controle de acoplamento

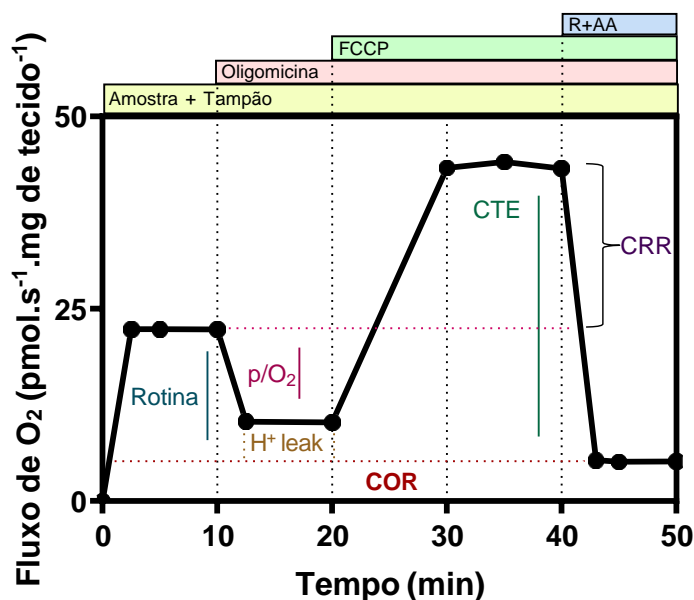


Figura 1. Figura representativa do fluxo de consumo de O₂ no protocolo de controle de acoplamento. O fluxo de consumo de O₂ (denominado rotina) é medido após a estabilização do fluxo respiratório. Em seguida, é adicionada oligomicina (um inibidor da ATP sintase) para obter a eficiência de acoplamento (p/O₂) e vazamento de H⁺ (H⁺ leak). Em seguida, adiciona-se cianeto de carbonil-4- (trifluorometoxi) fenil-hidrazona (FCCP), um protonóforo e desacoplador de fosforilação oxidativa, para obtenção da capacidade de transferência máxima de elétrons/respiração (CTE) do sistema e a capacidade respiratória de reserva (CRR). A CRR é calculada pela diferença entre rotina e CTE. Ao final, Rotenona (um inibidor do complexo I, concentração final de 0,5 μM) e antimicina-A (um inibidor do complexo III, concentração final de 2,5 μM) são adicionados para determinar o consumo de oxigênio residual (COR), o qual é subtraído de todas as variáveis anteriores.

Já a análise empregando mitocôndrias isoladas – vantajosas para investigação de mecanismos – avaliam os estados respiratórios (Brand & Nicholls, 2011). Os estados respiratórios foram definidos primeiramente por Chance e Willians em 1955 e são divididos de acordo com características respiratórias, suas características estão apresentadas na Tabela 1. Experimentalmente os estados 3 e 4 são os mais relevantes: o estado 3 (estado fosforilante) representa o consumo de O₂ pelas mitocôndrias em meio contendo substratos oxidáveis e ADP, o estado 4 (estado não-fosforilante) representa a depleção do ATP e diminuição do consumo de oxigênio (Chance & Williams, 1955).

Tabela 1. Estados Respiratórios na mitocôndria

	Estado 1	Estado 2	Estado 3	Estado 4	Estado 5
Características	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Aeróbico	Anaeróbico
Nível de ADP	Baixo	Alto	Alto	Baixo	Alto
Nível de substrato	Baixo-endógeno	Aproximadamente 0	Alto	Alto	Alto
Taxa respiratória	Lenta	Lenta	Rápida	Rápida	0
Taxa limitante do componente	Aceptor de fosfato	Substrato	Cadeia respiratória	Aceptor de fosfato	Oxigênio

Traduzida e adaptada de (Chance & Williams, 1955).

O RCR (do inglês, *respiratory control ratio*) corresponde a um índice para controle da taxa respiratória. Se dá pela divisão do estado 3 pelo estado 4. É empregado para determinar a qualidade da preparação amostral de mitocôndria (Brand & Nicholls, 2011).

O estudo da bioenergética em tecido encefálico é peculiar devido a sua composição heterogênea – composta por neurônios e células não neuronais – diferentes de outros tecidos com composição homogênea frequentemente avaliados como: cardíaco, muscular, hepático, esse fator pode determinar diferentes características mitocondriais (Fecher et al., 2019). Dessa forma, os protocolos empenham-se para o isolamento mitocondrial em encéfalo de rato (Sims & Anderson, 2008) e sinaptossomas de encéfalo de ratos (Dunkley et al., 2008) e camundongos (Choi et al., 2009).

1.4. DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E EPILEPSIAS

A disfunção mitocondrial é determinada por alterações prejudiciais em uma ou mais das variadas funções mitocondriais conhecidas. A disfunção mitocondrial pode ser avaliada em diferentes modelos, tecidos e preparações de amostra. Um aspecto primordial é a determinação da função mitocondrial, garantido por controles ao longo do processo experimental (Brand & Nicholls, 2011). Ao que as evidências indicam disfunções mitocondriais promovem prejuízo bioenergético e de transcrição, mutação em DNA mitocondrial, mutação genética e proteica, alteração da dinâmica mitocondrial, associação de proteínas mutadas, entre outras (Chaturvedi & Beal, 2013).

Os motivos para a investigação da disfunção mitocondrial em neurociências é a sua relação com o envelhecimento (Brandt et al., 2017) e com a maioria das doenças neurodegenerativas (Chaturvedi & Beal, 2013; Karbowski & Neutzner, 2012). É um consenso

o papel da disfunção mitocondrial na fisiopatologia da doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (De Luna et al., 2020), doença de Charcot-Marie-Tooth, doença de Parkinson, epilepsias, entre outras desordens também relacionadas com o envelhecimento (Brandt et al., 2017; Chaturvedi & Beal, 2013; Civera-Tregón et al., 2021; Devine & Kittler, 2018; Herst et al., 2017). No entanto, permanece elusivo o nível da contribuição da disfunção mitocondrial em doenças como as epilepsias adquiridas e se a mitocôndria e o metabolismo encefálico são potenciais alvos terapêuticos (Kudin et al., 2009; Lim & Thomas, 2020).

A diminuição da atividade do complexo I com conseqüente prejuízos no processo de OXPHOS foram especuladas como parte da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Schapira, 1998); e deficiências no complexo I é um dos problemas mais frequente associados a doenças mitocondriais (Mimaki et al., 2012), ou pelo menos mais conhecidos e estudados. A diminuição da atividade do complexo I está evidenciado em pacientes diagnosticados com doença de Parkinson (Schapira et al., 1989) e doença de Alzheimer (Holper et al., 2019). Relacionado a esse fato, em pesquisa, a inibição do complexo I induzida por rotenona, é uma estratégia para investigação da doença de Parkinson visto que reproduz parte das características fisiopatológicas (Johnson & Bobrovskaya, 2015). Ademais, vem sendo testada a promissora proteção mitocondrial realizada por alguns compostos como guanosina (da Silva et al., 2020), fitoquímicos: polifenóis e substâncias endógenas carnitina, coenzima- Q10, ácidos graxos polissaturados, entre outros (Pogačnik et al., 2020). Enquanto outras linhas observam do ponto de vista da inflamação e a disfunção mitocondrial e os potencial protetores (Visentin et al., 2020).

Sugere-se que as epilepsias, tanto as de cunho genético como as epilepsias adquiridas, têm em comum a disfunção mitocondrial (Zsurka & Kunz, 2015). Verificou-se diminuição da atividade do complexo I (~ 60%) em mitocôndrias do córtex de ratos em modelo de epilepsia induzida por ácido homocisteico durante a fase aguda das crises e até 5 semanas após as crises agudas (Folbergrová et al., 2007, 2010). Embora atualmente nenhum tratamento para epilepsias que tenha como alvo a mitocôndria seja empregado, inúmeros compostos estão sendo investigados (Rahman, 2019). Mitocôndrias são hoje alvo de estudos para ação de compostos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, a estratégia consiste em emprego de antioxidantes para proteção do dano mitocondrial como a coenzima Q10; compostos que promovem aumento da biogênese mitocondrial via ativação de fatores de transcrição como, por exemplo, antidiabéticos pioglitazona e rosiglitazona via receptores gamma ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ), hipolipemiantes como bezafibrato e tiazolidinedionas,

que aumentam a expressão de PGC1 α , resveratrol e viniferina que ativam SIRT1(sirtuína-1) via PGC1 α , entre outros (Murphy & Hartley, 2018).

Comparado às outras doenças neurodegenerativas citadas, a investigação da relação disfunção mitocondrial e epilepsias pode ser encontrada mais recentemente com o termo “epilepsia mitocondrial” que foi cunhado para pacientes que apresentam episódios – em maioria refratários – de crises epiléticas e com pobre prognóstico. Esforços estão sendo desempenhados com o intuito de padronizar modelos de disfunção mitocondrial; por exemplo, empregando inibidores de complexos mitocondriais em peixe-zebra (Byrnes et al., 2018). E apenas recentemente – Chan e colaboradores em 2019 – desenvolveram um modelo para investigação de “epilepsia mitocondrial” empregando inibidores de complexos – como a rotenona – e enzimas (Chan et al., 2019). Outro ponto a considerar é o impacto de anticonvulsivantes e seu benefício no que concerne a atividade mitocondrial; é o caso do sulforafano, um composto com atividade anticonvulsivante, ação antioxidante e promotor da função mitocondrial (Carrasco-Pozo et al., 2015).

Uma outra razão para investigação do papel mitocondrial nas epilepsias se dá porque a neurotransmissão glutamatérgica é o principal sistema excitatório no encéfalo, de modo que a hiperexcitabilidade glutamatérgica demanda um pronunciado desempenho mitocondrial para biossíntese de ATP como no caso das crises epiléticas (Khatri & Man, 2013). O glutamato, por sua vez, é um aminoácido que além de ser o principal neurotransmissor excitatório atua como substrato energético e precursor do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico, o GABA. A neurotransmissão sináptica glutamatérgica coordena eventos fisiológicos, como memória e aprendizado, desenvolvimento e envelhecimento e proliferação e migração celular (Niciu et al., 2012). Enquanto que alterações no funcionamento da neurotransmissão glutamatérgica estão envolvidos em evento como morte neuronal e suas consequências como as doenças neurodegenerativas (Khatri & Man, 2013).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Nós consideramos a necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos neuroquímicos das epilepsias como uma possível contribuição para os casos das epilepsias de causas desconhecidas e ajuste dos protocolos para os pacientes farmacorresistentes. Atualmente o papel mitocondrial diante de crises epiléticas permanece elusivo.

