



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARINA KOUTSODONTIS MACHADO ALVIM

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
PADRÃO DE ATROFIA HIPOCAMPAL E EXTRA-HIPOCAMPAL EM
PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

CAMPINAS

2019

MARINA KOUTSODONTIS MACHADO ALVIM

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E
PADRÃO DE ATROFIA HIPOCAMPAL E EXTRA-HIPOCAMPAL EM
PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Ciências.*

ORIENTADOR: DR. FERNANDO CENDES

COORIENTADORA: DRA ANA CAROLINA COAN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MARINA KOUTSODONTIS MACHADO ALVIM,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO CENDES
E COORIENTADA PELA PROFA. DRA ANA CAROLINA COAN

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2015/17066-0; CAPES

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6780-0761>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Morais e Oliveira - CRB 8/8985

AL88a Alvim, Marina Koutsodontis Machado, 1985-
Avaliação da relação entre marcadores inflamatórios e padrão de atrofia hipocampal e extra-hipocampal em pacientes com epilepsias de lobo temporal / Marina Koutsodontis Machado Alvim. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Fernando Cendes.

Coorientador: Ana Carolina Coan.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epilepsia. 2. Epilepsia do lobo temporal. 3. Imagem por ressonância magnética. 4. Marcadores inflamatórios. I. Cendes, Fernando, 1962-. II. Coan, Ana Carolina, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The relationship between inflammatory markers and hippocampal and extra-hippocampal atrophy patterns in patients with temporal lobe epilepsy

Palavras-chave em inglês:

Epilepsy

Temporal lobe epilepsy

Magnetic resonance imaging.

Inflammatory markers

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fernando Cendes [Orientador]

André Luis Fernandes Palmira

Marino Muxfeldt Bianchin

Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting

Marcio Luiz Figueiredo Balthazar

Data de defesa: 18-01-2019

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

MARINA KOUTSODONTIS MACHADO ALVIM

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CENDES

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. FERNANDO CENDES**
 - 2. PROF. DR. ANDRÉ LUIS FERNANDES PALMINI**
 - 3. PROF. DR. MARINO MUXFELDT BIANCHIN**
 - 4. PROF. DR. LUIZ EDUARDO GOMES GARCIA BETTING**
 - 5. PROF. DR. MARCIO LUIZ FIGUEREDO BALTHAZAR**
-

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 18/01/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Cendes e à minha co-orientadora Prof. Dra. Ana Carolina Coan pela confiança, apoio e disposição na orientação durante esses anos. Agradeço também à imensa ajuda e amizade da Prof. Dra Clarissa Lin Yasuda e Dra Márcia Morita que não mediram esforços em me auxiliar, tanto no processo acadêmico quanto no pessoal. São pessoas que me inspiram e me apoiam, de diferentes maneiras a cada dia, os esforços valerem a pena.

À minha família, especialmente minha mãe, pelo amor e apoio incondicional que me permitiram escolher meus caminhos com ponderação e determinação, com a certeza de que eu não estava sozinha.

Aos meus amigos que trago desde a infância, que se multiplicaram na faculdade e na residência e que, mesmo à distância, sempre torceram e aplaudiram cada conquista, me apoiaram de perto nos momentos de dúvidas e cansaço. Ao meu namorado, pela atenção e carinho que foram essenciais nessa fase.

Aos amigos e colegas de laboratório que sofreram junto comigo com as citocinas, pelas risadas diárias e pelo apoio neste caminho durante a pós-graduação.

Aos pacientes, tanto pela colaboração quanto pelos ensinamentos com suas histórias e experiências de vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - de março de 2015 a agosto de 2015 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - processo número 2015/17066-0 de setembro de 2015 a novembro de 2018.

EPÍGRAFE

“Somos o resultado de tanta gente, tanta história, tão grandes sonhos que vão passando de pessoa a pessoa, que nunca estaremos só.”

Valter Hugo Mãe em O Filho de Mil Homens

RESUMO

Introdução: A epilepsia atinge 1 a 2 % da população mundial, sendo a epilepsia de lobo temporal associada a esclerose hipocampal (ELT-EH) a forma mais frequente em adultos. Estudos de imagem já determinaram que a ELT-EH apresenta redução volumétrica cerebral difusa, não sendo restrita à região do hipocampo. Há evidências de que a inflamação tem um importante papel na neuroexcitabilidade e que alterações na regulação inflamatória podem gerar degeneração neuronal e induzir crises convulsivas

Objetivos: Definir a associação de marcadores inflamatórios séricos e epilepsias, além de características clínicas, de EEG e padrões de alteração de neuroimagem em pacientes com ELT.

Materias e Métodos: Foram incluídos no estudo 490 pacientes com diagnóstico clínico e eletroencefalográfico de epilepsia e um grupo de 166 controles sem doenças neurológicas. Os pacientes foram divididos entre os com ELT (246) e pacientes com outras epilepsias. Os indivíduos foram submetidos a coleta de sangue para a avaliação dos marcadores inflamatórios e 86 desses realizaram ressonância magnética (RM) de crânio. O volume de estruturas subcorticais e espessura de regiões corticais foram analisadas pelo programa FreeSurfer. Os marcadores inflamatórios (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α e seus receptores sTNFr1 e sTNFr2, BDNF, CTNF, IFN γ , NGF, GDNF) foram analisados de maneira cega aos dados clínicos pelas técnicas Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Cytometric Bead Array (CBA).

Resultados: Os fatores inflamatórios não estão correlacionados com a idade e gênero dos indivíduos e nem com o tempo de doença dos pacientes ($r > 0,3$; $p > 0,05$). Os níveis séricos de BDNF, NGF, sTNFr2 e a NT3 foram elevados enquanto que os níveis de TNF, sTNFr1, IFN γ e das interleucinas foram reduzidos quando avaliamos os pacientes, em geral ou os grupos ELT e outras epilepsias em relação aos controles. Mesmo padrão foi observado quando avaliados apenas os pacientes com malformação do desenvolvimento cortical, exceto o sTNFr1 e IL10 que não foram significativos nessa última análise. O CNTF, NT4/5 e GDNF não foram diferentes entre pacientes e controles. O sTNFr2 se demonstrou um bom marcador para diferenciar pacientes e controles (curva ROC com AUC de 0,858).

Analisando apenas os pacientes com ELT, O GDNF foi maior nos pacientes com pouca atividade epileptiforme ao EEG. O IL2 e o IL4 foram elevados nos pacientes com maior frequência de crises. Em relação à imagem, o TNF α sérico apresentou correlação inversa ao volume do tálamo ipsilateral.

Discussão: Nosso estudo é um dos primeiros a avaliar uma extensa coorte de pacientes e realizar uma avaliação exploratória sobre a relação de marcadores inflamatórios, dados clínicos e de neuroimagem. Os marcadores inflamatórios apresentam diferentes papéis no sistema nervoso central e sua medição sérica nos ajuda a compreender melhor o papel desses nas epilepsias.

Conclusão: Os marcadores inflamatórios estão claramente envolvidos na epilepsia e na perda neuronal, porém são necessários estudos específicos para compreender se estes são epifenômenos ou consequências das crises.

ABSTRACT

Introduction: Epilepsy affects 1% to 2% of the world population and temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis (TLE-HS) is the most common epilepsy in adults. Imaging studies have already demonstrated that TLE patients present diffuse gray and white matter atrophy, not restricted to hippocampal region. Inflammation perform an important role in neuroexcitability. Changes on inflammatory regulation can lead to neuronal degeneration and induce seizures.

Objectives: To define the association of serum inflammatory markers and epilepsies, as well as clinical characteristics, EEG and neuroimaging patterns in patients with TLE.

Subjects and Methods: The study included 490 patients with clinical and electroencephalographic (EEG) diagnosis of epilepsy and a group with 166 controls without neurological diseases. The patients were classified as TLE-HS (246) and other epilepsies. All participants were invited to perform blood sampling (blood serum for inflammatory markers) and 86 performed magnetic resonance imaging (MRI). MRI cortical thickness and subcortical structures were analyzed with FreeSurfer software. The blood serum analysis of IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , sTNFr1, sTNFr2, BDNF, CTNF, IFN γ , NGF, GDNF was performed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Cytometric Bead Array (CBA).

Results: The inflammatory markers did not present correlation with age and gender, or with epilepsy duration. The blood serum levels of BDNF, NGF, sTNFr2 and NT3 were higher while TNF, sTNFr1, IFN γ and interleukines were reduced in patients with epilepsy, TLE-HS and other epilepsies when compared with controls. The same pattern was observed in patients with malformation of cortical development, except for sTNFr1 and IL10. The CTNF, NT4/5 and GDNF were not different between patients and controls in any group. In ROC analysis the sTNFr2 was a good marker to separate patients from controls (AUC =0,858). Considering just patients, the GDNF presented higher serum levels in patients with less interictal epileptiform activity at EEG; and blood serum IL2 and IL4 were higher in patients with more frequent seizures. TNF α presented an inverse correlation with ipsilateral thalamus volume.

Discussion: Our study is one of the first to evaluate an extensive cohort of patients and perform an exploratory assessment on the relationship between inflammatory markers, clinical data and imaging. Inflammatory markers play different roles in central nervous system and their serum measurement helps in better comprehending their relationship with epilepsy.

Conclusion: The inflammatory markers are associated with epilepsy, but more specific studies are necessary to determine if they are epiphenomena or consequence of seizures.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEI: atividade epileptiforme interictal

AH: atrofia hipocampal

BDNF: *brain derived neurotrophic factor* - fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: Barreira hemato-encefálica

CA: corno de Ammon

CBA: *cytometric bead array*

CNTF: *ciliary neurotrophic factor* - Fator Neurotrófico ciliar

DCF: displasia cortical focal

EEG: eletroencefalograma

EH: esclerose hipocampal

ELISA: *enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELT: epilepsia do lobo temporal

ENIGMA: the enhancing neuro imaging genetics through metaanalysis

FAE: fármaco anti-epiléptico

FDR: *false discovery rate*

FLAIR: *fluid attenuated inversion recovery*

GABA: ácido gama-aminobutírico

GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor* - fator neurotrófico derivado da célula da glia

IFN γ : interferon gama

IL: interleucina

LCR: líquido cefalorraquidiano

LTP: long term potentiation

MW: teste de Mann Whithney

NGF: *nerve growth factor* - fator de crescimento do nervo

NT: *neurotrophic factor* - fator neurotrófico

NMDA: N-metil D-aspartato

RM: ressonância magnética

ROC: Receiver Operating Characteristic

SB: substância branca

SC: substância cinzenta

SNC: sistema nervoso central

sTNFr: *soluble tumor necrosis factor receptor* - receptor solúvel do fator de necrose tumoral

TC: tomografia computadorizada

TNF α : *tumor necrosis factor* - fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS	25
4. HIPÓTESES.....	25
5. SUJEITOS E MÉTODOS.....	25
6. RESULTADOS.....	35
7. DISCUSSÃO.....	54
8. LIMITAÇÕES.....	76
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
10. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICES	84
ANEXOS.....	87

1.INTRODUÇÃO:

1.1 Epidemiologia

A epilepsia é uma doença crônica neurológica que atinge 1% da população mundial. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde¹, acredita-se que 50 milhões de pessoas no mundo apresentem tal patologia, sendo que 80% dessas vivem em países de baixa e média renda. Apesar de ser uma doença comum e há muitos anos conhecida, o tratamento medicamentoso vigente controla apenas parte desses pacientes, sendo que 30 % são fármaco-resistentes². Além disso, estima-se que dois terços dos pacientes que vivem em países de baixa e média renda não tenham acesso ao tratamento adequado¹. Uma pesquisa realizada no Brasil, nas cidades de Campinas e São José do Rio Preto e publicada em 2007 encontrou uma prevalência de 9,2/1000 habitantes, com 38% dos pacientes sem tratamento adequado³. Além das crises que comprometem muito a qualidade de vida desses pacientes, estes ainda costumam apresentar diversos problemas psico-sociais e sócio-econômicos devido ao estigma da doença, além da maior prevalência de doenças psiquiátricas nessa população, sendo ainda mais frequentes em pacientes que não apresentam bom controle de crises⁴.

1.2 Definição

Conceitualmente a epilepsia é definida como uma predisposição permanente do cérebro em gerar crises epiléticas⁵. Na prática clínica, o diagnóstico de epilepsia é realizado na ocorrência de duas crises epiléticas não provocadas, ou apenas um evento com probabilidade de recorrência acima de 60% em 10 anos, ou ainda pelo diagnóstico de uma síndrome epilética⁵. Assim, o diagnóstico de epilepsia ainda é clínico, baseado basicamente na história contada por pacientes e familiares. A realização de exames complementares como exames de imagem, ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada (TC), além de eletroencefalograma (EEG), podem auxiliar no diagnóstico sindrômico e na definição etiológica, porém o diagnóstico definitivo de epilepsia ainda é essencialmente clínico.

A epilepsia pode ter diversas etiologias, sendo classificadas como estruturais, genéticas, infecciosas, imunes, metabólicas e desconhecidas⁶. Outra classificação é baseada nos tipos de crises apresentadas pelo paciente. Essas

podem ser focais, generalizadas, além de focais e generalizadas combinadas, ou mesmo serem classificadas como desconhecidas⁶. A epilepsia focal mais comum nos adultos é a epilepsia de lobo temporal (ELT)⁷, que será melhor discutida a seguir.

O tratamento medicamentoso das epilepsias tem ganhado novos agentes nos últimos 25 anos, porém, mesmo com a atuação dos novos fármacos e seus diferentes mecanismos de ação, a porcentagem de pacientes resistentes ao tratamento medicamentoso se mantém estável nos últimos anos, demonstrando que, apesar de mais modernos, com menores interações medicamentosas e efeitos colaterais, a eficácia dos tratamentos atuais é semelhantes aos dos fármacos mais antigos⁸. A epilepsia ainda conta com o tratamento cirúrgico, nos casos de epilepsias focais, principalmente as lesionais, e em pacientes fármaco-resistentes, nos quais se realiza a ressecção de zona epileptogênica com o objetivo de reduzir ou cessar a crises.

Porém, ainda não se sabem as causas de alguns pacientes serem mais refratários que outros ao tratamento com fármacos antiepilépticos (FAE), mesmo quando apresentam a mesma etiologia, como também não se conhece o motivo de alguns pacientes responderem melhor que outros ao tratamento cirúrgico. E para isso o conhecimento da fisiopatologia e da epileptogênese é essencial para a compreensão da doença e de futuros tratamentos.

1.3 Fisiopatologia das crises

Conceitualmente as crises são causadas pela perda do equilíbrio dos mecanismos de excitação e inibição neuronal. Ou seja, em situações normais, existem mecanismos que reduzem as descargas do potencial de ação celular, enquanto outros facilitam os disparos neuronais, reduzindo o limiar para a ocorrência do potencial de ação⁹.

No que se refere às membranas, a manutenção no meio iônico é essencial para o equilíbrio excitatório-inibitório. A diferença de potencial entre o meio interno e externo da célula permite a manutenção do potencial de repouso, potencial capaz de fazer com que os neurônios não apresentem disparos espontâneos, porém ao mesmo tempo mantêm a membrana num potencial mínimo próximo ao

necessário para gerar um novo potencial de ação de maneira rápida. A ação dos canais iônicos é necessária para a manutenção do potencial de repouso.

No entanto, se este equilíbrio é quebrado, ocorre a despolarização da membrana e atividade elétrica anormal acontece de maneira espontânea. A própria crise epiléptica gera alterações nas concentrações iônicas, como o aumento transitório do potássio extracelular, o que predispõe a mais crises. Para controlar essa atividade e reverter esse desbalanço, existem fatores que controlam a homeostase, como a bomba de sódio-potássio e as células da glia. Assim, mutações que geram alterações nos canais iônicos, como os de sódio, podem gerar epilepsia⁹. Alterações que influenciem no funcionamento das células da glia, como uma inflamação, também podem predispor a crises repetidas.