Nesse sentido e relacionado a dados prévios obtidos em nosso grupo de pesquisa, nós hipotetizamos que a disfunção mitocondrial está relacionada com crises epiléticas, ou seja, pode contribuir com a fisiopatologia das epilepsias. Queremos determinar se as mitocôndrias encefálicas são afetadas diante de exposições a compostos empregados em modelos animais de epilepsia. O entendimento desse aspecto pode indicar as mitocôndrias como um alvo terapêutico ou de proteção/prevenção diante de epilepsias.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a bioenergética mitocondrial diante da exposição a agentes indutores de crises epilépticas em modelos animais.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e avaliar a qualidade da dissociação celular de tecido encefálico de peixe-zebra adulto para uso na respirometria de alta resolução;
- Avaliar o efeito de indutores de crises convulsivas *in vitro* e *in vivo* sobre a respiração mitocondrial em tecido encefálico dissociado de peixe-zebra adulto;
- Padronizar o preparo de homogeneizado de tecido encefálico de peixe-zebra adulto e avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de Ca^{2+} sobre a respiração mitocondrial;
- Avaliar os efeitos do PTZ sobre os complexos mitocondriais em fígado e encéfalo de camundongos.

PARTE II: ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO I

An optimized method for adult zebrafish brain-tissue dissociation that allows access mitochondrial function under healthy and epileptic conditions

Luana Moro¹, Giovana Rech¹, Amanda Martins Linazzi, Thainá Garbino dos Santos, Diogo Losch de Oliveira

¹ *Dual-first authorship: these authors contributed equally to the present work.*

Artigo publicado no periódico: Brain Research, 2021.

Tema: Avaliação de métodos de dissociação celular (mecânicos e enzimáticos) para dissociação de encéfalo de peixe-zebra adulto para posterior avaliação dos efeitos de indutores de crises epilépticas sobre a bioenergética.

Objetivos: Avaliar a melhor técnica para dissociação de encéfalo de peixe-zebra adulto; avaliar os efeitos de agentes indutores de crises epilépticas sobre a bioenergética.

Principal conclusão: A dissociação mecânica com *pasteur* de vidro foi a técnica mais adequada para avaliação bioenergética em respirometria de alta resolução. A exposição *in vitro* a 20mM de PTZ induziu aumento do consumo de oxigênio nas amostras de dissociado encefálico de peixe-zebra adulto. A indução *in vivo* de crises epilépticas prolongadas do tipo SE aumentou a capacidade de reserva mitocondrial em amostras de dissociado encefálico de peixe-zebra adulto.

Contribuição à formação do aluno: Este trabalho contribuiu para o desenvolvimento das minhas habilidades com o modelo peixe-zebra, como o cuidado na criação, a manipulação e a otimização do método de dissociação de tecido encefálico. Compreendi a metodologia de indução de crises convulsivas e os *scores*. Ademais aprendi a realizar e aprimorar as habilidades na realização da técnica de respirometria de alta resolução.

Direitos autorais deste trabalho cedidos, mediante publicação,
para o periódico científico *Brain Research*
DOI: 10.1016/j.brainres.2021.14749

CAPÍTULO II

Ca²⁺ exposure reduces oxygen flux in zebrafish brain homogenate

Manuscrito em preparação

Tema: O papel do Ca²⁺ como sinalizador está envolvido em vários mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos. No caso da epileptogênese, a hiperexcitabilidade desencadeando excesso de neurotransmissão característico de crises convulsivas pode estar relacionado com as vias de sinalização de Ca²⁺. Ademais o excesso de Ca²⁺ mitocondrial e o excesso de espécies reativas de oxigênio produzidas podem causar morte neuronal e crises convulsivas. A investigação da sinalização pelo cálcio Ca²⁺ na epileptogênese objetiva esclarecer mecanismos neuroquímicos envolvidos nessa condição.

Objetivo: Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Ca²⁺ sobre a função mitocondrial em homogeneizado de tecido encefálico de peixe-zebra adulto.

Conclusões parciais: O Ca²⁺ nas concentrações testadas (500nM e 50µM) causou diminuição da taxa respiratória mitocondrial avaliada no homogeneizado de tecido encefálico de peixe-zebra adulto.

Contribuição à formação do aluno: Este trabalho contribuiu para o contínuo desenvolvimento das minhas habilidades com o modelo peixe-zebra, e com a padronização do método de homogeneização de tecido encefálico. Defini o método de preparo de amostra e o apliquei para investigar os efeitos do Ca²⁺ na bioenergética empregando a técnica de respirometria de alta resolução para homogeneizado.

CAPÍTULO III

Pentylentetrazole inhibits specifically mitochondrial complex I

Giovana Rech^{a,b}, Thibaut Molinié^b, Diogo Losch de Oliveira^a, Arnaud Mourier^b

Artigo a ser submetido ao periódico: Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics

Tema: Despolarizantes são amplamente utilizados para indução de crises epiléticas em modelos animais. A disfunção mitocondrial está relacionada ao processo de epileptogênese, mas o esclarecimento do completo papel mitocondrial ainda está sob investigação. Dessa forma, o efeito de despolarizantes sobre a mitocôndria isolada se faz de alto interesse na investigação.

Objetivo: Investigar o efeito do PTZ na bioenergética das mitocôndrias intactas e permeabilizadas de encéfalo e fígado de camundongos e avaliar o impacto nos complexos mitocondriais.

Principal conclusão: O PTZ se mostrou seletivo na inibição da atividade de complexo I independente de desidrogenases e transportadores em mitocôndrias de encéfalo e fígado de camundongos, não sendo observado alterações no complexo II nos mesmos tecidos.

Contribuição à formação do aluno: Este trabalho proporcionou o refinamento do domínio técnico no que concerne o isolamento e avaliação da qualidade de mitocôndrias de fígado e encéfalo de camundongos; e a investigação do efeito de despolarizante PTZ em uma curva de concentrações em funções bioenergéticas e complexos mitocondriais.

PARTE III: DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4. DISCUSSÃO

As epilepsias são investigadas constantemente em vista da ampla variedade de possíveis causas e prognósticos e para o aprimoramento das abordagens terapêuticas. Por sua vez as formas de epilepsias sem causa definida necessitam investigações mais aprofundadas para nortear as diretrizes de controle e tratamento. Em relação a fisiopatologia das epilepsias, as descargas elétricas anormais e excessivas no encéfalo demandam uma expressiva quantidade de energia ao encéfalo. Por sua vez, as mitocôndrias exercem funções fundamentais para a manutenção da atividade neuronal normal, como fornecimento de energia e tamponamento de Ca^{2+} (Devine & Kittler, 2018); já a investigação do papel da disfunção mitocondrial na fisiopatologia de epilepsias ainda não é totalmente esclarecida, especialmente para as epilepsias adquiridas (Zsurka & Kunz, 2015). Esse contexto justifica os nossos objetivos em contribuir para o melhor entendimento do papel mitocondrial diante de crises convulsivas em modelos animais. O objetivo de investigar a bioenergética mitocondrial em modelos de epilepsias almeja promover novos dados sobre mecanismos fisiopatológicos e novos possíveis alvos terapêuticos.

Até o nosso conhecimento, poucos trabalhos investigaram o perfil bioenergético do tecido encefálico de peixe-zebra. Em um dos estudos na área toxicológica, o modelo para avaliação da respiração mitocondrial avalia o impacto da exposição de diferentes concentrações de urânio em fibras musculares e no tecido encefálico, no entanto o mesmo não apresenta detalhes metodológicos em relação a preparação da amostra (Lerebours et al., 2010). Nosso grupo de pesquisa é um dos primeiros a trabalhar com diferentes métodos de preparo de tecido encefálico de peixe-zebra para avaliação da bioenergética mitocondrial. Nós verificamos na literatura que diferentes amostras são usadas para acessar o perfil respiratório, como por exemplo: células intactas, células permeabilizadas, homogeneizado total, mitocôndrias isoladas (Makrecka-Kuka et al., 2015). A escolha do método de preparo de amostra empregado para o respectivo modelo (celular ou animal) deve levar em consideração as vantagens e limitações para avaliação da respirometria (Brand & Nicholls, 2011). Ademais, priorizou-se o desenvolvimento de protocolos para o uso do menor número de animais possíveis para os ensaios de respirometria.

No capítulo I nós empregamos o peixe-zebra adultos, considerando as suas vantagens para este trabalho, o tamanho reduzido do encéfalo (aproximadamente 5 mg de massa), possibilitou mensurar o perfil respiratório total do tecido, diferente de quando se trabalha com roedores que possuem encéfalo maior, e em que a amostragem é necessária pra essa análise (Mourier et al., 2014); por outro lado, sabemos também que o pequeno tamanho do encéfalo de

peixe-zebra limita por exemplo a avaliação das diferentes estruturas isoladas como realizado em roedores (Cavalcanti-de-Albuquerque et al., 2018). Na primeira parte do trabalho avaliamos potenciais métodos de dissociação de tecido encefálico total e observamos que a dissociação por pipeta Pasteur de vidro com ponta polida gerou um dissociado encefálico com maior número de células viáveis quando comparado aos demais métodos de dissociação (mecânico por pistilo e enzimático com colagenase e tripsina, independentes). A literatura descreve algumas desvantagens para o emprego de apenas enzimas para dissociar o tecido encefálico (Maric e Barker, 2004); por exemplo, no caso da tripsina (concentração de 0.072% e 40 min de incubação) pode haver inativação de NMDARs (Allen et al., 1988). Enquanto que a comparação dos métodos mecânicos, o uso do pistilo produziu maior variabilidade entre as preparações, com essas observações foi possível definir pelo método de dissociação com Pasteur de vidro com ponta polida para preparação das amostras.

Na segunda parte do trabalho, o método de dissociação otimizado foi aplicado para investigarmos a função mitocondrial em condições de exposição a compostos indutores de crises epiléticas. O tratamento com PTZ *in vitro* aumentou significativamente a p/O_2 , o que pode indicar uma hidrólise aumentada de ATP neuronal, uma vez que o tratamento agudo de PTZ pode levar a um aumento do influxo de Ca^{2+} e Na^+ , levando a uma elevação nas ATPases Na^+/K^+ e Ca^{2+} (Carrasco-Pozo et al., 2015).