Outros fatores que colaboram com o equilíbrio excitatório-inibitório são os neurotransmissores. O ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor com papel inibitório, age hiperpolarizando a membrana, e assim inibindo a atividade neuronal através do controle de fluxo de cloreto ou de potássio (dependendo do receptor) pela membrana celular. O bloqueio da ação dos receptores GABA é capaz de gerar crises espontâneas em modelos animais. Grande parte dos neurônios gabaérgicos são interneurônios com importante papel no controle das crises. Já o glutamato é um neurotransmissor excitatório. Os receptores AMPA de glutamato agem controlando o influxo de sódio e os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) o influxo de cálcio. As células da glia agem facilitando a propagação da atividade e controlam a concentração extracelular de alguns íons, como o potássio¹⁰.

Alterações estruturais e funcionais das redes neuronais também contribuem para uma alteração permanente desse desequilíbrio excitatório-inibitório. Além disso, as próprias crises recorrentes parecem ser responsáveis por alterações na expressão genética, estruturais e funcionais, perpetuando esse processo⁹. Dessa maneira para compreender a epilepsia e considerar novas opções de tratamento precisamos considerar as alterações em canais iônicos, membranas celulares, circuitos neuronais, alterações estruturais e genéticas.

1.4 Epilepsia de Lobo Temporal

A ELT é a epilepsia focal mais frequente em adultos de centros terciários^{7;11}. A esclerose hipocampal (EH), que consiste em gliose, perda neuronal

e dispersão celular no hipocampo¹², é a lesão mais comum em pacientes com ELT resistentes ao tratamento medicamentoso^{13; 14}. Assim como as demais epilepsias, o diagnóstico inicial é clínico. Semiologicamente, as crises que se iniciam no lobo temporal, caracteristicamente se apresentam inicialmente com sintomas autonômicos ou psíquicos (pacientes costumam descrever sensação de medo, angústia, mal-estar epigástrico – até 70% dos pacientes com EH - entre outros) seguidas de perda da percepção com sintomas motores como automatismos oromastigatórios e/ ou manuais, com possível evolução para crises tônico-clônicas bilaterais¹⁵.

As crises costumam ter início na infância ou adolescência, tendo um período latente, com bom controle de crises, até se tornar refratária ao tratamento com FAEs. É comum esses pacientes apresentarem história de incidentes precipitantes antes dos 5 anos, como crises febris, traumas ou infecções do sistema nervoso central (SNC). Com o tratamento, as crises tônico-clônicas bilaterais se tornam raras¹⁵.

A ELT-EH é o tipo de epilepsia com maior indicação de procedimento cirúrgico¹⁶. Entre pacientes com epilepsias focais submetidos à cirurgia, 33,6% apresentam EH, além de 5,1% com EH e outra patologia associada¹⁷. Um estudo em nosso serviço, que discute a investigação pré-operatória, incluiu 166 pacientes com ELT-EH unilateral submetidos a cirurgia de epilepsia, sendo que 81,92% desses, numa mediana de acompanhamento de 6 anos, ficaram totalmente livres de crises¹⁸.

Em imagens de RM, a EH pode ser suspeitada pela atrofia do hipocampo (AH), ou seja, pela perda do volume, e pelo aumento da intensidade do sinal em imagens T2/fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) do hipocampo afetado¹⁴. Existem quatro tipos de EH, de acordo com as regiões do hipocampo que apresentam maior perda neuronal e gliose¹³. Na prática clínica, a grande maioria dos hipocampos ressecados apresentam EH do tipo 1, em que a maior perda neuronal ocorre em regiões do corno de amon (CA) CA1 e CA4. Além da perda neuronal na região do hilo do hipocampo, ocorre também o brotamento de fibras musgosas (*mossy fiber sprouting*), que é uma reorganização sináptica decorrente do brotamento axonal permitindo novos contatos entre as fibras musgosas e as células granulares do giro denteado do hipocampo¹⁹. Essas alterações parecem ser a causa e consequência de crises recorrentes nos pacientes com ELT-EH. O grau de comprometimento parece ser influenciado pela duração e idade de início da

epilepsia, frequência e gravidade das crises, além de fatores genéticos e eventos precedentes, como crises febris, que podem afetar o desenvolvimento hipocampal¹³. Além dessas alterações estruturais, sabe-se que no hipocampo ocorrem alterações funcionais também relacionadas com a fisiopatologia da ELT, que é a potenciação das sinapses excitatórias, diretamente relacionada com a geração de crises²⁰.

Porém, sabe-se que a epilepsia é uma doença de redes neuronais, que assim afeta o cérebro de uma maneira mais difusa do que apenas a zona epileptogênica²¹. Estudos com imagens já demonstraram que pacientes com ELT apresentam redução de volume tanto de substância branca (SB) quanto cinzenta (SC) de maneira difusa^{22; 23}. Sugere-se que as crises recorrentes e a duração da epilepsia são prováveis mecanismos de dessa atrofia extra-hipocampal^{24; 25}, uma vez que a atrofia é mais evidente em pacientes resistentes ao tratamento medicamentoso²². Além disso, observou-se que as crises refratárias estão relacionadas com a progressão da atrofia, assim como o tempo de epilepsia, de maneira independente, o que leva a discussão se a progressão da atrofia é apenas consequência de crises²⁴.

Para avaliar de maneira mais ampla essa questão do padrão de perda neuronal nos pacientes com diferentes tipos de epilepsia, nosso grupo participou de um consórcio - The Enhancing Neuro Imaging Genetics through MetaAnalysis (ENIGMA) – em que foram avaliadas 16 regiões subcorticais e 68 regiões corticais, com o *software* FreeSurfer, de 2149 pacientes com epilepsia e 1727 controles, de 24 centros. Dentre esses pacientes 415 foram classificados como ELT-EH a esquerda, 339 ELT-EH a direita, 367 com epilepsias generalizadas idiopáticas e 1026 com outras epilepsias²¹. Quando avaliadas todas as epilepsias juntas em comparação aos controles, foi observada a redução de volume talâmico a direita e redução do volume cortical do giro pré-central bilateralmente, além de diversas outras regiões conforme as figuras 1 e 2. Para mais detalhes sobre esse trabalho, vide o Anexo 2.

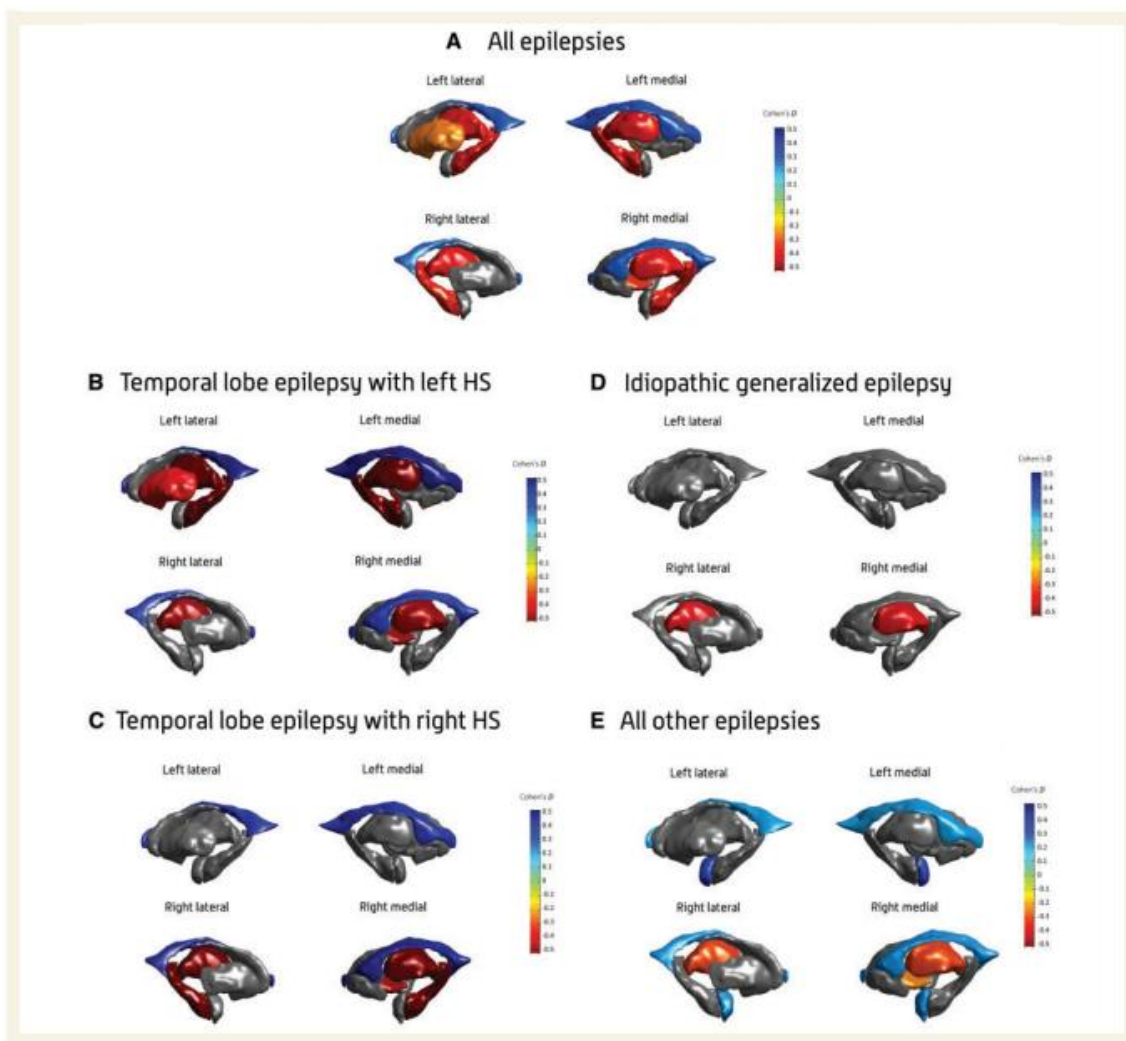


Figura 1: Comparação do volume subcortical entre pacientes e controles, demonstrado em mapa de cores nos grupos: A. Todas as epilepsias, B. ELT-AH esquerda, C. ELT-AH direita, D. Epilpesias generalizadas idiopáticas, E. Outras epilepsias. Adaptado de Whelan et al., 2018²¹

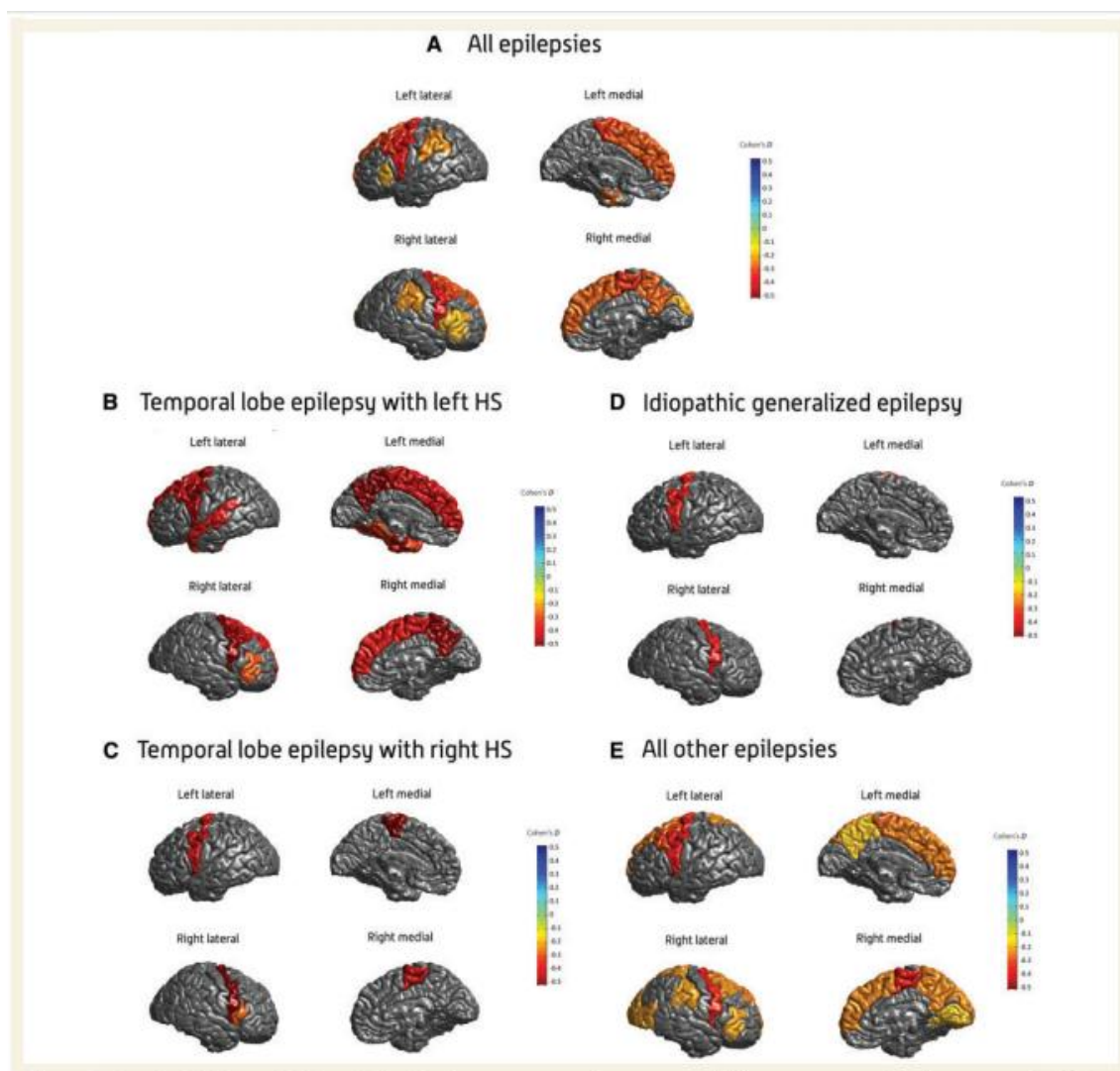


Figura 2: Comparação da espessura cortical entre pacientes e controles, demonstrando em mapa de cores nos grupos: A. Todas as epilepsias, B. ELT-AH esquerda, C. ELT-AH direita, D. Epilepsias generalizadas idiopáticas, E. Outras epilepsias. Adaptado de Whelan et al, 2018²¹.

Com o objetivo de avaliar a influência da frequência de crises na atrofia de SB e SC, um outro estudo do nosso grupo, avaliou 39 pacientes com ELT há pelo menos dois anos sem qualquer tipo de crise, e o comparou com 74 indivíduos controles, demonstrando que mesmo os pacientes com bom controle de crises apresentam atrofia de SB e SC. Além disso, foi realizada uma avaliação longitudinal com 21 desses pacientes e 11 controles, com um intervalo mínimo de 18 meses entre as imagens, e os pacientes há pelo menos dois anos sem crises da primeira imagem e sem crises no intervalo entre essas. Apesar do pouco tempo de intervalo observou-se progressão da atrofia extra-hipocampal desses pacientes²⁶. Para saber mais detalhes desse trabalho, e discussão sobre o assunto, vide o anexo 3. Desta

maneira demonstramos que a progressão da atrofia de SB e SC não depende apenas da presença de crises, mas sim que a epilepsia parece ser uma doença progressiva. Todos os pacientes do estudo estavam em uso de FAE, o que pode ser uma das causas dessa possível lesão neuronal, porém acreditamos que a presença de outros fatores, como a inflamação crônica que ocorre no cérebro desses pacientes, pode ser um dos mecanismos de uma progressiva perda neuronal, e por isso o tempo de doença, além da presença de crises, possa ser um dos fatores de alterações estruturais do cérebro desses pacientes.