O modelo de SE induzido por ácido caínico *in vivo* apresentou aumento na CTE o que está relacionado à capacidade mitocondrial de responder a um aumento na demanda de energia, especialmente neurônios, quando experimentamos uma demanda de ATP (Yadava & Nicholls, 2007).

Os tratamentos agudos empregando PTZ e NDMA em meio livre de Mg^{2+} tem o sentido de acessar a respiração celular no momento em que as mesmas são expostas aos agentes. Nós hipotetizamos que seria possível detectar se alguma variável está sendo interferidas e/ou alteradas no tal momento. O que é diferente de induzir a crise por exposição ou injeção empregando animal vivo e proceder com a dissecação do encéfalo e processamento da amostra. Esse objetivo deriva de perspectivas de trabalhos prévios do grupo, sendo que, por exemplo, a caracterização comportamental dos efeitos do PTZ em peixe-zebra já está bem fundamentada (Mussulini et al., 2013), entretanto a bioenergética com exposição aguda permanecia elusiva.

Embora tenhamos relatado aqui que variáveis mitocondriais são alteradas em algumas condições epiléticas, alguns questionamentos motivaram o estudo indicado no capítulo II. Para tal, nós otimizamos o protocolo para obtenção do homogenato total de encéfalo de peixe-zebra

adulto, com o intuito de investigar aspectos inerentes às mitocôndrias. O perfil respiratório do homogeneizado nos permite avaliar os estados respiratórios, para isso testamos, primeiramente, diferentes quantidades de massa tecidual (5mg, 10mg e 15mg). Observamos que o emprego de 5mg de tecido é o suficiente para o ensaio ser realizado sem intercorrências, isto é, sem a necessidade de interrupção do experimento para reposição de O₂ na *chamber* por consequência do seu consumo excessivo. A correspondência da massa tecidual sugerida para esse protocolo corresponde a 0,2 a 0,5 mg de proteínas. Um excesso de proteína correspondente a um maior conteúdo de tecido empregado (10 e 15mg de tecido) prejudicam o andamento experimental, sendo necessário abrir várias vezes (média de 4 vezes para 15mg) a *chamber* para reposição do O₂ consumido pelo excesso de amostra. Comparado as células dissociadas, preparar o homogeneizado é conveniente pela rapidez que assegura melhor a manutenção da qualidade mitocôndrias e por necessitar de homogeneizações em mini potter para rompimento da membrana celular empregando 1 encéfalo, sem necessidade de *pool*. Outro detalhe metodológico importante verificado trata-se da normalização de dados. O fluxo de O₂ das células dissociadas empregadas no capítulo I foi normalizado por massa tecidual (mg de tecido), sendo um viés metodológicos por causa da massa reduzida se a pesagem do tecido não for realizada de forma adequada. No que diz respeito ao homogeneizado de tecido encefálico de peixe-zebra, foi possível a normalização por massa de proteína (mg de proteína), o que assegurou menores chances de vieses metodológicos pela maior precisão. O homogeneizado constitui um conjunto de elementos celulares de tecido encefálico livres, visto que a homogeneização gera o rompimento de membrana celulares, tem-se mitocôndrias disponíveis no meio, além disso, se considera também a presença de traços de células sanguíneas. Diferentemente de espécies de mamíferos, em peixes a mitocôndria é importante para a diferenciação dos eritrócitos (Davuluri et al., 2016).

Após a padronização do perfil respiratório do homogeneizado, o mesmo foi empregado para avaliar o efeito de concentrações de Ca²⁺ em mitocôndrias de peixe-zebra. Esse objetivo foi pensando de acordo com a linha de pesquisa que busca o entendimento da fisiopatologia das epilepsias. A elevação dos níveis intracelulares de Ca²⁺ é um dos processos celulares desencadeador da ativação neuronal excessiva e hipersincrônica e entender o papel do Ca²⁺ como segundo mensageiro na indução e manutenção das epilepsias pode fornecer novas perspectivas (DeLorenzo et al., 2005). Durante o período de repouso, os neurônios possuem baixas concentrações de Ca²⁺ intracelulares e durante a ativação excessiva, como no caso das crises epiléticas, as concentrações se elevam, dessa forma empregamos duas concentrações

baseadas em literatura (500nm e 5 μ M) para representar ambas situações (Berridge et al., 2000). Observou-se diminuição da taxa respiratória de forma concentração-dependente nos grupos tratados com concentrações de Ca²⁺. Em um estudo empregando mitocôndrias isoladas de tecido encefálico de ratos os autores também observaram diminuição da taxa respiratória causada pela exposição a concentrações crescentes de Ca²⁺ (Pandya et al., 2013). De acordo com os dados obtidos no nosso trabalho o estado 3, estado 4 e o desacoplamento foram diminuídos pela presença de ambas concentrações de Ca²⁺. Corroborando, o controle respiratório, indicativo de integridade mitocôndria, também diminuiu nos grupos expostos a Ca²⁺. De todo modo, um excessivo acúmulo de Ca²⁺ no interior da mitocôndria, que ocorre em casos de despolarização recorrente, em crises epiléticas por exemplo, desencadeia a falha mitocondrial e morte neuronal (Kramer & Bressan, 2018; Steinlein, 2014). Ademais, em alguns tipos de epilepsias os sistemas de sinalização por Ca²⁺ estão alterados (Bergantin, 2021). Estão em aberto algumas questões que geraram perspectivas para continuidade e melhor conclusão deste trabalho. Entre elas a avaliação de uma curva de concentração de Ca²⁺, com concentrações menores às avaliadas, seguido da avaliação bioenergética, mas dessa vez na presença e ausência de quelantes e inibidores de transporte de Ca²⁺. Pretendemos avaliar a atividade das enzimas moduladas por Ca²⁺ (como piruvato desidrogenase e do ciclo do ácido cítrico) diante das concentrações expostas.

O capítulo III compõe a etapa referente ao doutorado sanduíche, realizado no *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires* na *Université de Bordeaux* na França, em que um dos objetivos foi aprimorar os conhecimentos e aprender técnicas de avaliação de função mitocondrial, principalmente o isolamento mitocondrial para emprego em respirometria. Dessa forma, a estratégia foi isolar mitocôndrias de fígado e encéfalo de camundongos e avaliar o efeito da exposição aguda ao PTZ na bioenergética mitocondrial. Um dos motivos desta escolha foi pelo protocolo de isolamento mitocondrial estar muito bem consolidado em literatura. E isolamento de mitocôndrias de fígado de camundongo nos serviu de controle e para comparação por estar muito bem estabelecido no laboratório visitado. Outra justificativa do emprego de ambos os tecidos se deu porque mitocôndrias do fígado e do encéfalo respondem de maneiras diferentes aos tratamentos; por exemplo, as mitocôndrias hepáticas são menos sensíveis do que as mitocôndrias encefálicas em relação à despolarização induzida por Ca²⁺ (Vergun & Reynolds, 2005). Ademais, o encéfalo é preferencialmente objeto de investigação para indução de crises epiléticas por PTZ, enquanto que o impacto do PTZ nas mitocôndrias do fígado foi menos investigado (Yu et al., 1998). Levamos em consideração também que as mitocôndrias

isoladas do encéfalo compõem uma preparação que advém de diferentes tipos celulares (neurônios e glia), enquanto que o tecido hepático tem composição homogênea. O PTZ, por sua vez, é composto clássica e amplamente empregado em modelos animais de investigação. Os modelos animais atuais para investigação da epilepsia são indispensáveis para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas. No entanto, o mecanismo completo de ação do PTZ ainda precisa ser compreendido para em última instância obter novos medicamentos antiepilépticos e protocolos de tratamento aprimorados.

Na primeira etapa nós encontramos o perfil de fluxo de O₂ das mitocôndrias isoladas por meio da adição de substratos que geram consumo de O₂ vinculado ao complexo I (piruvato, malato e glutamato) e complexo II (succinato e rotenona), separadamente. Em termos de perfil bioenergético observado neste trabalho, as mitocôndrias isoladas de encéfalo apresentaram menor fluxo de O₂ para complexo I do que para complexo II e o perfil oposto foi detectado nas mitocôndrias do fígado, corroborando como dados prévios, no caso do fígado (Mourier et al., 2014). De acordo com nossas buscas, essas observações para mitocôndrias encefálicas não são descritas na literatura em trabalho empregando mitocôndrias isoladas de encéfalo de ratos (Crescenzo et al., 2019). Uma vez conhecido e estabelecido o perfil respiratório das mitocôndrias isoladas de ambos tecidos, partimos para a etapa de tratamento agudo com PTZ em mitocôndrias isoladas.

O PTZ foi o agente de escolha para investigação também por ser amplamente empregados na indução de crises convulsivas. Além da sua função como antagonista GABAérgico, o PTZ aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio no encéfalo como consequência da indução de crises convulsivas (Waldbaum & Patel, 2010; Zhu et al., 2016). Além disso, o PTZ é uma molécula pequena (138,17 g/mol) e lipofílica que pode atravessar membranas e foi detectada no encéfalo de peixe-zebra adulto (Mussulini et al., 2013), mas o efeito sobre mitocôndrias não tinha sido testado até então. Sendo assim, testamos diferentes concentrações de PTZ em mitocôndrias intactas e permeabilizadas de fígados e encéfalo de camundongos. Nós questionamos o seguinte: o PTZ causa algum outro efeito sobre mitocôndrias além do estresse oxidativo já descrito?

Como as concentrações de PTZ usadas em estudos com modelos *in vitro* e *in vivo* variam amplamente (de 10 a 40 mM) (Eloqayli et al., 2002; Giachello et al., 2013; Ibhazehiebo et al., 2018; Nuñez-figueredo et al., 2014; Podlasz et al., 2018; Rahn et al., 2014; Sheng et al., 2016; S. Zhang et al., 2014) nós resolvemos realizar uma curva de titulação do PTZ, iniciando em 2,5 até 40mM. Os testes foram realizados em preparações de mitocôndrias no estado

fosforilativo (estado 3), em três condições independentes de substratos: piruvato, glutamato e malato; succinato e rotenona; succinato. Nesses experimentos, observamos que o PTZ diminui a atividade do complexo I pelo menor fluxo de O₂ na condição de substratos para tal complexo. Em seguida, fixamos as concentrações de PTZ em 5, 10 e 20mM para investigar o efeito do PTZ nos estados fosforilativo (estado 3), não fosforilativo (estado 4) e desacoplado. As concentrações de 10 mM e 20mM de PTZ diminuíram a respiração dependente do complexo I em mitocôndrias de encéfalo. Em mitocôndrias de fígado, somente a concentração de 20 mM reduziu a respiração. Podemos inferir que as mitocôndrias encefálicas são mais sensíveis ao PTZ porque concentrações mais baixas foram capazes de inibir o complexo I em comparação com as mitocôndrias hepáticas. De qualquer forma, o prejuízo nas funções mitocondriais hepáticas, mesmo que em concentrações mais altas podem sugerir um efeito inespecífico (Yu et al., 1998).