1.5 Epilepsia e Inflamação

Apesar da epilepsia não ser uma doença essencialmente inflamatória, sabemos que a inflamação tem clara atuação nesta patologia. O uso de corticoesteróides para controle de crises em síndromes epiléticas como a Síndrome de West²⁷ e para o controle de *status epilepticus*²⁸ demonstra a atuação da inflamação da recorrência de crises. Atualmente sabe-se que complexas interações entre fatores genéticos e ambientais são alguns dos determinantes da epileptogênese. No entanto, evidências de um processo inflamatório contínuo têm ganhado atenção em doenças neurológicas^{2; 12; 29}. Estudos com os pacientes com epilepsias resistentes ao tratamento medicamentoso demonstram a existência de áreas de gliose no tecido epileptogênico, e que as células da glia teriam um importante papel na modulação da transmissão sináptica e no fenômeno de hiperexcitabilidade envolvido na patogênese das crises epiléticas². Diversos mediadores inflamatórios são expressos em células gliais ativadas e a função destes e sua exata ação na fisiopatologia da epilepsia vêm sendo tema de diversos estudos. Ainda se questiona se estes são epifenômenos das crises, ou se estando envolvidos na lesão neuronal². Sabe-se que a inflamação tem atuação nas diversas fases do processo epileptogênico - epileptogênese, epilepsia e danos neuronal,

como demonstrado na figura 3.

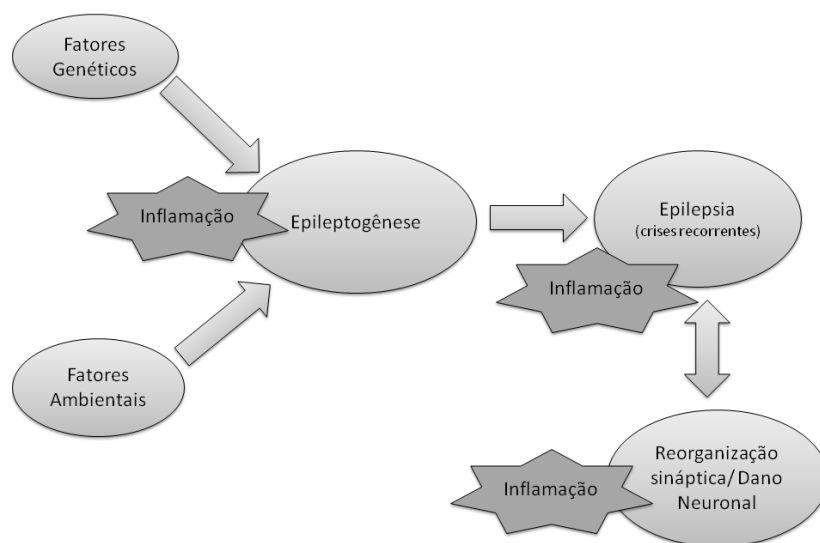


Figura 3: Esquema exemplificando a ação da inflamação nas diversas fases do processo epileptogênico.

Citocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos secretadas pelas células da imunidade inata a adaptativa, e estão associadas com a ativação e desenvolvimento do sistema imune e de sua resposta inflamatória³⁰, com diversas outras ações no sistema nervoso central e periférico^{31; 32}. As citocinas são frequentemente pleiotrópicas, ou seja, são capazes de agir em diferentes tipos celulares, e por vezes redundantes, ou seja, mais de uma citocina pode ter papel muito semelhante em algumas situações^{30; 33}. A ação dessas depende da presença de receptores específicos nas membranas das células e pequenas quantidades já são suficientes para ativá-los. A concentração e distribuição desses receptores muitas vezes é determinada pela ação da própria citocina, determinando um *feedback* positivo ou negativo³⁰. O grupo das citocinas inclui as interleucinas (IL), os interferons (IFN), o fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor* -neurotrophic TNF) e as quimiocinas^{30; 33}.

No SNC os receptores das citocinas tem preferências por algumas regiões como núcleo accumbens, hipocampo, tálamo, córtex e cerebelo, e nessas regiões, por alguns grupos celulares³³. Além de atuarem em resposta a insultos, as citocinas também atuam no desenvolvimento do SNC sendo secretadas, inclusive, no período fetal³³.

Os fatores neurotróficos são proteínas que modulam o crescimento, diferenciação, reparo e sobrevivência dos neurônios, podendo ter papel na transmissão e reorganização sináptica. Entre eles estão o Ciliary neurotrophic factor (CNTF) e a interleucina 6 (IL6), na família das citocinas; o *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), na família dos fatores de crescimento derivados da glia; além da família das neurotrofinas, composta pelo *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *neurotrophic factor 3* (NT3), *neurotrophic factor 4* (NT4/5) e *nerve growth factor* (NGF), entre outros³⁴.

As neurotrofinas atuam de diversas maneiras no SNC, podendo promover a sobrevivência ou morte celular, dependendo do receptor, da forma da neurotrofina (molécula madura ou pró-neurotrofina) e do momento do ambiente celular³⁵.

Por muito tempo estudos clínicos e pré-clínicos tiveram como foco principal as alterações neuronais estruturais para tentar justificar a patogênese da epilepsia, porém estudos mais recentes já demonstraram de maneira consistente que fatores inflamatórios também integram esse quadro, como células da glia, fatores vasculares e imunes, que têm papel tanto na epileptogênese quanto na manutenção de crises³⁶. Tanto a produção excessiva de citocinas pelas células da glia, como o aumento da expressão de neurotrofina após algum insulto, parecem gerar alterações estruturais e funcionais, induzindo crises convulsivas³⁷.

Um outro estudo do consórcio ENIGMA, também com participação do nosso grupo, sugere que a ativação da micróglia é associada com algumas alterações estruturais cerebrais envolvidas com as crises. Nesse estudo observou-se que a expressão de genes em monócitos e micróglia estava altamente relacionada com a gravidade da epilepsia. Além disso, esse mesmo estudo realizou testes em modelos animais com depleção de micróglia, e nesses modelos não houve redução da espessura cortical, apesar de não ter prevenido o desenvolvimento de crises nesses animais. Assim, esse trabalho sugere que a micróglia está envolvida na redução da espessura cortical e na frequência de crises desses pacientes, e ainda sugere que a inflamação exerce um importante papel na modulação da epilepsia, apesar de não ser a causa primária desta, exceto em alguns raros casos (como na Encefalite de Rasmussen, por exemplo)³⁸.

Corroborando com essa teoria, sabe-se que após uma crise a inflamação que ocorre no SNC promove morte neuronal em áreas corticais e subcorticais,

acarretando assim reorganização sináptica e remodelamento do circuito neuronal³⁶. Além disso, a inflamação também tem papel na epileptogênese, uma vez que já foi evidenciada a maior expressão de algumas citocinas (IL1 β , IL6 e TNF), consideradas pró-inflamatórias (em algumas situações) em tecidos com malformações do desenvolvimento cortical, lesões frequentes em pacientes com epilepsia³⁹. A neuroinflamação afeta diretamente o sistema neurovascular e a função da glia. A inflamação sistêmica também pode afetar o funcionamento do SNC, contribuindo para a neuroinflamação, pela quebra da barreira hematoencefálica (BHE)A quebra da BHE pode ser desencadeada por um insulto ao endotélio ou por fatores sistêmicos como a ativação de leucócitos circulantes ou liberação de mediadores moleculares que aumentam a permeabilidade celular³⁶. . Alguns estudos sugerem que crises isoladas podem quebrar, focalmente, a integridade da BHE e contribuir para a cronicidade da epilepsia⁴⁰.

Acredita-se que o glutamato liberado pelos neurônios durante as crises seja um dos ativadores da transcrição de citocinas pelas células da glia^{31; 41}. Considerando a ELT, a maior expressão de IL1 β , IL6 e TNF α pelos astrócitos parece estar diretamente envolvida com a gênese da ELT mesial³⁶. Sabe-se que a inflamação crônica parece induzir diversas alterações estruturais, como o brotamento de fibras musgosas do hipocampo, além da perda neuronal que ocorre na região do hilo hipocampal¹⁹.

A atividade inflamatória e a lesão hipocampal de pacientes com ELT parece estar bem estabelecida^{2; 42}, porém a correlação entre os marcadores inflamatórios com a provável perda neuronal mais difusa no cérebro desses pacientes e o padrão de resposta a medicações e outras características clínicas ainda não foi definido, o que pode ser um importante fator prognóstico e de decisão de tratamento para os pacientes com ELT.

A inflamação também parece ser responsável pelas crises recorrentes. De uma maneira mais aguda acredita-se que as crises aumentem a inflamação local, levando a lesão neuronal, o que conseqüentemente aumentaria ainda mais a inflamação e as crises, e dessa maneira ocorreria uma perda do controle inflamatório, com perda da inibição, e culminaria em crises recorrentes, como esquematizado na figura 4^{43; 44}.

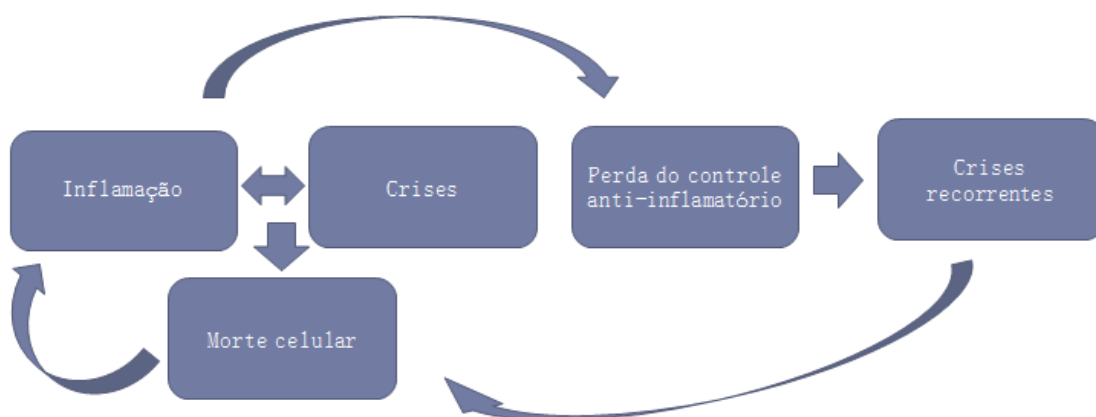


Figura 4: Esquema exemplificando associação entre inflamação, perda neuronal e crises recorrentes.

Na epilepsia, as principais evidências do papel da inflamação ainda são provenientes de estudos com modelos animais⁷, tanto a avaliação imunohistoquímica do tecido cerebral quanto níveis séricos, nos mais diferentes modelos de crises. Em humanos, há diversos estudos com tecidos de pacientes que realizaram cirurgias de epilepsia, como a avaliação dos hipocampus de pacientes com ELT nos pós-operatório quanto estudos de nível sérico, plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR). A grande maioria dos estudos demonstram clara relação das citocinas e dos fatores neurotróficos com a epilepsia, sendo com a epileptogênese ou com a manutenção de crises ou ainda como consequência dessas, porém os resultados costumam ser bastante conflitantes, principalmente nos estudos com humanos. Possivelmente os resultados encontrados são devido à quantidade pequena de pacientes incluídos nos estudos e talvez pelo fato de vários estudos incluírem pacientes com epilepsias de diversas etiologias. Dessa maneira o papel da maioria dos marcadores inflamatórios na epilepsia não é tão bem estabelecido. As evidências já existentes, tanto em ratos quanto em humanos, da ação de cada fator inflamatório na epilepsia serão revisadas na parte da *Discussão*.

A inflamação provavelmente atua de maneira diferente nas diferentes etapas da epilepsia. Os estudos experimentais normalmente avaliam a fase da epileptogênese, ao induzirem crises em animais. Quando pensamos em ELT, podemos considerar que provavelmente existe uma fase intermediária, que seria clinicamente o período latente, em que o paciente não apresenta crises, porém tem a patologia, e provavelmente a inflamação tem uma atuação diferente nesse ínterim.

Além disso, existe a fase crônica ativa, em que o paciente apresenta crises recorrentes, quando é necessário o tratamento medicamentoso. As crises desencadeiam a quebra da barreira hemato-encefálica, permitindo a interação entre a inflamação sistêmica e a neuroinflamação, que é o período que estudaremos nesse trabalho.

Sabe-se que as citocinas e neurotrofina são produzidas em pequenas concentrações e tem ação mais local, porém em situações patológicas já foi demonstrado que a produção aumenta bastante, o que inclusive contribui para a propagação das crises⁴⁵ e por isso elas são detectadas na circulação periférica. Estudos já demonstraram uma possível correlação entre a concentração cerebral e a sérica de alguns fatores inflamatórios⁴⁶. Sabemos que diversas outras patologias e condições clínicas como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e renais podem alterar a concentração dessas, porém os pacientes com epilepsia comumente apresentam comorbidades, principalmente psiquiátricas, como transtornos depressivos e de ansiedade que fazem parte da constelação de sintomas dos pacientes com ELT e epilepsias generalizadas. Apesar disso, ainda se procuram marcadores periféricos, que sejam de fácil acesso, que possam nos auxiliar a definir os pacientes com epilepsias refratárias ou responsivas, a guiar alvos terapêuticos ou até mesmo em alguns casos, colaborar no próprio diagnóstico de epilepsia.

2. JUSTIFICATIVA

Assim optamos por realizar um estudo exploratório, com um grande grupo de pacientes, tanto com ELT, quanto com epilepsia de outras etiologias e também com um grupo controle para avaliar o comportamento dos marcadores inflamatórios periférico nos diferentes tipos de epilepsias com o objetivo de aumentar a compreensão do papel da inflamação na epilepsia e na perda neuronal e, ainda, indiretamente, guiar futuras pesquisas mais específicas sobre o assunto que possam visar futuros tratamentos. Além disso, a melhor compreensão dos mecanismos da doença auxilia na tomada de melhores decisões na prática clínica, principalmente nas decisões caso a caso.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Definir a associação de marcadores inflamatórios e características clínicas, de EEG e padrões de alteração de neuroimagem em pacientes com epilepsia de lobo temporal.

Objetivos específicos:

- 1- Definir a associação entre marcadores inflamatórios e epilepsia.
- 2- Definir a associação entre marcadores inflamatórios e ELT.
- 3- Definir a associação entre marcadores inflamatórios e características clínicas e eletroencefalográficas de pacientes com ELT
 - a. Definir a associação entre marcadores inflamatórios e resposta medicamentosa dos pacientes com ELT.
- 4- Definir a associação entre marcadores inflamatórios e o padrão de dano de substância cinzenta em pacientes com ELT.

4. HIPÓTESES

1. Os marcadores inflamatórios têm concentrações séricas diferentes entre indivíduos com e sem epilepsia
2. Pacientes com EH apresentam diferentes padrões de atrofia extra-temporal, e devem apresentar diferentes características inflamatórias
3. As concentrações séricas das citocinas e neurotrofinas estão relacionada às diferentes respostas ao tratamento medicamentoso.
4. Pacientes com ELT e diferentes padrões de EEG apresentam diferentes concentrações séricas de fatores inflamatórios

Os marcadores inflamatórios podem ser marcadores que auxiliem na diferenciação de pacientes com e sem epilepsia

5. SUJEITOS E MÉTODOS

Este foi o projeto colaborativo entre a Universidade estadual de Campinas (UNICAMP) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.1 Aspectos éticos:

Todos os pacientes convidados a participar foram devidamente instruídos sobre o estudo e seus riscos. Termo de consentimento informado, aprovado pelo Comitê de Ética da UNICAMP foi assinado por todos os pacientes ou seus responsáveis antes da realização das imagens de RM e coleta de sangue. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE: 69153817.1.0000.5404; número do Parecer: 2.224.333) – vide anexo 1.