Salienta-se que a respiração mitocondrial depende também de atividades de desidrogenase e transporte de coenzimas da matriz mitocondrial. A permeabilização de mitocôndrias demonstra o efeito independente desses processos citados, pois os complexos estão expostos ao meio e para esse experimento adicionamos coenzimas e substratos reduzidos em concentrações saturadas, conforme descrito anteriormente (Mourier et al., 2014). Da mesma forma, a presença de PTZ diminuiu a respiração em relação a presença de NADH e NADH e succinato, mas a respiração foi semelhante quando o succinato foi substrato em concentrações saturadas. Assim, encontramos diminuição do fluxo relacionado ao complexo I causada por PTZ independente de enzimas da matriz e transportadores.

Ademais, nós descartamos a hipótese de que o mecanismo de ação do PTZ no complexo I é semelhante ao da inibição por rotenona pois avaliamos o consumo de O₂ das mitocôndrias intactas empregando succinato e PTZ em comparação com succinato e rotenona. Os fluxos respiratórios para as mitocôndrias do encéfalo e do fígado mostraram-se distintos quando o succinato e PTZ foram testados em comparação com o succinato e rotenona. A rotenona é inibidor seletivo do complexo I (Okun et al., 1999); enquanto que a diminuição da atividade do complexo I por PTZ é exercida por diferente mecanismo.

Como achado importante deste estudo, indicamos efeitos adicionais do PTZ, que mesmo sendo um composto amplamente empregado em pesquisa científica não possui o completo mecanismo de ação elucidado. Os dados obtidos podem proporcionar uma nova visão do mecanismo de ação do PTZ e colaborar em futuras investigações mais um recurso para,

presumivelmente, compreender a fisiopatologia em modelos de epilepsias e facilitar novos alvos de investigação como as mitocôndrias.

Esse caminho parece ser promissor, visto que a disfunção mitocondrial causa mais de 50 doenças diferentes que atingem pacientes em todas as fases da vida (Pagliarini et al., 2008). E a mitocôndria é um alvo terapêutico para compor o tratamento de doenças neurodegenerativas, principalmente visando o aprimoramento da bioenergética (Murphy & Hartley, 2018). Mas, avanços nos protocolos de tratamento de epilepsias são necessários (Rahman, 2019).

Para finalizar, sugerimos que o PTZ pode ser considerado como um inibidor do complexo I em investigações futuras. Naturalmente, esse achado colabora para desenhar estratégias farmacológicas para um alvo específico mitocondrial, não necessariamente como o principal ou único mecanismo de ação, mas como um adicional. Resumindo o conhecimento atual: PTZ inibe o receptor GABA_A (Huang et al., 2001), promove a produção de espécies reativas de oxigênio (Zhu et al., 2016) e inibe o complexo mitocondrial I. Consideramos que são necessárias mais investigações sobre: a seletividade de PTZ nas mitocôndrias do fígado e do encéfalo, a correlação da produção de espécies reativas de oxigênio e inibição do complexo I e a contribuição da inibição do complexo I para o SE. Sendo assim, uma das importantes questões geradas é: a inibição de complexo I compõem o efeito do PTZ para indução da crise?

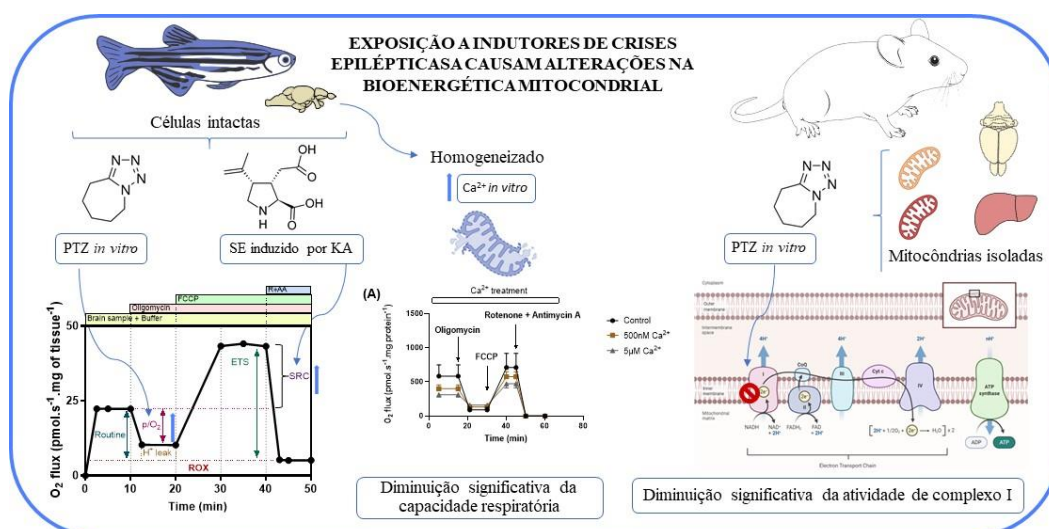
O presente trabalho traz evidências que sustentam o conceito de que crises epiléticas estão relacionadas com comprometimento de funções mitocondriais, o que de forma translacional pode indicar contribuição da disfunção mitocondrial para a condição clínica de pacientes diagnosticados com epilepsias adquiridas. Isto é, indica-se considerar o dano mitocondrial como parte da fisiopatologia de epilepsias adquiridas. Dessa forma, a prevenção e/ou o reparo do dano mitocondrial podem ser estratégias de prevenção e tratamento adicionados às diretrizes clínicas.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou a otimização de método de dissociação celular de tecido encefálico de peixe-zebra adulto para emprego em respirometria. Com isso destacamos a dissociação mecânica com pipeta Pasteur de vidro com ponta polida como o método mais adequado. A respirometria das células dissociadas obtidas e expostas de forma aguda a 20mM de PTZ apresentaram aumento significativo da p/O_2 e após SE induzido por ácido cáinico aumento significativo da CTE.

O emprego do homogeneizado de tecido encefálico de peixe-zebra adulto possibilita a avaliação dos estados respiratórios e necessita de um menor número de animais por experimento quando comparado às células dissociadas. A exposição do homogenato a concentrações de 500nM e 5 μ M de Ca^{2+} livre promoveu diminuição significativa nos estados respiratórios, indicando disfunções mitocondriais também pela diminuição significativa do RCR.

Empregamos mitocôndrias isoladas de fígado e encéfalo e observamos que são afetadas quando expostas a PTZ de forma concentração dependente, especificamente o complexo I tem sua atividade diminuída, constatada pela diminuição do fluxo de O_2 , de forma direta e independente de desidrogenases e transporte. Desta forma, concluímos que esse composto, empregado para induzir crises epilépticas em modelos animais, pode causar também disfunção mitocondrial e sugerimos que esse fato seja levado em consideração nas próximas investigações.



6. PERSPECTIVAS

- Realizar curva de concentração de Ca^{2+} e avaliar a bioenergética de mitocôndrias de peixe-zebra na presença e ausência de quelantes.
- Avaliar a bioenergética mitocondrial na presença de inibidores de transporte de Ca^{2+} .
- Avaliar a atividade das enzimas moduladas por Ca^{2+} como piruvato desidrogenase e do ciclo do ácido cítrico diante das concentrações de Ca^{2+} expostas.
- Avaliar o estresse oxidativo mitocondrial diante do tratamento com PTZ.
- Avaliar compostos com potencial função modulatória o e/ou protetora do complexo I em modelos de epilepsia adquirida.
- Empregar inibidores de complexo I e avaliar potencial atividade epileptiforme em modelos animais.
- Avaliar a correlação da produção de espécies reativas de oxigênio e inibição do complexo I induzida pelo PTZ.
- Otimização de um protocolo para isolamento de sinaptossoma e mitocôndrias do tecido encefálico de peixe-zebra adulto.

7. REFERÊNCIAS

- Afrikanova, T., Serruys, A. S. K., Buenafe, O. E. M., Clinckers, R., Smolders, I., de Witte, P. A. M., Crawford, A. D., & Esguerra, C. V. (2013). Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. *PLoS ONE*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054166>
- Allen, C. N., Brady, R., Swann, J., Hori, N., & Carpenter, D. O. (1988). N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors are inactivated by trypsin. *Brain Research*, *458*(1), 147–150. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90507-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90507-0)
- Ambrogini, P., Torquato, P., Bartolini, D., Albertini, M. C., Lattanzi, D., Di Palma, M., Marinelli, R., Betti, M., Minelli, A., Cuppini, R., & Galli, F. (2019). Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1865*(6), 1098–1112. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.026>
- Asadi-pooaya, A. A., Simani, L., Shahisavandi, M., & Barzegar, Z. (2021). COVID-19 , de novo seizures , and epilepsy : a systematic review. *Neurological Sciences*, *42*, 415–431.
- Baggio, S., Mussulini, B. H., de Oliveira, D. L., Gerlai, R., & Rico, E. P. (2018). Embryonic alcohol exposure leading to social avoidance and altered anxiety responses in adult zebrafish. *Behavioural Brain Research*, *352*(June 2017), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.039>
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., Castro, P. A., Chege, S., Guyenet, S., & Taylor, M. R. (2007). A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia*, *48*(6), 1151–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01075.x>
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., & Hortopan, G. A. (2013). Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3410>
- Baranowski, C. J. (2018). The quality of life of older adults with epilepsy: A systematic review. *Seizure*, *60*(May), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.06.002>
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., & Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *Journal of Biological Chemistry*, *281*(25), 17347–17358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600906200>
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V., & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. In *Nature* (Vol. 476, Issue 7360, pp. 341–345). <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Beghi, E., Giussani, G., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Adib, M. G., Agrawal, S., Alahdab, F., Awasthi, A., Ayele, Y., Barboza, M. A., Belachew, A. B., Biadgo, B., Bijani, A., Bitew, H., Carvalho, F., Chaiah, Y., Daryani, A., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(4), 357–375. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30454-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30454-X)
- Benda, C. (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertbraten. *Arch. Anat. Physiol.*, *73*(1898), 393–398.
- Bergantin, L. B. (2021). The interplay among epilepsy, Parkinson´s disease, and inflammation: revisiting the link through Ca²⁺/cAMP signalling. *Current Neurovascular Research*, *18*, 1–8. <https://doi.org/10.2174/1567202618666210603123345>
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P. (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research*, *75*(1), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.015>
- Bernardi, P., & von Stockum, S. (2012). The permeability transition pore as a Ca²⁺ release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*, *52*(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.004>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Molecular Cell Biology/Nature Reviews*, *1*(October), 11–21.