5.2 Identificação e seleção dos pacientes:

Os pacientes e controles foram recrutados a participar do estudo entre o período de janeiro de 2009 a agosto de 2013. Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Epilepsia do serviço de neurologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foram selecionados indivíduos para a formação de 3 grupos:

Grupo ELT: Paciente com diagnóstico clínico de ELT, de acordo com os critérios clínicos da *International League Against Epilepsy* (ILAE)¹⁵. Os pacientes desse grupo apresentavam semiologia de crises consistentes com início temporal, evidência de AH pela análise visual da RM, avaliada por dois neurologistas levando-se em conta a presença de redução volumétrica em sequências T1 e/ou evidente hipersinal nas sequências T2/FLAIR e EEG com atividade compatível.

Foram excluídos desse grupo pacientes com semiologia que sugerisse início de crises em outra região cerebral (aura visual, por exemplo), pacientes com outras lesões à RM além da AH, pacientes com EEG com atividade epileptiforme independente em outra região cerebral que não o lobo temporal.

Grupo outras epilepsias: Foram selecionados pacientes consecutivos do ambulatório de epilepsia, com diagnóstico clínico de epilepsia de acordo com a ILAE (mais de duas crises sem outros fatores desencadeantes com intervalo maior que 24 horas)⁴⁴.

Foram excluídos os pacientes com diagnóstico duvidoso de epilepsia, como suspeita de apresentarem apenas eventos de origem não epiléptica.

Grupo Controle: Foram recrutados indivíduos sem doenças neurológicas conhecidas, composto majoritariamente por alunos e funcionários do HC da UNICAMP além de 62 indivíduos controles do Hospital da UFMG para a avaliação do BDNF (esses não realizaram imagem de RM).

Devido ao longo período de recrutamento e grande quantidade de indivíduos, é importante ressaltar que nem todos os indivíduos convidados à coleta de sangue quiseram realizar a RM e houve variabilidade da análise dos fatores inflamatórios séricos. Assim nem todos indivíduos foram testados para todos os marcadores. Porém, como se trata de um estudo exploratório optamos por realizar as análises em conjunto e, por isso, os grupos das diversas análises realizadas ao longo do projeto, apresentarão amostras de diferentes tamanhos.

Definição etiológica:

Dentro do grupo “outras epilepsias”, a etiologia da epilepsia foi definida de acordo com o quadro clínico que foi detalhadamente adquirido em prontuário médico além dos dados de EEG e revisão da imagem de RM. Assim classificamos os pacientes nos seguintes grupos:

- Epilepsia indeterminada: todos aqueles pacientes que não apresentavam qualquer alteração visível em RM de crânio ou aqueles que apresentavam múltiplas alterações na imagem e não era possível definir qual alteração era realmente responsável pelas crises. Dezoito destes pacientes apresentavam critérios clínicos para o diagnóstico de ELT porém eram não lesionas à RM.

- Patologia dupla: foi definida como AH associada a outra lesão que poderia ser responsável por crises, independentemente da sua localização.

- AH + patologia associada: os pacientes que apresentaram AH e outra lesão que não deve ser responsável pela epilepsia, mas poderia alterar o nível sérico das citocinas (como por exemplo um meningioma de foice).

- Malformação do desenvolvimento cortical: Pacientes com displasia cortical focal (DCF), duplo córtex e outras malformações corticais diagnosticadas pelas imagens de RM.

- Tumores: todos pacientes com evidência de tumor em SNC, mesmo que associado a outras lesões.

- Cicatriciais: Pacientes com crises secundárias a gliose, seja por traumas, acidentes vasculares ou outros insultos.

- Epilepsias genéticas generalizadas: Pacientes com síndromes genéticas generalizadas bem definidas de acordo com critérios da ILAE⁵.

- Outros: outras etiologias pouco frequentes. Incluíram esse grupo um paciente com epilepsia pós quadro de encefalite de Hashimoto, dois com malformação vascular e três com epilepsia pós meningite.

Pacientes com presença de calcificação em TC de crânio não foram reclassificados sendo a calcificação considerada apenas uma patologia coexistente uma vez que, a nossa região (Estado de São Paulo e Minas Gerais, principais locais de onde nossos pacientes são provenientes), é considerada uma área endêmica⁴⁷ de neurocisticercose. Sabe-se que nessas regiões a prevalência é de 10-20% da população geral⁴⁸, apesar de ser mais comum em pacientes com ELT mesial⁴⁹. Dessa maneira, analisamos os pacientes com e sem calcificações, porém isso não alterou a classificação da etiologia da epilepsia nesse primeiro momento.

Dados clínicos:

Dados clínicos destes pacientes foram adquiridos através de minuciosa análise do prontuário médico com um questionário estruturado, determinado-se o início da doença, a frequência de crises, medicações antiepilépticas em uso, efeitos colaterais, antecedentes pessoais e familiares, além da investigação com exames complementares realizados. Os dados dos pacientes foram utilizados de forma anônima.

Os dados que não eram confiáveis ou claramente explicitados nos prontuários foram considerados como “indeterminados” e não entraram nas análises.

Idade de início de crises: Idade que o paciente iniciou crises recorrentes (exemplo: se o paciente teve uma crise febril aos dois anos, isolada, e aos 9 anos

iniciou crises espontâneas recorrentes, a idade de início de crises considerada foi 9 anos)

Tempo de epilepsia: quantidade de anos entre a idade de início de crises e a idade na coleta de sangue.

Antecedentes familiares: foram considerados apenas antecedentes de até segundo grau com epilepsia (familiares com crises secundárias a alcoolismo, insultos vasculares ou outras causas claramente adquiridas, não foram considerados). Os pacientes em que o prontuário não descrevia qualquer antecedente foram classificados como “indeterminados”.

Crise febril: História clara de crises desencadeadas por febre na infância. Se não estivessem claramente negadas ou descritas em prontuários, classificou-se como “indeterminado”.

EEG: os dados de EEG foram obtidos de acordo com os laudos dos exames realizados em nosso serviço ao longo do acompanhamento – muitos pacientes fizeram múltiplos EEGs devido a investigação cirúrgica. Foram considerados apenas os EEGs pré-operatórios. Incluímos na análise apenas os pacientes que foram submetidos a mais de cinco exames de EEGs e os separamos em dois grupos:

- Pacientes com menos de 20% dos exames com atividade epileptiforme interictal (AEI)

- Pacientes com mais de 80% dos EEGs com AEI

Dados de vídeo-EEG foram avaliados para a definição etiológica da epilepsia, foram considerados nessa análise.

Calcificação: Avaliamos os exames de todos os pacientes que realizaram TC de crânio durante o acompanhamento no serviço, independentemente da indicação clínica, e observamos a presença de calcificações sugestivas de neurocisticercose. As TC não foram realizadas no momento da coleta de sangue, apenas avaliamos se os pacientes apresentavam lesões residuais. Nenhum paciente tinha neurocisticercose ativa na mesma época da coleta de sangue. Os que não tinham imagem de TC foram classificados como indeterminados.

Frequência de crises: Consideramos a frequência de crises ao longo do acompanhamento clínico com registro de dois momentos: i) a última revisão de prontuário médico (entre os anos de 2015 e 2016), ii) no momento da coleta de sangue. Avaliamos nesses dois momentos diferentes pois diversos pacientes

realizaram a coleta logo nas primeiras consultas no nosso ambulatório, quando muitas vezes tinham crises refratárias e após ajuste medicamentoso, ocorreu controle delas; e também temos a situação oposta, aqueles pacientes que chegaram ao serviço logo nos primeiros episódios, e depois evoluíram para epilepsia de difícil controle. Assim utilizamos a seguinte classificação:

-Crises infrequentes: menos de seis (até cinco) crises disceptivas e menos de duas crises tônico-clônicas bilateral ao ano

-Crises frequentes: pelo menos seis crises disceptivas e duas ou mais crises tônico-clônica bilateral ao ano

Os pacientes que sabidamente apresentam crises de origem não epilética ou que as informações eram pouco confiáveis, foram considerados indeterminados.

Crises na coleta:

Em relação a apresentação de crises, também questionamos os pacientes, no dia da coleta, sobre a data da última crise. Como é sabido que o nível sérico dos fatores inflamatórios pode alterar logo após a crise e que ocorre grande variação de tempo em que estes se mantêm alterados, dividimos os pacientes em dois grupos:

- Pacientes que referiram crises no dia ou no dia anterior à coleta
- Paciente há mais de 5 dias sem crises

5.3 Aquisição das imagens de RM:

Para a avaliação das imagens, incluímos apenas os pacientes com ELT-AH não submetidos a cirurgia.

As imagens de RM foram realizadas em aparelho de 3 Tesla (Phillips), com aquisições nos planos coronal, sagital e axial, com cortes coronais obtidos em plano perpendicular ao longo eixo da formação hipocampal, definido nas imagens sagitais, para melhor estudo desta estrutura.

Protocolo de aquisição de RM:

- o (1) *Imagens de difusão axial com 32 direções*: 2 mm espessura; tempo de repetição, 8500; tempo de eco, 60; fator-b, 1000; matriz, 116X115; e “field of view” (FOV), 232X232;

- (2) *imagens coronais*, perpendicular ao eixo longo do hipocampo, definido a partir da imagem sagital: (a) imagem ponderada em T_2 multiecho 3mm de espessura; TR, 3300; TE, 30/60/90/120/150; matrix, 200X176; FOV, 180X180; (b) Imagem do tipo “inversionrecovery” ponderadas em T_1 : 3mm de espessura; TR 3550; TE, 15; tempo de inversão, 400; fator TSE, 7; matriz, 240X229; e FOV 180X180;
- (3) *imagens axiais* paralelas ao eixo longo do hipocampo: FLAIR (fluidattenuationinversionrecovery) com supressão de gordura; 4 mm de espessura; TR, 12000; TE, 140; matriz, 224x160; e FOV, 220X186;
- (4) *Imagem volumétrica ponderadas em T_1* : imagem ponderada em T_1 e gradiente eco com voxels isotrópicos de 1mm, adquiridos no plano sagital (1mm de espessura; flipangle, 8°; TR, 7.1; TE, 3,2; matriz, 240x240; e FOV, 240x240;
- (4) *Imagem volumétrica ponderadas em T_2* : imagem ponderada em T_2 com voxels isotrópicos de 1,5mm, adquiridos no plano sagital (TR, 1800; TE, 342; matriz, 140X139; e FOV, 210x210;

As imagens foram analisadas pelo programa FreeSurfer (versão 5.1 - <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) no qual a volumetria e a espessura cortical de diferentes estruturas cerebrais são segmentadas de maneira automática, sem influência de áreas de interesse. As imagens para a análise são obtidas em T_1 , e em seguida são normalizadas e as intensidades de cor da imagem são homogeneizadas. Após esse processo a imagem passa por outro chamado *skull stripping* em que é realizada a remoção dos *voxels* que estão fora do parênquima cerebral. Então faz-se uma marcação volumétrica, baseada na forma geométrica gerada pelas SB e SC e tesselação triangular, ou seja, a superfície bidimensional é recoberta por uma unidade básica, no caso, triângulos, e a imagem é colocada em um atlas, identificando-se cada região do córtex e da SB, para então ser feita a comparação de todas as imagens de todos os pacientes e controles de uma maneira uniforme.

Alguns pacientes não realizaram a RM no mesmo dia da coleta de sangue, então essa imagem não foi considerada. Além disso, imagens que não estavam com qualidade adequada ou de pacientes que já haviam sido operados, também foram excluídas. Alguns pacientes participaram do estudo 2 vezes, nesse caso, apenas uma amostra e uma imagem foram consideradas (sendo a segunda excluída de maneira aleatória).

Para a avaliação do volume, as imagens foram normatizadas com base nas imagens dos controles.

A análise da volumetria foi realizada em 12 regiões: amígdala, caudado, hipocampo, globo pálido, putâmen e tálamo, ipsi e contralaterais à AH.

Em relação a espessura cortical, dividimos a análise em regiões neuroanatômicas sugeridas por *Desikan et al.*⁵⁰, exemplificadas na figura 5 .

Lobo temporal mesial: córtex entorrinal, fusiforme, parahipocampal e polo temporal;

Lobo temporal lateral: temporal inferior, temporal médio, temporal superior, transverso temporal e margem do sulco temporal superior;

Lobo frontal: frontal superior, frontal médio, frontal inferior, orbitofrontal, paracentral, pré-central e polo frontal;

Lobo parietal: parietal inferior, parietal superior, pré-cúneo, pós-central e supramarginal;

Lobo occipital: cúneo, lingual, occipital lateral e pericalcarino

Córtex cíngulado: cíngulo anterior caudal, cíngulo anterior rostral, cíngulo posterior e istmo do cíngulo.

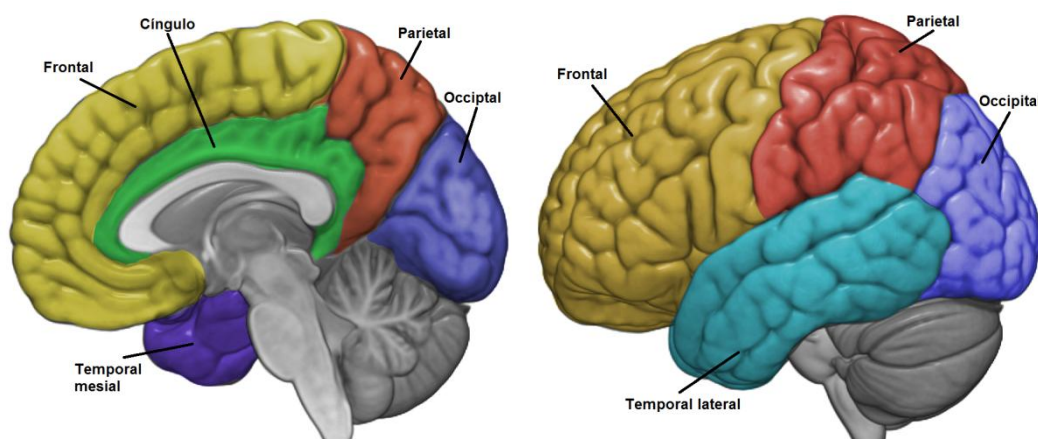


Figura 5: Esquema das divisões propostas por Desikan et al. para avaliação da espessura cortical.

5.4 Marcadores inflamatórios:

Todas as amostras foram coletadas no período da manhã, para evitar vieses do ritmo circadiano da liberação dos marcadores inflamatórios. Não foram coletadas amostras de indivíduos que estivessem com sintomas ou em tratamento de infecções no dia da coleta.

Os marcadores inflamatórios estudados foram IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, TNF α e seus receptores solúveis, *soluble tumor necrosis factor receptor 1* (sTNFr1) e *soluble tumor necrosis factor receptor 2* (sTNFr2), BDNF, CTNF, IFN γ , NGF, GDNF. Todos foram analisados na UFMG de maneira cega, sem qualquer informação se pertenciam a pacientes, controles ou dados clínicos destes. As interleucinas, o IFN γ e o TNF α foram analisados de maneira cega pelas técnicas Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA - Alta Quantitativa ELISA, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA.) O menor limite de detecção para foi de 0,125 pg/ml. Nesse teste a amostra é colocada em placas com poços e a ela são adicionados anticorpos marcados que reconhecem e fixam antígenos específicos. Os que não são fixados, são lavados e observa-se a coloração do substrato cromogênico adicionado a placa de teste.