- Bhagat, J., Zang, L., Nishimura, N., & Shimada, Y. (2020). Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. *Science of the Total Environment*, 728, 138707. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138707>
- Bonen, L., Cunningham, R. S., Gray, M. W., & Doolittle, W. F. (1977). Wheat embryo mitochondrial 18S ribosomal RNA: evidence for its prokaryotic nature. *Nucleic Acids Res.*, 4(3), 663–671.
- Borges, M. A., Min, L. L., Guerreiro, C. A. M., Yacubian, E. M. T., Cordeiro, J. A., Tognola, W. A., Borges, A. P. P., & Zanetta, D. M. T. (2004). Urban prevalence of epilepsy: Populational study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 62(2 A), 199–205. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2004000200002>
- Braga, M. M., Rosemberg, D. B., De Oliveira, D. L., Loss, C. M., Córdova, S. D., Rico, E. P., Silva, E. S., Dias, R. D., Souza, D. O., & Calcagnotto, M. E. (2013). Topographical analysis of reactive zinc in the central nervous system of adult zebrafish (*danio rerio*). *Zebrafish*, 10(3), 376–388. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0882>
- Braga, M. M., Silva, E. S., Rico, E. P., Pettenuzzo, L. F., Oliveira, D. L., Dias, R. D., Rocha, J. B. T., Calcagnotto, M. E., Tanguay, R. L., Souza, D. O., & Rosemberg, D. B. (2015). Modulation of the chelatable Zn pool in the brain by diethylthiocarbamate is associated with behavioral impairment in adult zebrafish. *Toxicology Research*, 4(2), 317–325. <https://doi.org/10.1039/c4tx00111g>
- Branco, C. dos S., Scola, G., Rodrigues, A. D., Cesio, V., Laprovitera, M., Heinzen, H., dos Santos, M. T., Fank, B., de Freitas, S. C. V., Coitinho, A. S., & Salvador, M. (2013). Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. *Brain Research Bulletin*, 92, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.11.008>
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Brandt, T., Mourier, A., Tain, L. S., Partridge, L., Larsson, N. G., & Kühlbrandt, W. (2017). Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*. *ELife*, 6, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.24662>
- Burtscher, J., Bean, C., Zangrandi, L., Kmiec, I., Agostinho, A., Scorrano, L., Gnaiger, E., Schwarzer, C., & Quintana, A. (2018). Proenkephalin Derived Peptides Are Involved in the Modulation of Mitochondrial Respiratory Control During Epileptogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00351>
- Burtscher, J., Zangrandi, L., Schwarzer, C., & Gnaiger, E. (2015). Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry. *Mitochondrion*, 25, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.10.007>
- Byrnes, J., Ganetzky, R., Lightfoot, R., Tzeng, M., Nakamaru-Ogiso, E., Seiler, C., & Falk, M. J. (2018). Pharmacologic modeling of primary mitochondrial respiratory chain dysfunction in zebrafish. *Neurochemistry International*, 117, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.07.008>
- Cadenas, E., & Davies, K. J. A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3–4), 222–230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
- Carrasco-Pozo, C., Tan, K. N., & Borges, K. (2015). Sulforaphane is anticonvulsant and improves mitochondrial function. *Journal of Neurochemistry*, 135(5), 932–942. <https://doi.org/10.1111/jnc.13361>
- Cavalcanti-de-Albuquerque, J. P., de Souza Ferreira, E., de Carvalho, D. P., & Galina, A. (2018). Mitochondria-Bound Hexokinase (mt-HK) Activity Differ in Cortical and Hypothalamic Synaptosomes: Differential Role of mt-HK in H₂O₂ Depuration. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5889–5900. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0807-9>
- Cavalheiro, E. A., Riche, D. A., & Le Gal La Salle, G. (1982). Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: A method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 53(6), 581–589.

- [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(82\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0013-4694(82)90134-1)
- Cerbaro, A. F., Rodrigues, V. S. B., Rigotti, M., Branco, C. S., Rech, G., de Oliveira, D. L., & Salvador, M. (2020). Grape seed proanthocyanidins improves mitochondrial function and reduces oxidative stress through an increase in sirtuin 3 expression in EA.hy926 cells in high glucose condition. *Molecular Biology Reports*, *47*(5), 3319–3330. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05401-x>
- Chakraborty, P., Sanchez, N. A., Kaddumukasa, M., Kajumba, M., Kakooza-Mwesige, A., Van Noord, M., Kaddumukasa, M. N., Nakasujja, N., Haglund, M. M., & Koltai, D. C. (2021). Stigma reduction interventions for epilepsy: A systematized literature review. *Epilepsy and Behavior*, *114*(xxxx), 107381. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107381>
- Chan, F., Lax, N. Z., Voss, C. M., Aldana, B. I., Whyte, S., Jenkins, A., Nicholson, C., Nichols, S., Tilley, E., Powell, Z., Waagepetersen, H. S., Davies, C. H., Turnbull, D. M., & Cunningham, M. O. (2019). The role of astrocytes in seizure generation: Insights from a novel in vitro seizure model based on mitochondrial dysfunction. *Brain*, *142*(2), 391–411. <https://doi.org/10.1093/brain/awy320>
- Chance, B., & Williams, G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem*, *217*(1), 409–427.
- Chaturvedi, R. K., & Beal, M. F. (2013). Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radical Biology and Medicine*, *63*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.018>
- Cherubini, M., Lopez-Molina, L., & Gines, S. (2020). Mitochondrial fission in Huntington's disease mouse striatum disrupts ER-mitochondria contacts leading to disturbances in Ca²⁺ efflux and Reactive Oxygen Species (ROS) homeostasis. *Neurobiology of Disease*, *136*(January), 104741. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104741>
- Chirchiglia, D., Chirchiglia, P., & Marotta, R. (2019). When History Meets Neurology: Neurological Diseases of Famous People. *Neuroscientist*, *25*(5), 388–393. <https://doi.org/10.1177/1073858419835542>
- Choi, S. W., Gerencser, A. A., & Nicholls, D. G. (2009). Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: Spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *Journal of Neurochemistry*, *109*(4), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06055.x>
- Civera-Tregón, A., Domínguez, L., Martínez-Valero, P., Serrano, C., Vallmitjana, A., Benítez, R., Hoenicka, J., Satrustegui, J., & Palau, F. (2021). Mitochondria and calcium defects correlate with axonal dysfunction in GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth mouse model. *Neurobiology of Disease*, *152*(105300), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105300>
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E., & Pozzan, T. (2010). Mitochondria: The calcium connection. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1797*(6–7), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.05.005>
- Crescenzo, R., Spagnuolo, M. S., Cancelliere, R., Iannotta, L., Mazzoli, A., Gatto, C., Iossa, S., & Cigliano, L. (2019). Effect of Initial Aging and High-Fat/High-Fructose Diet on Mitochondrial Bioenergetics and Oxidative Status in Rat Brain. *Molecular Neurobiology*, *56*(11), 7651–7663. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1617-z>
- Crompton, M., Kunzi, M., & Carafoli, E. (1977). *The Calcium-Induced and Sodium-Induced Effluxes of Calcium from Heart Mitochondria*. 558, 549–558.
- Cruciat, C. M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., & Stuart, R. A. (2000). The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(24), 18093–18098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001901200>
- da Silva, J. S., Nonose, Y., Rohden, F., Lukasewicz Ferreira, P. C., Fontella, F. U., Rocha, A., Brochier, A. W., Apel, R. V., de Lima, T. M., Seminotti, B., Amaral, A. U., Galina, A., & Souza, D. O. (2020). Guanosine Neuroprotection of Presynaptic Mitochondrial Calcium Homeostasis in a Mouse Study with Amyloid- β Oligomers. *Molecular Neurobiology*, *57*(11), 4790–4809. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02064-4>
- Dabke, P., & Das, A. M. (2020). Mechanism of Action of Ketogenic Diet Treatment: Impact of

- Decanoic Acid and Beta—Hydroxybutyrate on Sirtuins and Energy Metabolism in Hippocampal Murine Neurons. *Nutrients*, *12*(2379), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12082379>
- Davuluri, G., Song, P., Liu, Z., Wald, D., Sakaguchi, T. F., Green, M. R., & Devireddy, L. (2016). Inactivation of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2 delays zebrafish erythroid maturation by conferring premature mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(11), E1460–E1469. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600077113>
- De Luna, N., Turon-Sans, J., Cortes-Vicente, E., Carrasco-Rozas, A., Illán-Gala, I., Dols-Icardo, O., Clarimón, J., Lleó, A., Gallardo, E., Illa, I., & Rojas-García, R. (2020). Downregulation of miR-335-5P in Amyotrophic Lateral Sclerosis Can Contribute to Neuronal Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61246-1>
- DeLorenzo, R. J., Sun, D. A., & Deshpande, L. S. (2005). Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacology & Therapeutics*, *105*(3), 229–266. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2004.10.004>
- Deshpande, L. S., Blair, R. E., Ziobro, J. M., Sombati, S., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2007). Endocannabinoids block status epilepticus in cultured hippocampal neurons. *European Journal of Pharmacology*, *558*(1–3), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.030>
- Devine, M. J., & Kittler, J. T. (2018). Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(2), 63–80. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.170>
- Dos Santos, T. G., Mussulini, B. H. M., Frangipani, L. A., & de Oliveira, D. L. (2020). Differential impact of shorter and longer periods of environmental enrichment on adult zebrafish exploratory activity (*Danio rerio*) in the novel tank paradigm. *Behavioural Processes*, *181*(November 2019), 104278. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104278>
- Drago, I., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2011). After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO Journal*, *30*(20), 4119–4125. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.337>
- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., & Robinson, P. J. (2008). A rapid percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols*, *3*(11), 1718–1728. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.171>
- Edelstein, O. E., Shorer, T., Shorer, Z., & Bachner, Y. G. (2019). Correlates of quality of life in mothers of children with diagnosed epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, *93*, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.01.039>
- Eloqayli, H., Qu, H., Unsgård, G., Sletvold, O., Hadidi, H., & Sonnewald, U. (2002). Effects of pentylenetetrazole and glutamate on metabolism of [U-13C]glucose in cultured cerebellar granule neurons. *Neurochemistry International*, *40*(2), 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00073-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00073-0)
- Fecher, C., Trovò, L., Müller, S. A., Snaidero, N., Wettmarshausen, J., Heink, S., Ortiz, O., Wagner, I., Kühn, R., Hartmann, J., Karl, R. M., Konnerth, A., Korn, T., Wurst, W., Merkler, D., Lichtenthaler, S. F., Perocchi, F., & Miggelid, T. (2019). Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. *Nature Neuroscience*, *22*(10), 1731–1742. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0479-z>
- Fernandes, J. G., Schmidt, M. I., Monte, T. L., Tozzi, S., & Sander, J. W. A. S. (1992). AES Proceedings - Prevalence of Epilepsy: The Porto Alegre Study. In: Annual Meeting of the American Epilepsy Society, Seattle, Washington, December 6–9, 1992. *Epilepsia*, *33*(s3), 1–140. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01716.x>
- Fernandez-sanz, C., Fuente, S. De, & Sheu, S. (2019). Mitochondrial Ca²⁺ concentrations in live cells: quantification methods and discrepancies. *Federation of European Biochemical Societies*, *593*, 1528–1541. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13427>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Peltola, J., Roulet, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Mosh, S. L., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Folbergrová, J., Druga, R., Otáhal, J., Haugvicová, R., Mareš, P., & Kubová, H. (2005). Seizures induced in immature rats by homocysteic acid and the associated brain damage are prevented by

- group II metabotropic glutamate receptor agonist (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate. *Experimental Neurology*, 192(2), 420–436. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.12.019>
- Folbergrová, J., Ješina, P., Drahota, Z., Lisý, V., Haugvicová, R., Vojtíšková, A., & Houštěk, J. (2007). Mitochondrial complex I inhibition in cerebral cortex of immature rats following homocysteic acid-induced seizures. *Experimental Neurology*, 204(2), 597–609. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.12.010>
- Folbergrová, J., Ješina, P., Haugvicová, R., Lisý, V., & Houštěk, J. (2010). Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neurochemistry International*, 56(3), 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.11.011>
- Fontana, B. D., Mezzomo, N. J., Kalueff, A. V., & Rosemberg, D. B. (2018). The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Experimental Neurology*, 299, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>
- French, J. A., Brodie, M. J., Caraballo, R., Devinsky, O., Ding, D., Jehi, L., Jette, N., Kanner, A., Modi, A. C., Newton, C. R., Patel, A. A., Pennell, P. B., Perucca, E., Sander, J. W., & Ingrid E. Scheffer, Gag, J. H. C. (2020). Keeping people with epilepsy safe during the COVID-19 pandemic. *Neurology*, 94(23), 1032–1037. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009632>
- Fu, J., Gong, Z., & Bae, S. (2021). Ecotoxicogenomic analysis of zebrafish embryos exposed to triclosan and mixture triclosan and methyl triclosan using suppression subtractive hybridization and next-generation sequencing. *Journal of Hazardous Materials*, 414(1), 125450. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125450>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., ... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19, 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Giachello, C. N. G., Premoselli, F., Montarolo, P. G., & Ghirardi, M. (2013). Pentylentetrazol-Induced Epileptiform Activity Affects Basal Synaptic Transmission and Short-Term Plasticity in Monosynaptic Connections. *PLoS ONE*, 8(2), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056968>
- Grone, B. P., & Baraban, S. C. (2015). Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. *Nature Neuroscience*, 18(3), 339–343. <https://doi.org/10.1038/nn.3934>
- Grünspan, L. D., Mussulini, B. H. M., Baggio, S., dos Santos, P. R., Dumas, F., Rico, E. P., de Oliveira, D. L., & Moura, S. (2018). Teratogenic and anticonvulsant effects of zinc and copper valproate complexes in zebrafish. *Epilepsy Research*, 139(December 2017), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.01.005>
- Gupta, S., Kass, G. E. N., Szegezdi, E., & Joseph, B. (2009). The mitochondrial death pathway: A promising therapeutic target in diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(6), 1004–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00697.x>
- Hajnóczky, G., Davies, E., & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 445–454. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00616-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00616-8)
- Halestrap, A. P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), 821–831. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.002>
- Hansen, S. L., Sperling, B. B., & Sánchez, C. (2004). Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylentetrazole-kindled mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.026>
- Hausman-Kedem, M., Menascu, S., & Kramer, U. (2018). Efficacy of CBD-enriched medical

- cannabis for treatment of refractory epilepsy in children and adolescents – An observational, longitudinal study. *Brain and Development*, 40(7), 544–551.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.03.013>
- Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M., & Berridge, M. V. (2017). Functional mitochondria in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, 8(NOV).
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00296>
- Hillert, M. H., Imran, I., Zimmermann, M., Lau, H., Weinfurter, S., & Klein, J. (2014). Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Journal of Neurochemistry*, 131, 42–52. <https://doi.org/10.1111/jnc.12787>
- Hingray, C., McGonigal, A., Kotwas, I., & Micoulaud-Franchi, J. A. (2019). The Relationship Between Epilepsy and Anxiety Disorders. *Current Psychiatry Reports*, 21(6).
<https://doi.org/10.1007/s11920-019-1029-9>
- Hollenbeck, P. J., & Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*, 118(23), 5411–5419. <https://doi.org/10.1242/jcs.02745>
- Holper, L., Ben-Shachar, D., & Mann, J. (2019). Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease. *Neuropsychopharmacology*, 44(5), 837–849. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0090-0>
- Hoshijima, K., Jurynek, M. J., Klatt Shaw, D., Jacobi, A. M., Behlke, M. A., & Grunwald, D. J. (2019). Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Methods for Generating Deletion Mutations and F0 Embryos that Lack Gene Function in Zebrafish. *Developmental Cell*, 51(5), 645–657.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.004>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, R. Q., Bell-Horner, C. L., Dibas, M. I., Covey, D. F., Drewe, J. A., & Dillon, G. H. (2001). Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: Mechanism and site of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 986–995.
- Hunt, R. F., Hortopan, G. A., Gillespie, A., & Baraban, S. C. (2012). A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Experimental Neurology*, 237(1), 199–206.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.013>
- Ibhazehiebo, K., Gavrilovici, C., De La Hoz, C. L., Ma, S. C., Rehak, R., Kaushik, G., Meza Santoscoy, P. L., Scott, L., Nath, N., Kim, D. Y., Rho, J. M., & Kurrasch, D. M. (2018). A novel metabolism-based phenotypic drug discovery platform in zebrafish uncovers HDACs 1 and 3 as a potential combined anti-seizure drug target. *Brain*, 141(3), 744–761.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx364>
- Imran, I., Hillert, M. H., & Klein, J. (2015). Early metabolic responses to lithium/pilocarpine-induced status epilepticus in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 135(5), 1007–1018.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13360>
- Jaber, S. M., Yadava, N., & Polster, B. M. (2020). Mapping mitochondrial respiratory chain deficiencies by respirometry: Beyond the Mito Stress Test. *Experimental Neurology*, 328(December 2019), 113282. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113282>
- Jiang, T., Sun, Q., & Chen, S. (2016). Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 147, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.005>
- Johnson, M. E., & Bobrovskaya, L. (2015). NeuroToxicology An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene – environment interactions. *Neurotoxicology*, 46, 101–116.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002>

- Juan-García, A., Juan, C., Bind, M. A., & Engert, F. (2021). Study of locomotion response and development in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae exposed to enniatin A, enniatin B, and beauvericin. *Science of the Total Environment*, 777, 146075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146075>
- Junior, R. M., Cukiert, A., & Pinho, E. (1986). Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo: um estudo da prevalência. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 44(3), 243–254. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x1986000300004>
- Kalghatgi, S., Spina, C. S., Costello, J. C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J. R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O. S., & Collins, J. J. (2013). Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in mammalian cells. *Science Translational Medicine*, 5(192). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006055>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kanner, A. M. (2016). Management of psychiatric and neurological comorbidities in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 12(2), 106–116. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.243>
- Kannurpatti, S. S. (2017). Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(2), 381–395. <https://doi.org/10.1177/0271678X16680637>
- Karbowski, M., & Neutzner, A. (2012). Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathologica*, 123(2), 157–171. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0921-0>
- Keezer, M. R., Sisodiya, S. M., & Sander, J. W. (2016). Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *The Lancet Neurology*, 15(1), 106–115. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239–257.
- Khatri, N., & Man, H. Y. (2013). Synaptic activity and bioenergy homeostasis: Implications in brain trauma and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology*, 4 DEC(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00199>
- Kim, H. J., Yang, J. S., & Yoon, S. H. (2016). Brief low [Mg²⁺]_o - induced Ca²⁺ spikes inhibit subsequent prolonged exposure-induced excitotoxicity in cultured rat hippocampal neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*, 20(1), 101–109.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Koual, M., Tomkiewicz, C., Guerrero, I. C., Sherr, D., Barouki, R., & Coumoul, X. (2021). Aggressiveness and Metastatic Potential of Breast Cancer Cells Co-Cultured with Preadipocytes and Exposed to an Environmental Pollutant Dioxin: An in Vitro and in Vivo Zebrafish Study. *Environmental Health Perspectives*, 129(March), 1–12. <https://doi.org/10.1289/EHP7102>
- Kovács, R., Gerevich, Z., Friedman, A., Otáhal, J., Prager, O., Gabriel, S., & Berndt, N. (2018). Bioenergetic mechanisms of seizure control. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00335>
- Kramer, P., & Bressan, P. (2018). Our (Mother's) Mitochondria and Our Mind. *Perspectives on Psychological Science*, 13(1), 88–100. <https://doi.org/10.1177/1745691617718356>
- Kudin, A. P., Zsurka, G., Elger, C. E., & Kunz, W. S. (2009). Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 218(2), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.02.014>
- Kumar, M. G., Rowley, S., Fulton, R., Dinday, M. T., Baraban, S. C., & Patel, M. (2016). Altered glycolysis and mitochondrial respiration in a zebrafish model of Dravet syndrome. *ENeuro*, 3(2), 1002–1011. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0008-16.2016>
- Kundap, U. P., Kumari, Y., Othman, I., & Shaikh, M. F. (2017). Zebrafish as a model for epilepsy-induced cognitive dysfunction: A pharmacological, biochemical and behavioral approach.