Os demais fatores neurotróficos, incluindo o TNF α novamente, foram dosados pelo Cytometric Bead Array (CBA - FACSCANTOII, Becton&Dickinson), com limite de detecção de 0,274 pg/mL.

Nessa técnica, a suspensão de células é colocada em um separador de células ativado por fluorescência, ou seja, este identifica a intensidade de fluorescência de cada célula e essas são divididas em grupos de acordo com as intensidades. Assim cada célula é analisada de acordo com seu fenótipo e função, uma vez que isola diferentes populações de acordo com os seus antígenos de superfície corados, que alteram a fluorescência. Para uma melhor análise, a suspensão de células é imersa em um líquido que se move em velocidade superior a suspensão, criando assim uma pressão positiva que leva as células a se moverem em fila, permitindo que elas sejam avaliadas uma a uma pelo feixe de luz a uma velocidade de 100 a 1000 partículas por segundo.

As amostras de sangue foram coletadas pelo nosso grupo por punção venosa (9 mL de sangue em tubo à vácuo com heparina sódica -BD Vacutainer,

Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), centrifugado a 3000 rpm por 10 min e o plasma mantido congelado a -80°C até a análise. O transporte até a UFMG foi realizado com nitrogênio líquido para garantir a temperatura. Como existe um potencial "decaimento" da reatividade dos testes em virtude da degradação natural dos peptídeos e proteínas armazenadas, as amostras foram processadas em conjuntos separados afim de que nenhuma amostra ficasse armazenada por período maior que 2 anos.

5.5 Análise estatística:

A Análise estatística foi realizada pelo programa SPSS (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

A distribuição dos valores referentes ao nível sérico das citocinas se demonstrou bastante errática com assimetria positiva (desvio a esquerda). Então esses valores passaram por transformação logarítmica, atingindo uma melhor distribuição, porém mesmo assim a distribuição das citocinas não foi normal pelo teste de Shapiro-Wilk para nenhum dos elementos. Dessa maneira foram utilizados os testes de Mann-Whitney (MW) ou Kruskal-Wallis (KW), a depender da quantidade de variáveis. As correlações foram realizadas pelo teste de Spearman e, para a correção de múltiplas correlações e comparações foi utilizado o False Discovery Rate (FDR).

Em primeira análise verificou-se por correlação (pelo teste de Pearson) se algum fator inflamatório tinha comportamento igual a outro (nos casos de R maior que 0,9) e nenhuma correlação foi maior que 0,75. Assim todas as citocinas foram avaliadas e todos os testes foram corrigidos para múltiplas comparações (FDR). Como os fatores inflamatórios foram coletados e analisados por dois métodos diferentes, corrigimos as múltiplas comparações em grupos separados – fatores analisados pelo ELISA (BDNF, $\text{TNF}\alpha$, sTNFr1, sTNFR2, GDNF, CNTF, NT3, NT4, NGF) e fatores analisados por CBA (IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, IFN γ e $\text{TNF}\alpha$). Dados com desvio padrão maior que 3 foram considerados *outliers* e removidos das análises.

A correlação das imagens com os marcadores inflamatórios foi realizada com o teste de Pearson e serão descritas as correlações com R acima de 0,3, que é considerada uma correlação média⁵¹

Para prever a sensibilidade desses fatores em relação ao diagnóstico de epilepsia, de uma maneira exploratória, realizamos também a análise ROC (Receiver Operating Characteristic).

6. RESULTADOS

6.1 Etiologia

Foram coletadas 577 amostras. Após a exclusão de pacientes de acordo com os critérios apresentados, foram avaliados no estudo 490 pacientes e 168 controles, sendo que deste último grupo, dois foram excluídos por falta de informações básicas. A figura 6 demonstra a distribuição desses indivíduos de acordo com os grupos.

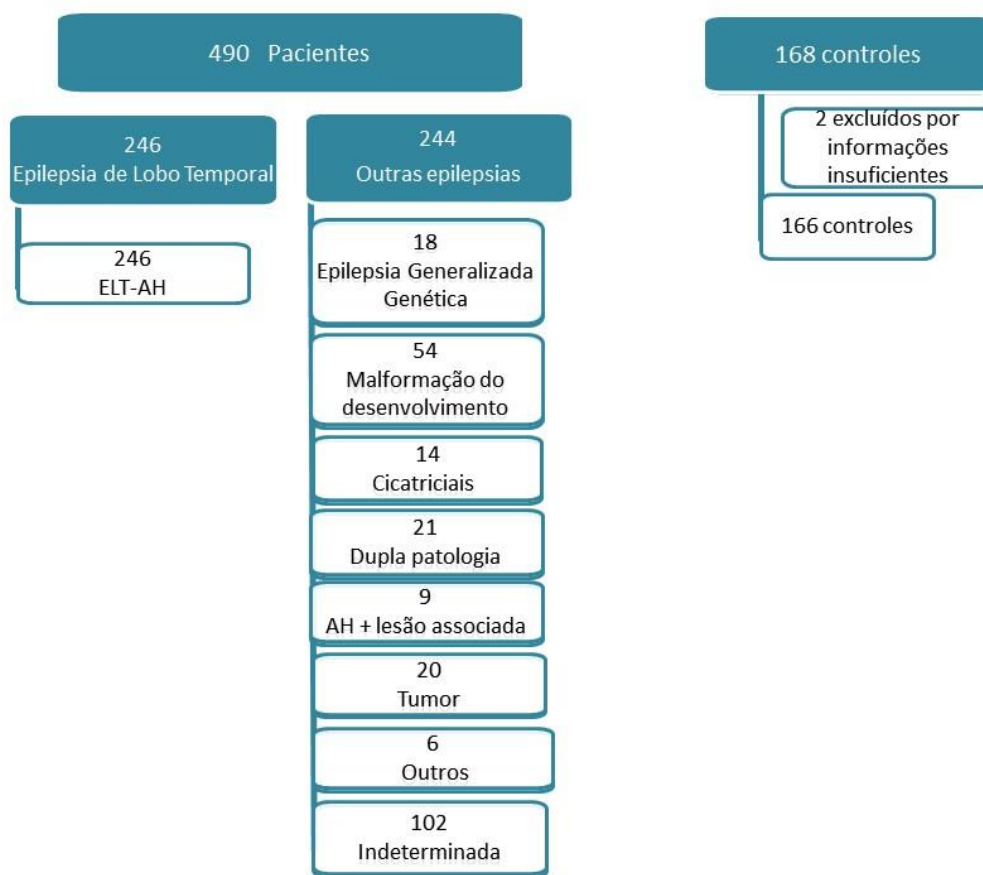


Figura 6: Distribuição dos indivíduos do estudo e conforme etiologia da epilepsia.

6.2 Idade, tempo de epilepsia e gênero

Avaliamos a correlação entre os fatores inflamatórios e a idade na coleta de pacientes e controles, além da correlação com o tempo de epilepsia no caso dos pacientes. Nenhum resultado apresentou o R maior que 0,3, o que é considerada uma correlação média⁵¹. Dessa maneira, os fatores inflamatórios não estão correlacionados com a idade de pacientes ou de controles, nem com o tempo de doença dos pacientes. As amostras eram semelhantes em relação ao gênero dos pacientes e controles ($p > 0,05$, MW).

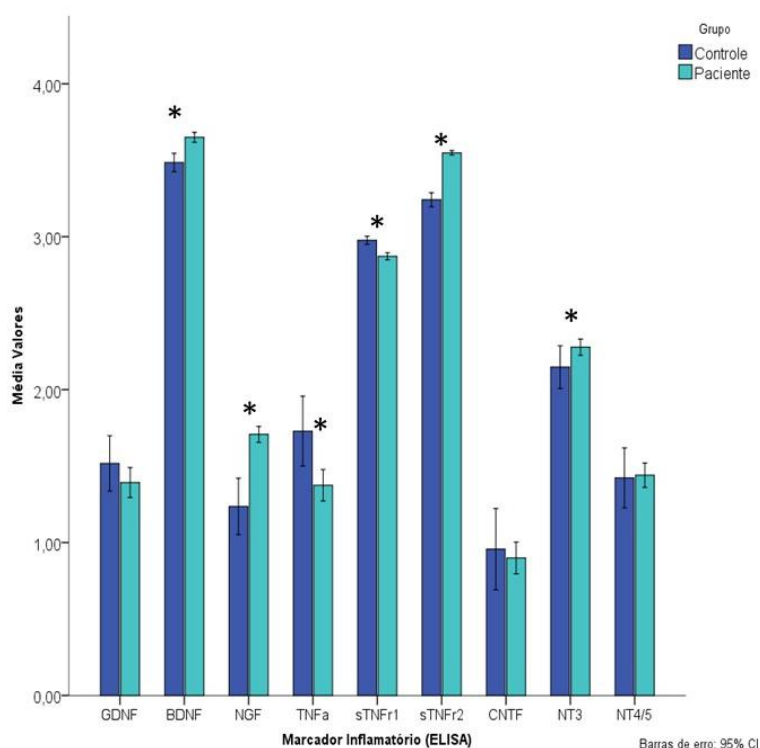
6.3 Comorbidades

As comorbidades encontradas em pacientes, e as respectivas análises, estas estão discriminadas no Apêndice 1.

6.4 Os fatores inflamatórios e as epilepsias

Avaliamos, inicialmente, todos os pacientes juntos, independente da etiologia e compararmos com os controles. Após avaliamos os grupos ELT e outras epilepsias separadamente em relação aos controles. Todos esses apresentaram padrão semelhante: a maioria dos marcadores apresentou diferença significativa entre os grupos, exceto GDNF, NT4/5 e CNTF. A Figura 7 mostra a distribuição de todos os pacientes e controles, enquanto que as tabelas 1 e 2 mostram os dados e os valores de p dos grupos ELT e outras epilepsias, respectivamente, quando comparados aos controles.

A.



B.

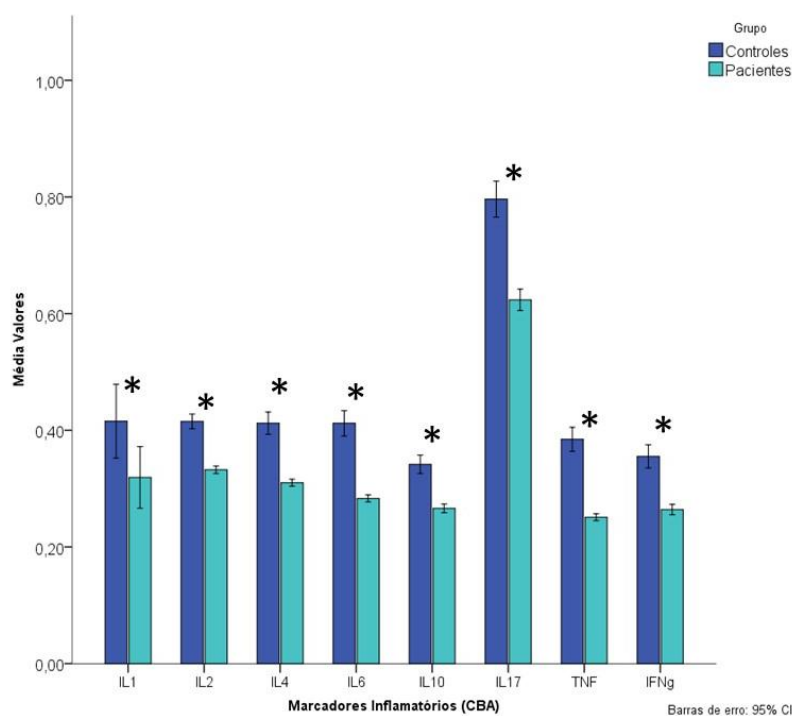


Figura 7: Distribuição da média dos valores em escala logarítmica de todos os pacientes e controles conforme os marcadores inflamatórios. A. Marcadores coletados pelo método ELISA; B. Marcadores coletados pelo método CBA. * $p < 0,05$, MW, FDR.

Tabela 1: Comparação entre os níveis séricos de fatores inflamatórios entre pacientes ELT e controles. A. Marcadores coletados pelo método ELISA ; B. Marcadores coletados pelo método CBA.

A.

Marcador inflamatório	Grupo	N	Valor (mediana, mín-máx)	P (FDR)
BDNF	ELT	239	3,68 (2,68 - 4,46)	<0,001
	Controles	155	3,46 (2,65 - 4,21)	
GDNF	ELT	239	1,42 (0 - 6)	0,132
	Controles	93	1,59 (0 - 4)	
NGF	ELT	238	1,63 (0 - 3,71)	<0,001

	Controles	93	1,22 (0 - 3,46)	
TNFa	ELT	163	1,38 (0 - 3,82)	0,015
	Controles	93	1,88 (0 - 3,61)	
sTNFr1	ELT	231	2,89 (2,03 - 3,75)	<0,001
	Controles	83	2,98 (2,64 - 3,35)	
sTNFr2	ELT	238	3,53 (2,98 - 4,05)	<0,001
	Controles	92	3,19 (2,83 - 3,91)	
CNTF	ELT	239	0 (0 - 4,36)	0,68
	Controles	100	0 (0-3,81)	
NT3	ELT	238	2,18 (0,64 - 4,20)	0,007
	Controles	100	1,19 (0 - 4,20)	
NT4/5	ELT	239	1,52 (0 - 3,91)	0,808
	Controles	100	1,36 (0 - 3,68)	

Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

B.

Marcador inflamatório	Grupo	N	Valor (mediana, mín-máx)	P (FDR)
IL1	ELT	105	0,28 (01,59)	0,013
	Controles	78	0,30 (0-1,4)	
IL2	ELT	189	0,33 (0,20 - 0,52)	<0,001
	Controles	91	0,43 (0,31 - 0,63)	
IL4	ELT	192	0,29 (0,21 - 0,50)	<0,001
	Controles	91	0,45 (0,20 - 0,68)	
IL6	ELT	193	0,29 (0,12 - 0,47)	<0,001
	Controles	91	0,45 (0,23 - 0,69)	
IL10	ELT	197	0,24 (0,12-0,49)	<0,001
	Controles	91	0,35 (0,16 - 0,61)	

IL17	ELT	193	0,64 (0,22 - 1,29)	<0,001
	Controles	85	0,81 (0,43 - 1,22)	
TNF	ELT	180	0,24 (0,93 - 0,42)	<0,001
	Controles	91	0,41 (0,16 - 0,46)	
IFN γ	ELT	181	0,24 (0,11 - 0,55)	<0,001
	Controles	90	0,36 (0,13 - 0,65)	

Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

Tabela 2: Comparação entre os níveis séricos de fatores inflamatórios entre pacientes com outras epilepsias e controles. A. Marcadores coletados pelo método ELISA ; B. Marcadores coletados pelo método CBA. A.

Marcador inflamatório	Grupo	N	Valor (mediana, mín-máx)	P (FDR)
BDNF	Outras Epilepsias	238	3,63 (2,17 - 4,33)	0,0013
	Controles	155	3,46 (2,65 - 4,21)	
GDNF	Outras Epilepsias	238	1,49 (0 - 6)	0,612
	Controles	93	1,59 (0 - 4)	
NGF	Outras Epilepsias	238	1,66 (0 - 3,61)	<0,001
	Controles	93	1,22 (0 - 3,46)	
TNF α	Outras Epilepsias	138	1,32 (0 - 3,49)	0,007
	Controles	93	1,88 (0 - 3,61)	
sTNFr1	Outras Epilepsias	230	2,91 (2,06 - 3,72)	0,003
	Controles	83	2,98 (2,64 - 3,35)	
sTNFr2	Outras Epilepsias	236	3,55 (3,02 - 4,20)	<0,001
	Controles	92	3,19 (2,83 - 3,91)	
CNTF	Outras Epilepsias	238	0 (0 - 4,51)	0,61
	Controles	100	0 (0-3,81)	
NT3	Outras Epilepsias	236	2,21 (0,98 - 4,05)	0,0013
	Controles	100	1,19 (0 - 4,20)	
NT4/5	Outras Epilepsias	238	1,53 (0 - 3,94)	0,61
	Controles	100	1,36 (0 - 3,68)	

Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

B.