- Frontiers in Pharmacology*, 8(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00515>
- Lackner, L. L. (2019). The Expanding and Unexpected Functions of Mitochondria Contact Sites. *Trends in Cell Biology*, 29(7), 580–590. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.009>
- Lamb, R., Ozsvari, B., Lisanti, C. L., Tanowitz, H. B., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: Treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*, 6(7), 4569–4584. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3174>
- Larsen, S., Kraunsøe, R., Gram, M., Gnaiger, E., Helge, J. W., & Dela, F. (2014). The best approach: Homogenization or manual permeabilization of human skeletal muscle fibers for respirometry? *Analytical Biochemistry*, 446(1), 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.023>
- Lerebours, A., Adam-Guillermin, C., Brèthes, D., Frelon, S., Floriani, M., Camilleri, V., Garnier-Laplace, J., & Bourdineaud, J. P. (2010). Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquatic Toxicology*, 100(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.007>
- Leslie, A. G. W., Abrahams, J. P., Braig, K., Lutter, R., Menz, R. I., Orriss, G. L., Van Raaij, M. J., & Walker, J. E. (1999). The structure of bovine mitochondrial F1-ATPase: An example of rotary catalysis. *Biochemical Society Transactions*, 27(2), 37–42. <https://doi.org/10.1042/bst0270037>
- Lévesque, M., Avoli, M., & Bernard, C. (2016). Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *Journal of Neuroscience Methods*, 260, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.009>
- Liang, L. P., Waldbaum, S., Rowley, S., Huang, T. T., Day, B. J., & Patel, M. (2012). Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: Attenuation by a lipophilic metalloporphyrin. *Neurobiology of Disease*, 45(3), 1068–1076. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.025>
- Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 669–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162653>
- Lim, A., & Thomas, R. H. (2020). The mitochondrial epilepsies. *European Journal of Paediatric Neurology*, 24, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.12.021>
- Lobo-Jarne, T., Nývltová, E., Pérez-Pérez, R., Timón-Gómez, A., Molinié, T., Choi, A., Mourier, A., Fontanesi, F., Ugalde, C., & Barrientos, A. (2018). Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics. *Cell Reports*, 25(7), 1786–1799.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.058>
- Lockshin, R. A., & Williams, C. M. (1964). Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 10(4), 643–649.
- Lum, G. R., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2020). Neurobiology of Disease Emerging roles for the intestinal microbiome in epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 135(May 2019), 104576. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104576>
- Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., & Diamantis, A. (2010). Epilepsy & Behavior Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. *Epilepsy and Behavior*, 17(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.10.023>
- Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., & Gnaiger, E. (2015). High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. *Biomolecules*, 5(3), 1319–1338. <https://doi.org/10.3390/biom5031319>
- Marchi, S., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial calcium uniporter complex: Molecular components, structure and physiopathological implications. *Journal of Physiology*, 592(5), 829–839. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268235>
- Martín-Jiménez, R., Campanella, M., & Russell, C. (2015). New Zebrafish Models of Neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 15(6), 1–7.

- <https://doi.org/10.1007/s11910-015-0555-z>
- Meira, I. D. A., Romão, T. T., Jannuzzelli, H., Krüger, L. T., Elisa, M., & Pires, P. (2019). Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. *Frontiers in Neuroscience*, 13(January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00005>
- Millevert, C., Hees, S. Van, Nelson, J., Fodjo, S., Wijtvliet, V., Faria, E., Villela, D. M., Rosso, B., Gil-nagel, A., Weckhuysen, S., & Colebunders, R. (2021). Impact of COVID-19 on the lives and psychosocial well-being of persons with epilepsy during the third trimester of the pandemic: Results from an international, online survey. *Epilepsy & Behavior*, 116, 107800. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107800>
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(6), 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.010>
- Mourier, A., Matic, S., Ruzzenente, B., Larsson, N. G., & Milenkovic, D. (2014). The respiratory Chain supercomplex organization is independent of COX7A2L isoforms. *Cell Metabolism*, 20(6), 1069–1075. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.005>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Murphy, M. P., & Hartley, R. C. (2018). Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(12), 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>
- Mussulini, Ben Hur M., Leite, C. E., Zenki, K. C., Moro, L., Baggio, S., Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Dias, R. D., Souza, T. M., Calcagnotto, M. E., Campos, M. M., Battastini, A. M., & de Oliveira, D. L. (2013). Seizures Induced by Pentylentetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. *PLoS ONE*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054515>
- Mussulini, Ben Hur Marins, Baggio, S., Moro, L., Dias, R., Calcagnotto, M., Rico, E. P., & Oliveira, D. L. de. (2016). Zebrafish as an Animal Model to Study Epileptic Seizures and Epileptic Syndromes. *Current Psychopharmacology*, 5(2), 194–210. <https://doi.org/10.2174/2211556005666160615090734>
- Mussulini, Ben Hur Marins, Vizuete, A. F. K., Braga, M., Moro, L., Baggio, S., Santos, E., Lazzarotto, G., Zenki, K. C., Pettenuzzo, L., Rocha, J. B. T. da, de Oliveira, D. L., Calcagnotto, M. E., Zuanazzi, J. A. S., Burgos, J. S., & Rico, E. P. (2018). Forebrain glutamate uptake and behavioral parameters are altered in adult zebrafish after the induction of Status Epilepticus by kainic acid. *NeuroToxicology*, 67, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.04.007>
- Nagarkatti, N., Deshpande, L. S., Carter, D. S., & Delorenzo, R. J. (2010). Dantrolene inhibits the calcium plateau and prevents the development of spontaneous recurrent epileptiform discharges following in vitro status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 32(1), 80–88. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07262.x>
- Nichols, B. J., & Denton, R. M. (1995). Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 149–150(1), 203–212. <https://doi.org/10.1007/BF01076578>
- Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(4), 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.008>
- Nikbakht, F., Mohammadkhanizadeh, A., & Mohammadi, E. (2020). How does the COVID-19 cause seizure and epilepsy in patients ? The potential mechanisms. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 46(August), 102535. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102535>
- Noronha, A. L. A., Borges, M. A., Marques, L. H. N., Zanetta, D. M. T., Fernandes, P. T., Boer, H. De, Esp, J., Miranda, C. T., Prilipko, L., Bell, G. S., Sander, J. W., & Li, L. M. (2007). Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. *Epilepsia*, 48(5), 880–885. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00974.x>
- Núñez-figueroa, Y., Ramírez-sánchez, J., Delgado-hernández, R., Porto-verdecia, M., Ochoa-rodríguez, E., Verdecia-reyes, Y., Marin-prida, J., González-durruthy, M., Uyemura, S. A., Rodrigues, F. P., Curti, C., Souza, D. O., & Pardo-andreu, G. L. (2014). JM-20, a novel benzodiazepine – dihydropyridine hybrid molecule, protects mitochondria and prevents ischemic

- insult-mediated neural cell death in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 726, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.021>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Okun, J. G., Lümmen, P., & Brandt, U. (1999). Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:Ubiquinone oxidoreductase). *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2625–2630. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2625>
- Olusanya, B. O., Wright, S. M., Nair, M. K. C., Boo, N. Y., Halpern, R., Kuper, H., Abubakar, A. A., Almasri, N. A., Arabloo, J., Arora, N. K., Backhaus, S., Berman, B. D., Breinbauer, C., Carr, G., de Vries, P. J., del Castillo-Hegyí, C., Eftekhari, A., Gladstone, M. J., Hoekstra, R. A., ... Kassebaum, N. J. (2020). Global burden of childhood epilepsy, intellectual disability, and sensory impairments. *Pediatrics*, 146(1), 1–17. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-2623>
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., & Mootha, V. K. (2008). A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell*, 134(1), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016>
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M. M., Rovira, I. I., Allen, M., Springer, D. A., Aponte, A. M., Gucek, M., Balaban, R. S., Murphy, E., & Finkel, T. (2013). The Physiological Role of Mitochondrial Calcium Revealed by Mice Lacking the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1464–1472. <https://doi.org/10.1038/ncb2868>
- Pandya, J. D., Nukala, V. N., & Sullivan, P. G. (2013). Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Frontiers in Neuroenergetics*, 5(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnene.2013.00010>
- Panteliadis, C. P., Vassilyadi, P., Fehlert, J., & Hagel, C. (2017). Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century. *Brain and Development*, 39(6), 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2017.02.002>
- Panula, P., Chen, Y. C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M., & Sallinen, V. (2010). The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease*, 40(1), 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>
- Pasquetti, M. V., Meier, L., Marafija, J. R., Barbieri Caus, L., Tort, A. B. L., & Calcagnotto, M. E. (2019). Hippocampal CA1 and cortical interictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research*, 1722(May). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146351>
- Pearson-Smith, J. N., & Patel, M. (2017). Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18112365>
- Petersen, M. H., Willert, C. W., Andersen, J. V., Waagepetersen, H. S., Skotte, N. H., & Nørremølle, A. (2019). Functional Differences between Synaptic Mitochondria from the Striatum and the Cerebral Cortex. *Neuroscience*, 406, 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.033>
- Podlasz, P., Jakimiuk, A., Kasica-Jarosz, N., Czaja, K., & Wasowicz, K. (2018). Neuroanatomical Localization of Galanin in Zebrafish Telencephalon and Anticonvulsant Effect of Galanin Overexpression. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(12), 3049–3059. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00239>
- Pogačnik, L., Ota, A., & Ulrih, N. P. (2020). An Overview of Crucial Dietary Substances and Their Modes of Action for Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 9(3), 576. <https://doi.org/10.3390/cells9030576>
- PORTARIA CONJUNTA Nº 17, DE 21 DE JUNHO DE 2018. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Epilepsia. https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt/arquivos/2021/portaria-conjunta-17_21_06_2018_pcdt-epilepsia.pdf.
- Qu, H., Eloqayli, H., & Sonnewald, U. (2005). Pentylentetrazole affects metabolism of astrocytes in culture. *Journal of Neuroscience Research*, 79(1–2), 48–54. <https://doi.org/10.1002/jnr.20306>

- Social Stigma of People with Epilepsy with regard to the Question of Employability. *Neurology Research International*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2018/4140508>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Starkov, A. A. (2010). The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. *FEBS Journal*, 277(18), 3652–3663. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07756.x>
- Stefani, D. De, Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2014). A 40 kDa protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230.A>
- Steinlein, O. K. (2014). Calcium signaling and epilepsy. *Cell and Tissue Research*, 357(2), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1849-1>
- Sun, J., Gao, X., Meng, D., Xu, Y., Wang, X., Gu, X., Guo, M., Xiaodong Shao, Jiang, C., Yan, H., & Zheng, Y. (2017). Antagomirs Targeting MicroRNA-134 Increase *Limk1* Levels After Experimental Seizures in Vitro and in Vivo. *Cell Physiol Biochem*, 43, 636–643. <https://doi.org/10.1159/000480647>
- Swaminathan, A., Hassan-Abdi, R., Renault, S., Siekierska, A., Riché, R., Liao, M., de Witte, P. A. M., Yanicostas, C., Soussi-Yanicostas, N., Drapeau, P., & Samarut, É. (2018). Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Current Biology*, 28(12), 1924–1937.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.061>
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., & Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, 9(3), 68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols*, 3(1), 59–69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>
- Vallverdú-Queralt, A., Boix, N., Piqué, E., Gómez-Catalan, J., Medina-Remon, A., Sasot, G., Mercader-Martí, M., Llobet, J. M., & Lamuela-Raventos, R. M. (2015). Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, 181, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.098>
- Van Hees, S., Siewe Fodjo, J. N., Wijtvliet, V., Van den Bergh, R., Faria de Moura Villela, E., da Silva, C. F., Weckhuysen, S., & Colebunders, R. (2020). Access to healthcare and prevalence of anxiety and depression in persons with epilepsy during the COVID-19 pandemic: A multicountry online survey. *Epilepsy and Behavior*, 112, 107350. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107350>
- Vergun, O., & Reynolds, I. J. (2005). Distinct characteristics of Ca²⁺-induced depolarization of isolated brain and liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1709(2), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.07.006>
- Visentin, A. P. V., Colombo, R., Scotton, E., Fracasso, D. S., Da Rosa, A. R., Branco, C. S., & Salvador, M. (2020). Targeting Inflammatory-Mitochondrial Response in Major Depression: Current Evidence and Further Challenges. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2972968>
- Vohora, D., Jain, S., Tripathi, M., & Potschka, H. (2020). COVID-19 and seizures: Is there a link? *Epilepsia*, 2019(July), 1840–1853. <https://doi.org/10.1111/epi.16656>
- Waldbaum, S., & Patel, M. (2010). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 88(1), 23–45. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.09.020>
- Wang, B. H., Hou, Q., Lu, Y. Q., Jia, M. M., Qiu, T., Wang, X. H., Zhang, Z. X., & Jiang, Y. (2018). Ketogenic diet attenuates neuronal injury via autophagy and mitochondrial pathways in pentylenetetrazol-kindled seizures. *Brain Research*, 1678, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.10.009>
- Wang, X. (2009). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 43(214), 95–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850>
- Watkins, L. V., Pickrell, W. O., & Kerr, M. P. (2019). Treatment of psychiatric comorbidities in patients with epilepsy and intellectual disabilities: Is there a role for the neurologist? *Epilepsy and Behavior*, 98, 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.09.010>

- Wells, J., Swaminathan, A., Paseka, J., & Hanson, C. (2020). Efficacy and safety of a ketogenic diet in children and adolescents with refractory epilepsy—a review. *Nutrients*, *12*(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12061809>
- West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol.*, *11*(6), 389–402. <https://doi.org/10.1038/nri2975>. Mitochondria
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- WHO. (2021). *Epilepsy*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Wilson, J. V. K., & Reynolds, E. H. (1990). Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a babylonian treatise on epilepsy. *Medical History*, *34*(2), 185–198.
- Wong, K., Stewart, A., Gilder, T., Wu, N., Frank, K., Gaikwad, S., Suci, C., Dileo, J., Utterback, E., Chang, K., Grossman, L., Cachat, J., & Kalueff, A. V. (2010). Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Research*, *1348*, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.012>
- Yacubian, E. M. T., & Caboclo, L. O. S. F. (2011). Epilepsy & Behavior Epilepsy and stigma: An approach to understanding through the life and works of the Brazilian writer Machado de Assis (1839 – 1908). *Epilepsy & Behavior*, *20*(3), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.12.040>
- Yadava, N., & Nicholls, D. G. (2007). Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *Journal of Neuroscience*, *27*(27), 7310–7317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0212-07.2007>
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *82*, 4443–4447.
- Yin, J., Guo, J., Zhang, Q., Cui, L., Zhang, L., Zhang, T., Zhao, J., Li, J., Middleton, A., Carmichael, P. L., & Peng, S. (2018). Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicology in Vitro*, *51*(April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.05.001>
- Yu, Z., Yoshihisa, I., Mosato, M., & Igisu, H. (1998). Effects of pentachlorophenol, pentylenetetrazol and carnitine on mitochondria. *J UOEH*, *20*(4), 315–322.
- Zabinyakov, N., Bullivant, G., Cao, F., Fernandez Ojeda, M., Jia, Z. P., Wen, X. Y., Dowling, J. J., Salomons, G. S., & Mercimek-Andrews, S. (2017). Characterization of the first knock-out *aldh7a1* zebrafish model for pyridoxine-dependent epilepsy using CRISPR-Cas9 technology. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186645>
- Zaja-Milatovic, S., Gupta, R. C., Aschner, M., Montine, T. J., & Milatovic, D. (2008). Pharmacologic suppression of oxidative damage and dendritic degeneration following kainic acid-induced excitotoxicity in mouse cerebrum. *NeuroToxicology*, *29*(4), 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.04.009>
- Zarnowska, I. M. (2020). Therapeutic use of the ketogenic diet in refractory epilepsy: What we know and what still needs to be learned. *Nutrients*, *12*(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu12092616>
- Zenki, K. C., Kalinine, E., Zimmer, E. R., dos Santos, T. G., Mussulini, B. H. M., Portela, L. V. C., & de Oliveira, D. L. (2018). Memantine decreases neuronal degeneration in young rats submitted to LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus. *NeuroToxicology*, *66*, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.005>
- Zenki, K. C., Mussulini, B. H. M., Rico, E. P., Oliveira, D. L. de, & Rosemberg, D. B. (2014). Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: An in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. *Toxicology in Vitro*, *28*(5), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.008>
- Zenki, K. C., Souza, L. S. De, Góis, A. M., Lima, B. D. S., Araújo, A. A. D. S., Vieira, J. S., Camargo, E. A., Kalinine, E., Oliveira, D. L. De, & Walker, C. I. B. (2020). Coriandrum sativum Extract Prevents Alarm Substance-Induced Fear- and Anxiety-Like Responses in Adult Zebrafish. *Zebrafish*, *17*(2), 120–130. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1805>
- Zhang, S., Liang, F., Wang, B., Le, Y., & Wang, H. (2014). Elevated expression of pleiotrophin in

- pilocarpine-induced seizures of immature rats and in pentylenetetrazole-induced hippocampal astrocytes in vitro. *Acta Histochemica*, *116*(2), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.09.003>
- Zhang, Y., Zhang, M., Zhu, W., Yu, J., Wang, Q., Zhang, J., Cui, Y., Pan, X., Gao, X., & Sun, H. (2020). Succinate accumulation induces mitochondrial reactive oxygen species generation and promotes status epilepticus in the kainic acid rat model. *Redox Biology*, *28*(October 2019), 101365. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101365>
- Zhu, X., Shen, K., Bai, Y., Zhang, A., Xia, Z., Chao, J., & Yao, H. (2016). NADPH oxidase activation is required for pentylenetetrazole kindling-induced hippocampal autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, *94*, 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.004>
- Zimmermann, N., Castro-Pontes, M., Barqueta, R., Goes, P., Mufarrej, G., D'Andrea Meira, I., Fonseca, R. P., & Prigatano, G. P. (2020). Self-awareness and underestimation of cognitive abilities in patients with adult temporal lobe epilepsy after surgical treatment. *Epilepsy and Behavior*, *112*, 107463. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107463>
- Zsurka, G., & Kunz, W. S. (2015). Mitochondrial dysfunction and seizures: The neuronal energy crisis. *The Lancet Neurology*, *14*(9), 956–966. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00148-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00148-9)

8. ANEXO I: Carta de aceite do CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33921

Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SINALIZADOR E METABÓLICO DO GLUTAMATO DURANTE PERÍODOS DE HIPEREXCITABILIDADE NEURAL

Vigência: 01/11/2017 à 01/03/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

DIOGO LOSCH DE OLIVEIRA - coordenador desde 01/11/2017
KAMILA CAGLIARI ZENKI - Aluno de Doutorado desde 01/11/2017
LUANA MORO - Aluno de Mestrado desde 01/11/2017
GABRIELA LAZZAROTTO - Aluno de Especialização desde 01/11/2017
Giovana Rech - Aluno de Doutorado desde 01/11/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 426 peixes-zebra (Danio rerio) adultos a partir de 6 meses de idade, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 25 de Junho de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

9. ANEXO II: Trabalhos publicados em coautoria

Baggio, S., Zenki, K., Martins Silva, A., dos Santos, T. G., **Rech, G.**, Lazzarotto, G., Dias, R. D., Mussulini, B. H., Rico, E. P., & de Oliveira, D. L. (2020). Fetal alcohol spectrum disorders model alters the functionality of glutamatergic neurotransmission in adult zebrafish. *NeuroToxicology*, 78(March), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.03.003>

Cerbaro, A. F., Rodrigues, V. S. B., Rigotti, M., Branco, C. S., **Rech, G.**, de Oliveira, D. L., & Salvador, M. (2020). Grape seed proanthocyanidins improves mitochondrial function and reduces oxidative stress through an increase in sirtuin 3 expression in EA.hy926 cells in high glucose condition. *Molecular Biology Reports*, 47(5), 3319–3330. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05401-x>