Marcador inflamatório	Grupo	N	Valor (mediana, mín-máx)	P (FDR)
IL1	Outras Epilepsias	22	0,207 (0-1,07)	0,03
	Controles	78	0,30 (0-1,4)	
IL2	Outras Epilepsias	202	0,33 (0,19 - 0,56)	<0,001
	Controles	91	0,43 (0,31 - 0,63)	
IL4	Outras Epilepsias	200	0,29 (0,19 - 0,50)	<0,001
	Controles	91	0,45 (0,20 - 0,68)	
IL6	Outras Epilepsias	195	0,27 (0,13 - 0,48)	<0,001
	Controles	91	0,45 (0,23 - 0,69)	
IL10	Outras Epilepsias	195	0,25 (0,10 - 0,51)	<0,001
	Controles	91	0,35 (0,16 - 0,61)	
IL17	Outras Epilepsias	198	0,62 (0,13 - 1,27)	<0,001
	Controles	85	0,81 (0,43 - 1,22)	
TNF α	Outras Epilepsias	193	0,25 (0,10 - 0,45)	<0,001
	Controles	91	0,41 (0,16 - 0,46)	
IFN γ	Outras Epilepsias	177	0,25 (0,11 - 0,56)	<0,001
	Controles	90	0,36 (0,13 - 0,65)	

Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

A comparação entre pacientes ELT e pacientes com outras epilepsias evidenciou apenas a IL6 e IL17 ($p = 0,036$ e $0,048$, respectivamente) com diferença significativa, porém após a correção pelo FDR ($p = 0,174$, ambos), nenhum marcador foi diferente entre os dois grupos.

Já na comparação entre os controles e os pacientes com epilepsia secundária a malformação do desenvolvimento cortical, observamos que o nível sérico de BDNF, NGF, sTNFR2 e NT3 é maior nos pacientes, enquanto que os de

IL2, IL4, IL6, IL17, TNF α (CBA) e IFN γ é menor nos pacientes, mesmo após a correção pelo FDR. Esses dados estão representados na tabela 3.

Para analisar as pacientes com dupla patologia, selecionamos apenas aqueles com displasias corticais focais e evidência de AH. Quando esse grupo é comparado ao grupo de controles, evidenciamos que os níveis séricos de sTNFr2 são maiores nos pacientes que nos controles enquanto que os níveis de IL2, IL4, IL6, IL10, TNF α (CBA), IFN γ e IL17 são menores nos pacientes, também descritos na tabela 3.

Quando comparamos os pacientes com ELT (n=184) e malformação do desenvolvimento cortical (n=53), curiosamente apenas o CNTF é significativo (p=0,004, MW, FDR), sendo maior no grupo de pacientes com malformação do desenvolvimento cortical.

Ao compararmos pacientes com epilepsias genéticas generalizadas com aqueles com malformação cortical do desenvolvimento e com ELT, não notamos diferença estatística das citocinas entre os grupos. O mesmo ocorreu ao compararmos pacientes com ELT e AH + lesão associada, porém esse segundo grupo tinha menos que 10 pacientes, tornando a análise pouco confiável.

Ao compararmos controles com epilepsias genéticas generalizadas observamos que os pacientes apresentam nível sérico de sTNFr2 mais alto, enquanto que os níveis séricos de IL2, IL6, TNF α e IL17 são mais altos nos controles que nos pacientes, como podemos observar na tabela 3. O grupo indeterminado e outros, não foram avaliados por serem muito heterogêneos. Porém, comparamos pacientes com alterações na RM dos que tem o exame normal (no caso, os pacientes indeterminados e com epilepsias genéticas generalizadas). Nessa análise apenas o sTNFr1 e sTNFr2 foram significativos, ambos maiores nos pacientes com RM normal (p=0,012 e 0,025, respectivamente). Após a correção pelo FDR, ambos não foram mais significativos (p=0,108 e 0,113).

Tabela 3: Valores das comparações entre os grupos com malformação do desenvolvimento cortical (MFDC), epilepsias genéticas generalizadas e dupla patologia em relação aos controles. (MW).

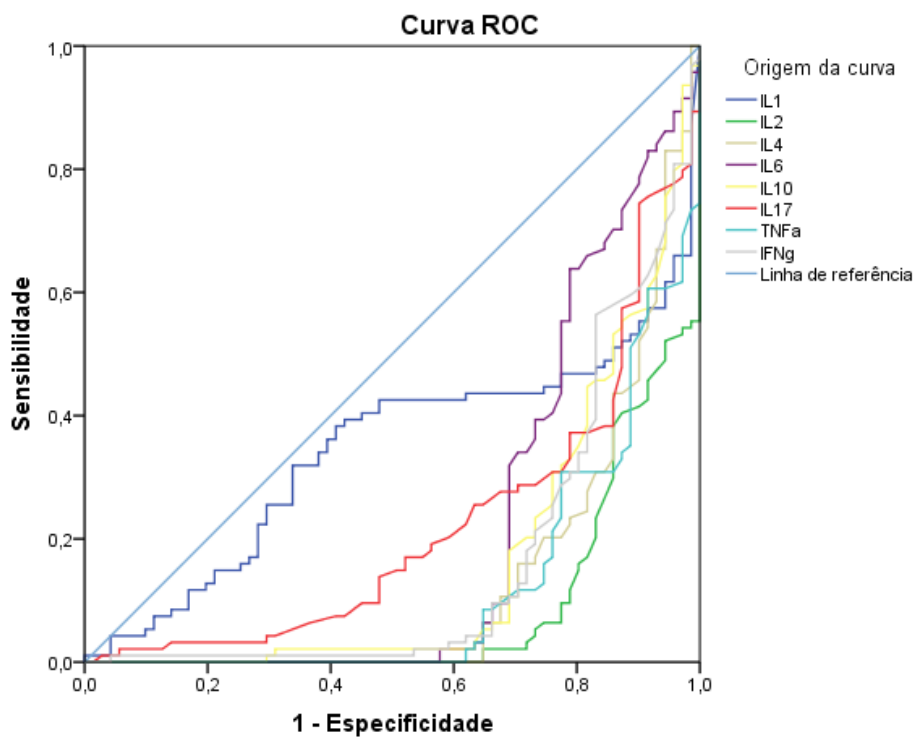
Marcador inflamatório	Grupo	N	Valor (mediana, mín-máx) pg/mL	p (não corrigido)	P (FDR)
IL1 β	Generalizadas X controles	0	NA	NA	NA
	MFDC X controles	2	NA	NA	NA
	Patologia dupla X controles	5	Na	NA	NA
IL2	Generalizadas X controles	91	0,353 (0,236 - 0,519)	0,01	0,018
	MFDC X controles	46	0,328 (0,236 - 0,519)	<0,001	<0,001
	Patologia dupla X controles	16	0,328 (0,236 - 0,519)	<0,001	<0,001
IL4	Generalizadas X controles	91	0,311 (0,229 - 0,487)	0,89	0,125
	MFDC X controles	45	0,299 (0,195 - 0,503)	<0,001	<0,001
	Patologia dupla X controles	16	0,299 (0,195 - 0,503)	<0,001	<0,001
IL6	Generalizadas X controles	91	0,267 (0,227 - 0,403)	<0,001	<0,001
	MFDC X controles	47	0,262 (0,158 - 0,462)	<0,001	<0,001
	Patologia dupla X controles	16	0,262 (0,158 - 0,462)	<0,001	0,001
IL10	Generalizadas X controles	91	0,305 (0,218 - 0,444)	0,434	0,434
	MFDC X controles	45	0,262 (0,1-0,463)	<0,001	<0,001
	Patologia dupla X controles	15	0,262 (0,1-0,463)	0,002	0,002
IL17	Generalizadas X controles	85	0,605 (0,340-0,790)	<0,001	<0,001
	MFDC X controles	46	0,622 (0,128 - 1,27)	<0,001	<0,001
	Patologia dupla X controles	16	0,622 (0,128 - 1,27)	<0,001	<0,001
TNF	Generalizadas X controles	91	0,415 (0,146 - 0,380)	0,002	0,005
	MFDC X controles	43	0,258 (0,184 - 0,4)	<0,001	<0,001
	Patologia dupla X controles	15	0,258 (0,184 - 0,4)	<0,001	<0,001
IFN γ	Generalizadas X controles	90	0,314 (0,178 - 0,463)	0,367	0,428
	MFDC X controles	42	0,260 (0,113 - 0,512)	<0,001	0,001
	Patologia dupla X controles	14	0,260 (0,113 - 0,512)	0,001	0,001
BDNF	Generalizadas X controles	15	3,36 (3,03 - 4,03)	0,749	0,972
	MFDC X controles	53	3,72 (2,87 - 4,32)	0,002	0,004
	Patologia dupla X controles	20	3,72 (2,87 - 4,32)	0,095	0,285
GDNF	Generalizadas X controles	15	1,63 (0-3,01)	0,972	0,972
	MFDC X controles	53	1,60 (0-6)	0,337	0,379
	Patologia dupla X controles	20	1,60 (0-5,95)	0,946	0,949
NGF	Generalizadas X controles	15	1,65 (1,26 - 2,54)	0,014	0,006
	MFDC X controles	53	1,72 (0,31-3,61)	<0,001	0,001
	Patologia dupla X controles	20	1,72 (0,31-3,61)	0,018	0,081
TNF α	Generalizadas X controles	7	1,28 (0-2,568)	0,138	0,413
	MFDC X controles	30	1,579 (0 - 3,49)	0,301	0,379
	Patologia dupla X controles	12	1,58 (0 - 3,49)	0,531	0,682
sTNFr1	Generalizadas X controles	14	3,026 (2,164 - 3,35)	0,572	0,971
	MFDC X controles	51	2,91 (2,016 - 3,36)	0,052	0,094
	Patologia dupla X controles	20	2,91 (2,016 - 3,36)	0,142	0,319
sTNFr2	Generalizadas X controles	15	3,56 (3,20 - 3,92)	<0,001	<0,001
	MFDC X controles	53	3,54 (3,20 - 4,07)	<0,001	<0,001

	Patologia dupla X controles	20	3,54 (3,20 - 4,07)	<0,001	<0,001
CNTF	Generalizadas X controles	15	1,18 (0 - 3,54)	0,594	0,972
	MFDC X controles	53	1,23 (0 - 4,51)	0,149	0,223
	Patologia dupla X controles	20	1,23 (0 - 4,51)	0,433	0,649
NT3	Generalizadas X controles	15	2,38 (0,89 - 3,36)	0,934	0,972
	MFDC X controles	53	2,23 (1,54 - 4,01)	0,002	0,004
	Patologia dupla X controles	20	2,23 (1,54 - 4,01)	0,223	0,401
NT4/5	Generalizadas X controles	15	1,32 (0-2,81)	0,894	0,972
	MFDC X controles	53	1,53 (0 - 3,94)	0,441	0,441
	Patologia dupla X controles	20	1,53 (0 - 3,94)	0,949	0,949

Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

A análise ROC com todos os pacientes com epilepsia em relação aos controles demonstrou que o sTNFr2 foi o único com área sob a curva maior que 0,7. As interleucinas parecem ter pouca especificidade e sensibilidade. A figura 8 demonstra os gráficos comparando os marcadores e a tabela 4 os valores obtidos.

A.



B.

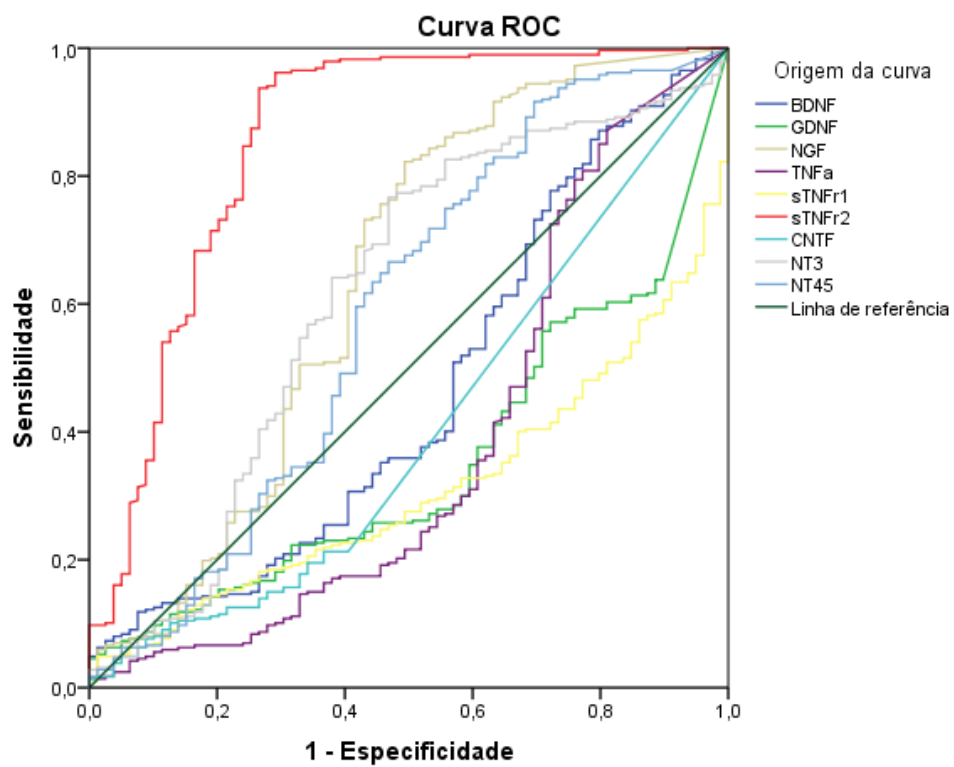


Figura 8: Comparação das curvas ROC entre os marcadores inflamatórios (A – CBA ; B- ELISA)

Tabela 4: Dados obtidos com análise individual de cada marcador inflamatório.

Marcador inflamatório	Grupo	N	Área sob a curva (Lim superior- inferior)	P
IL1 β	Todas epilepsias	127	0,386	0,006
	Controles	78	(0,310 - 0,463)	
IL2	Todas epilepsias	394	0,175	<0,001
	Controles	91	(0,132 - 0,218)	
IL4	Todas epilepsias	395	0,191	<0,001
	Controles	91	(0,135 - 0,247)	
IL6	Todas epilepsias	391	0,173	<0,001
	Controles	91	(0,117 - 0,228)	
IL10	Todas epilepsias	385	0,221	<0,001
	Controles	91	(0,169 - 0,273)	
IL17	Todas epilepsias	394	0,22	<0,001
	Controles	85	(0,169-0,270)	
TNF	Todas epilepsias	376	0,133	<0,001
	Controles	91	(0,087 - 0,179)	
IFN γ	Todas epilepsias	360	0,222	<0,001
	Controles	90	(0,167 - 0,277)	
BDNF	Todas epilepsias	482	0,625	<0,001
	Controles	155	(0,573 - 0,677)	
GDNF	Todas epilepsias	482	0,462	0,248
	Controles	93	(0,402 - 0,522)	
NGF	Todas epilepsias	481	0,662	<0,001
	Controles	93	(0,589 - 0,736)	
TNF α	Todas epilepsias	304	0,395	0,002

	Controles	93	(0,322 - 0,469)	
sTNFr1	Todas epilepsias	466	0,357	<0,001
	Controles	83	(0,304 - 0,409)	
sTNFr2	Todas epilepsias	479	0,858	<0,001
	Controles	92	(0,806 - 0,911)	
CNTF	Todas epilepsias	482	0,501	0,972
	Controles	100	(0,435 - 0,568)	
NT3	Todas epilepsias	479	0,608	0,001
	Controles	100	(0,541 - ,676)	
NT4/5	Todas epilepsias	482	0,513	0,69
	Controles	100	(0,447-0,578)	

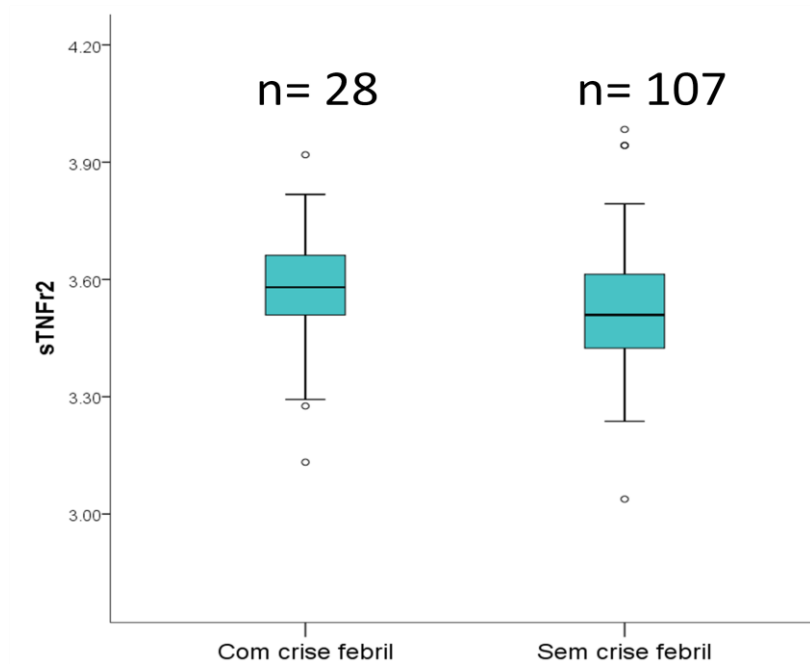
Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

6.5 Epilepsia de Lobo temporal – aspectos clínicos e marcadores inflamatórios

Analisando apenas os pacientes com ELT, assim como no grupo total, não houve correlação ($r > 0,3$) entre os fatores inflamatórios e a idade na coleta de pacientes e controles, além de ausência de correlação com o tempo de epilepsia. Dessa maneira, os fatores inflamatórios não estão correlacionados com a idade de pacientes ou de controles, nem com o tempo de doença dos pacientes. Não havia diferença também em relação ao gênero ($p > 0,05$, MW).

Dos pacientes com ELT-AH, 77 tiveram as amostras de sangue coletadas após cirurgia de epilepsia, sendo todos coletados mais de 3 meses após cirurgia. A comparação das citocinas entre os grupos que não haviam sido submetidos a cirurgia e os que já haviam passado por procedimento cirúrgico não demonstrou diferença significativa. Assim, esses pacientes foram incluídos nas análises que consideravam os antecedentes dos pacientes, porém foram excluídos das análises em relação à frequência de crises, dados de EEG e das imagens.

Quando avaliando apenas os pacientes, observamos que a dosagem de sTNFr2 é maior ($p = 0,044$, MW) no grupo de pacientes com antecedente de crise febril ($n = 28$) em relação ao grupo sem tal antecedente ($n = 107$), conforme a figura 9.



porém após a correção por FDR esse valor não é mais significativo ($p=0,39$). O mesmo ocorre com o IFN γ em relação ao grupo de pacientes com antecedente familiar. Os pacientes com antecedente familiar de epilepsia ($n=83$) apresentam níveis séricos de IFN γ maiores ($p=0,025$, MW; 0,20 com FDR) que os que não tem familiares com epilepsia ($n=70$) (figura 10).

Figura 9: Distribuição do sTNFr2 sérico entre pacientes com e sem antecedente de crise febril ($p=0,044$, MW; $p=0,39$ com FDR) - Valores em escala logarítmica.

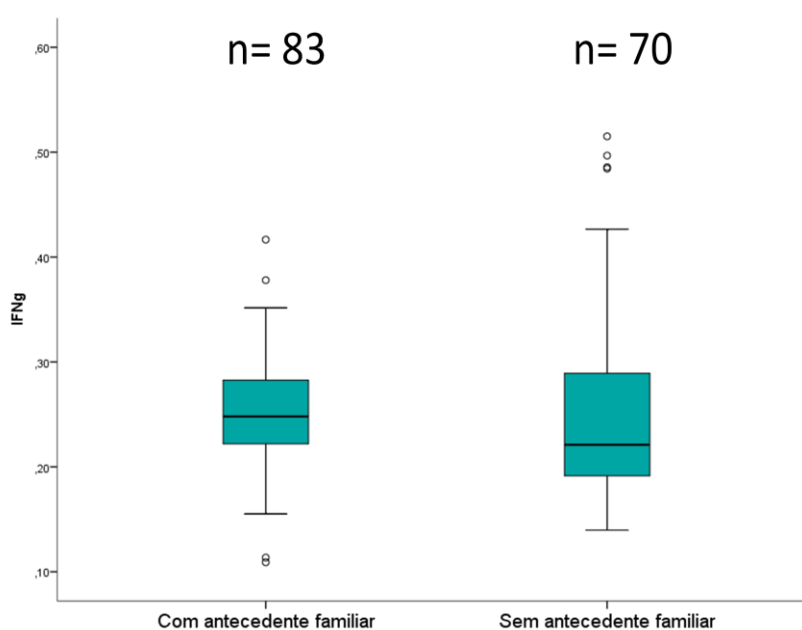


Figura 10: Distribuição do IFN γ sérico entre pacientes com e sem antecedente familiar (até segundo grau) de crises ($p=0,025$, MW; $0,20$ com FDR)- Valores em escala logarítmica.

Outro achado interessante é em relação à presença de calcificação. Considerando apenas os pacientes que foram submetidos à TC de crânio ($n=147$), 69 deles apresentavam calcificações na imagem, e esses apresentaram níveis séricos de BDNF ($p=0,020$, MW; $n=69$ com calcificações, 78 sem calcificações), IL10 ($p=0,039$, MW; $n=53$ com calcificações, 59 sem calcificações) e IL17 ($p=0,047$, MW; $n=61$ com calcificações, 60 sem calcificações) menores que nos pacientes sem tal achado na TC de crânio, sendo que após a correção do FDR temos os seguintes resultados, respectivamente, $p=0,180$; $0,188$; $0,188$. Tais achados estão representados na figura 11. Como a IL10 e o BDNF tiveram relação com a frequência de crises, avaliamos com o qui-quadrado se havia associação entre a presença de calcificações que a frequência de crises, e não foi significativo ($p=0,714$).

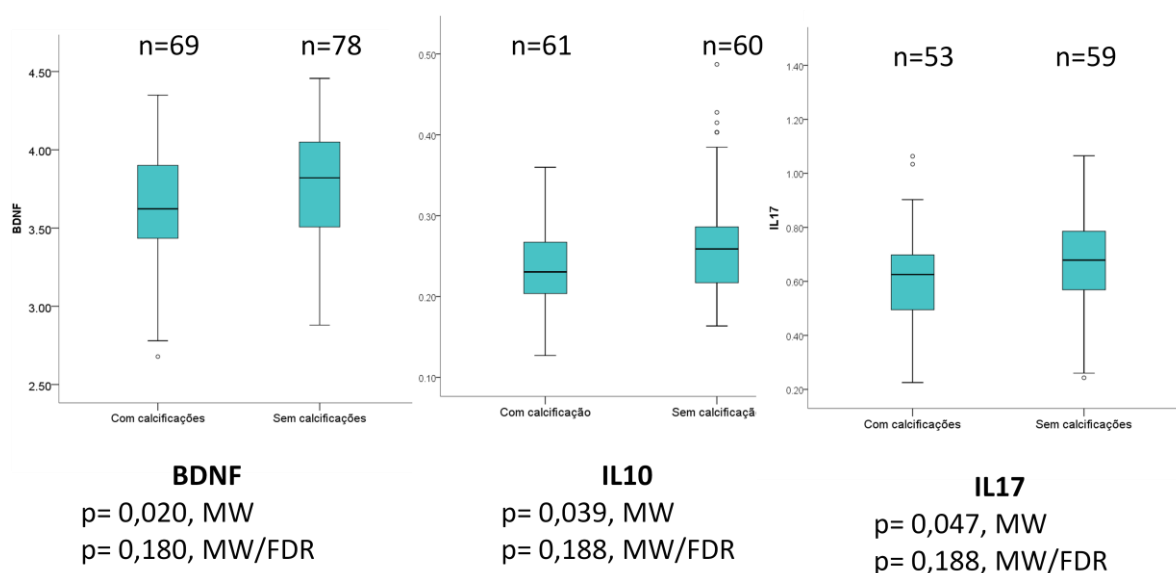


Figura 11: Distribuição do BDNF, IL10 e IL 17 respectivamente, em relação aos pacientes com e sem calcificações na tomografia. - Valores em escala logarítmica.

Não houve diferença estatística nos níveis séricos dos marcadores inflamatórios entre pacientes com evidência de AH à direita ou à esquerda, ou entre pacientes com AH uni ou bilateral ($p>0,05$).

Quando avaliamos os EEGs, notamos que o GDNF, sTNFr1 e TNF α (ELISA) foram significativamente maiores nos pacientes que apresentam pouca AEI ao EEG, porém após a correção FDR para múltiplas comparações, apenas o GDNF se mantém significativo ($p=0,009$), e os sTNFr1 e TNF α não são significativos ($p=0,120$ e $0,06$, respectivamente), como demonstrado da figura 12

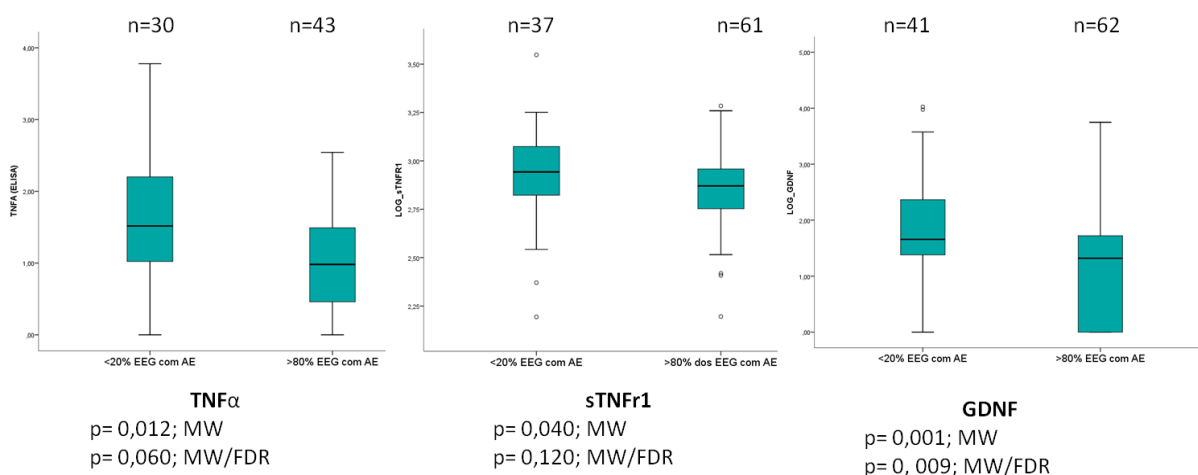


Figura 12: Distribuição do TNF α , sTNFr1 e GDNF respectivamente, entre os pacientes com menos de 20% dos EEGs com AE e com mais de 80% dos EEGs com AE. - Valores em escala logarítmica.

Em relação à frequência de crises, ao dividirmos os pacientes nos grupos crises frequentes e crises infrequentes, de acordo com os critérios descritos na metodologia, notamos que BDNF, IL2, IL4 e IL10 apresentavam níveis séricos mais altos nos pacientes com maior frequência de crises, enquanto o NT3 era mais baixo, em relação ao grupo de pacientes com crises infrequentes. Porém após correção pelo FDR, apenas o IL2, IL4 e IL10 se mantiveram significativos enquanto o BDNF e NT3 não. A tabela 5 e a figura 13 demonstram os achados em relação à frequência de crises ao longo do acompanhamento. Não houve diferença quando avaliamos a frequência de crises dos pacientes no momento da coleta. Já em relação às crises próximas ao dia da coleta, apenas o sTNFr1 foi mais elevado nos pacientes que estavam há 5 dias sem crises em relação aos que tiveram crises no dia ou no dia

anterior ($p=0,030$), porém após a correção pelo FDR esse valor não foi mais significativo ($p=0,27$, MW, FDR).

Tabela 5: Distribuição dos marcadores em relação à frequência de crises dentre os pacientes com ELT

Marcador	Grupo	N	p (não corrigido)	P (FDR)
BDNF	crises infrequentes	63	0,006	0,054
	crises frequentes	167		
NT3	crises infrequentes	62	0,002	0,09
	crises frequentes	167		
IL2	crises infrequentes	54	0,001	0,008
	crises frequentes	128		
IL4	crises infrequentes	54	0,006	0,021
	crises frequentes	128		
IL10	crises infrequentes	50	0,008	0,021
	crises frequentes	125		

Análise por MW e correção por FDR. Valores expressos em escala logarítmica.

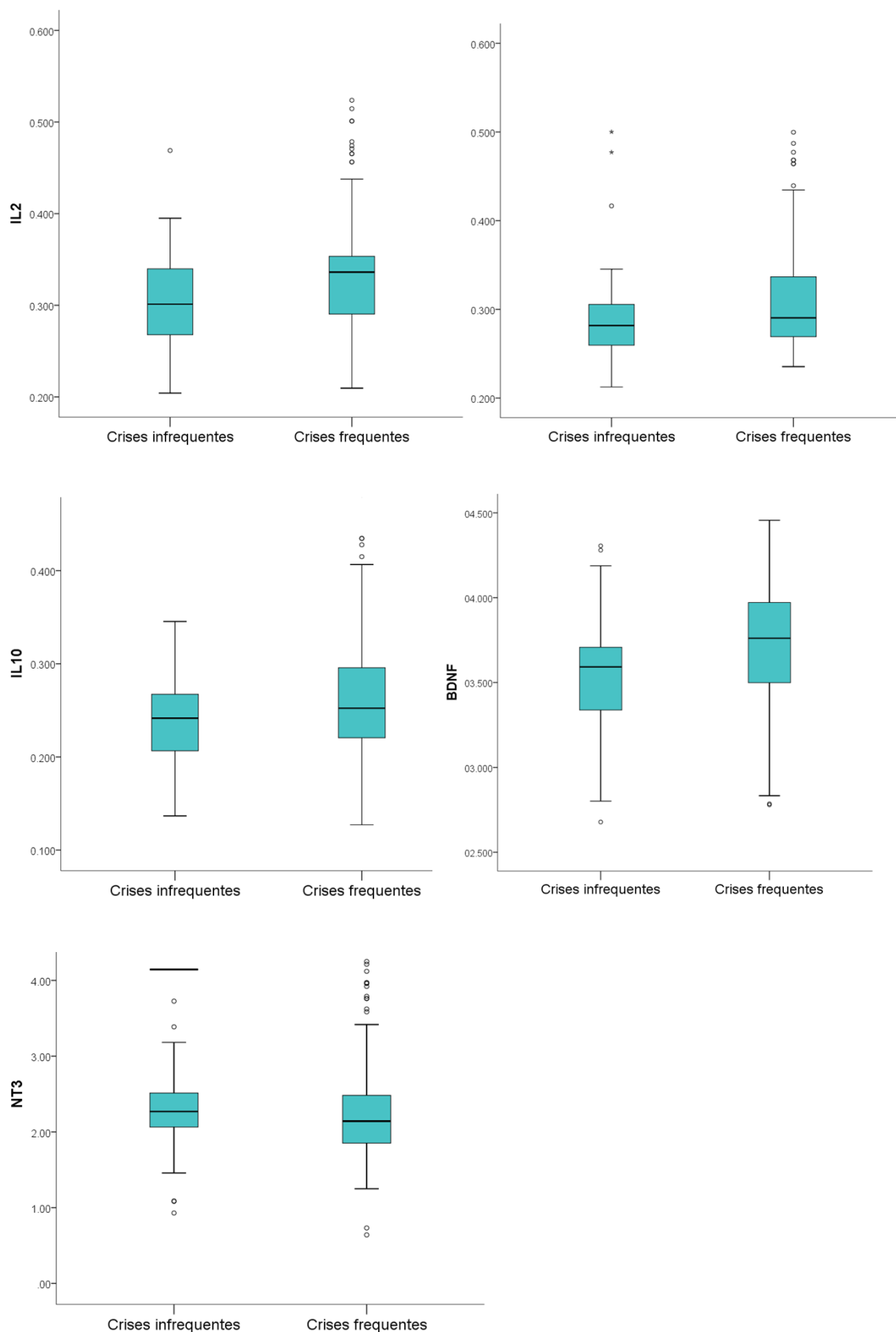


Figura 13: Distribuição do NT3, BDNF, IL2, IL4 e IL10, respectivamente, em relação a frequência de crises - Valores em escala logarítmica.

6.6 Epilepsia de lobo temporal – Imagem e marcadores inflamatórios

Para a avaliação de imagens de RM foram incluídas 86 imagens de pacientes com ELT. Avaliando a correlação dos marcadores inflamatórios com os dados de imagem, observamos que a espessura cortical do lobo frontal ipsilateral a EH tem relação inversa com o IL6 e IFN γ ($r=-0,308$ e $-0,409$; $p= 0,008$ e $0,001$, após FDR, $p=0,246$ e $0,055$ respectivamente) e o TNF α (ELISA) tem relação inversa com o lobo frontal contralateral ($r=-0,313$ e $p=0,016$), porém esses dados não foram significativos após a correlação pelo FDR ($p=0,816$). Já em relação ao volume das estruturas subcorticiais observamos que o tálamo ipsilateral estava correlacionado de maneira inversa com os níveis séricos de GDNF e TNF α (ELISA) ($r= -0,302$ e $0,445$; $p=0,006$ e $<0,001$), sendo que apenas a relação com o TNF α se manteve significativa após a correção pelo FDR($p=0,003$). Além disso o NGF apresentou relação inversa com a amígdala contralateral ($r=-0,312$ $p= 0,0050$, após FDR, $p= 0,202$) e o IFN γ com caudado contralateral ($r=-0,316$, $p=0,008$, após FDR, $p= 0,734$), ambos não significativos após a correção para múltiplas comparações. Um esquema desses achados pode ser observado na figura 14.

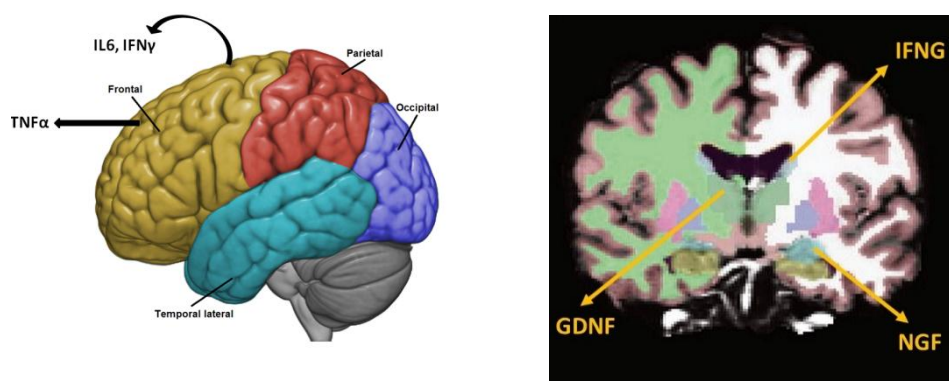


Figura 14: Demonstração esquemática das regiões cerebrais e os possíveis marcadores inflamatórios correlacionados a cada estrutura.

O TNF α foi avaliado pelos dois métodos - ELISA e CBA - com diferente número de pacientes em cada método. Apesar de, dependendo da análise, o resultado de apenas uma das análises veio positiva e a outra não, os resultados sempre têm o mesmo padrão.

7. DISCUSSÃO

Nosso estudo é um dos primeiros a avaliar uma grande coorte de pacientes e realizar uma avaliação exploratória sobre a relação de 16 marcadores inflamatórios, dados clínicos e de imagem em pacientes com epilepsia. Estudos clínicos com marcadores inflamatórios ainda apresentam resultados conflitantes, com casuísticas pequenas, além de pouco detalhamento sobre o quadro clínico da epilepsia. Por isso optamos por realizar uma análise exploratória, uma vez que não temos dados consistentes na literatura para guiar a análise de cada marcador com algum dado clínico ou uma região cerebral específica.

Os dados obtidos são inúmeros e a interpretação desses é complexa por diversos motivos. Primeiramente existe o fato de que estamos estudando os marcadores inflamatórios a nível sérico e tentando compreender o que ocorre a nível cerebral. Nem sempre as concentrações séricas serão fiéis marcadores da atividade inflamatória cerebral. Como citado, as citocinas têm ação redundante, assim a falta de uma pode ser compensada pela atividade de outra³⁰. Além disso, a maioria das citocinas apresenta ação autócrina (atuando na mesma célula que a produziu) ou parácrina (em células próximas), porém podem ser vistas na circulação quando liberadas em grandes quantidades, e até atuar em tecidos distantes (ação endócrina)³⁰. Já as neurotrofinas, têm sua principal ação no próprio sistema nervoso, e ainda não se conhece bem o papel das formas circulantes e de seus receptores. Assim, quando avaliamos os níveis séricos dessas, devemos ter cuidado na interpretação. E é por isso que são necessárias grandes amostras de pacientes para melhor avaliação do papel dessas nas epilepsias.

Além disso, como dito anteriormente, a grande maioria das informações que temos sobre o papel da inflamação é proveniente de modelos animais, o que nos leva a dois problemas: 1. nem sempre modelos animais são fidedignos do que ocorre nos seres humanos; 2. os experimentos costumam estudar um contexto de estado de mal epiléptico provocado ou crises induzidas por um estímulo externo, em geral elétrico ou químico (não sendo fácil separar se a inflamação é decorrente do insulto que provoca as crises ou das crises *per se*), ou tentam avaliar a fase aguda da epileptogênese, e não a fase crônica da epilepsia e as consequências remotas da inflamação. O nosso estudo, principalmente a parte de imagem, está avaliando

alterações já estabelecidas, como as estruturais crônicas da epilepsia. Não necessariamente a atrofia observada nos exames de imagem, vista em corte transversal (como neste estudo), reflete o componente atual da inflamação no parênquima cerebral. Já alterações estruturais recentes, que incluiria atrofia progressiva em estudos longitudinais de imagens, não foram avaliadas no presente estudo. Por outro lado, ao analisar EEGs e crises próximas à coleta de sangue, estamos diante fatos mais recentes. Não é simples a diferenciação dessas duas fases, porém não podemos descartar a influência de uma sobre a outra. Como demonstrou o estudo ENIGMA, alterações genéticas, que podem ser adquiridas, inclusive na micróglia, que é influenciada ativamente pelos marcadores inflamatórios, podem gerar danos estruturais³⁸. Assim, a análise da correlação dos fatores inflamatórios, de imagem, e características da epilepsia não é trivial e por isso diversos dados podem parecer discrepantes num primeiro momento.

Nosso estudo utilizou dois métodos de dosagem de fatores inflamatórios no plasma e o TNF α foi medido nos dois métodos, apresentando sempre o mesmo padrão de resultados, sendo mais uma confirmação da confiabilidade dos nossos métodos.

A inflamação tem várias funções, por vezes modulando a atividade neuronal de maneira benéfica, por vezes de maneira negativa. A exata relação entre a correlação dos dados clínicos, de imagem e entre os marcadores inflamatórios é extremamente complexa e não pode ser destrinchada em um estudo isolado. Mas, sendo este o estudo com maior casuística até o momento, nossos dados são importantes para traçar planos para futuros estudos.

Para uma interpretação mais cuidadosa, discutiremos os marcadores divididos em grupos, de acordo com sua atuação e papel na epilepsia.

7.1 TNF, sTNFr1 e sTNFR2

O TNF α é uma citocina polipeptídica, pleiotrópica, produzida pela estimulação de monócitos, macrófagos e alguns linfócitos T, que age na modulação da resposta imune, tanto em situações normais quanto patológicas⁵². Sua regulação é aumentada nas crises de modelos animais, mas também em outras situações como traumas e isquemias⁵³. O TNF α é uma proteína transmembrana que quando

clivada pela enzima conversora alfa de TNF α (TACE) libera sua forma solúvel, o sTNF α (que é a forma avaliada nesse estudo, aqui sendo denominada como TNF). As duas formas podem se ligar aos seus dois receptores de membrana: o TNFr1, também chamado de p55 devido à sua massa molecular, e o TNFr2, ou p75^{52; 53}. O TNFr1 é mais expresso por células com maior susceptibilidade a ação citotóxica e por isso está mais relacionado com a morte celular. Já o TNFr2 é preferencialmente expresso por células de origem mielóide, principalmente células B e, assim, tem uma ação mais protetora⁵². Apesar disso, a maioria dos tipos celulares expressa ambos receptores⁵². Tais receptores também se apresentam na forma solúvel: sTNFr1 e sTNFr2, que são as formas avaliadas nessa tese⁵²⁻⁵⁴. Para melhor compreensão, a figura 15 exemplifica esses marcadores.

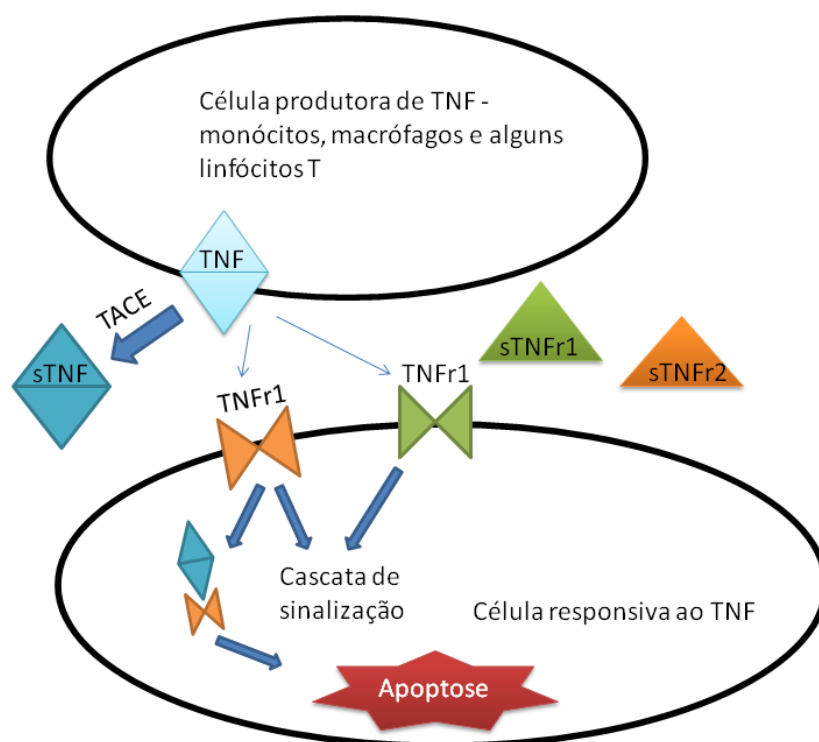


Figura 15: Esquema demonstrando a interação entre o TNF, seus receptores e suas formas solúveis- Adaptado de Tracey D et al,⁵⁴.

O papel das formas solúveis do TNF α e seus receptores não é bem estabelecido, uma vez que estes não atuam diretamente na membrana celular. Alguns afirmam que o TNF α é menos estável que seus receptores, sendo esse

rapidamente eliminado da circulação, e por isso os receptores circulantes seriam melhores marcadores da atividade do TNF α do que a concentração sérica deste^{54; 55}. Apesar de não traduzirem os sinais por não estarem na membrana, acredita-se que os receptores solúveis sejam capazes de modular a atividade do TNF, podendo ter três ações distintas:

- Agindo como antagonistas ou inibidores, uma vez que podem competir com os receptores de membrana na ligação com o TNF α ;

- Como proteínas de ligação apenas transportando o TNF α para longe de seu local de ação;

- Ter papel de estabilizar a estrutura trimérica do TNF α reduzindo o *clearance* que ocorre após sua clivagem em estrutura monomérica^{52; 54; 55}.

O TNF α e seus receptores já foram relacionados com epilepsia. Em estudos com modelos animais demonstrou-se que crises geradas por indução elétrica aumentam o TNF α em hipocampos de ratos⁵⁶. Além disso a injeção de TNF α em amígdala de ratos pode induzir a atividade epileptiforme⁵⁶ e prolongar crises convulsivas⁵⁷. Curiosamente, as crises também podem ser prolongadas em ratos que sofreram mutações e não apresentam qualquer receptor de TNF α ⁵⁷, o que indica que algum dos receptores tem ação no controle de crises, sendo mais provavelmente o sTNFr2, uma vez que um estudo observou que o aumento excessivo de TNF α pode inibir crises quando a ação deste é mediada pelo sTNFr2⁵³ e que durante as crises há aumento de sTNFr1 no hipocampos e redução do sTNFr2⁵⁸. Tal padrão pode ser compatível com os comportamentos opostos que notamos nos níveis séricos desses receptores no nosso estudo - TNF α e sTNFr1 são reduzidos nos pacientes (ELT e outras epilepsias) em relação aos controles, enquanto que o sTNFr2 é aumentado nos pacientes. No entanto, estudos que avaliaram o nível sérico de TNF α em humanos apresentam resultados conflitantes. Um estudo com 48 pacientes com epilepsia e 30 controles, não observou diferença nos níveis séricos de TNF⁵⁹.

Talvez a maior concentração de sTNFr1 e TNF α no hipocampo durante as crises, reduza a circulação sérica desses e aumente a do sTNFr2, fazendo os pacientes apresentarem o padrão descrito. Corroborando com essa hipótese, um

estudo avaliando o tecido de humanos, comparando o hipocampo ressecado de pacientes com ELT e controles (autópsia), mostrou que o TNF α está aumentado nos pacientes⁶⁰.

Em relação à etiologia, em um estudo com 75 pacientes com epilepsia focal, 26 com epilepsias generalizadas e 36 controles, o TNF α não foi diferente entre pacientes, controles ou diferentes etiologias de epilepsia⁶¹. Pacientes com ELT, com ou sem AH, também não apresentaram diferenças em relação aos níveis séricos de TNF⁶². Nosso estudo observou o sTNFr2 também é aumentado e o TNF α diminuído nos pacientes com epilepsia secundária a malformações do desenvolvimento cortical, naqueles com patologia dupla e ainda nos pacientes com epilepsias genéticas generalizadas, sendo que o sTNFr1 foi diferente entre os grupos nessas mesmas comparações. Também não observamos diferenças entre os pacientes com e sem evidências de AH.

Uma outra tese realizada do nosso grupo, avaliou alguns dos mesmos pacientes que a tese atual, porém em um outro momento e com outro método (imunoensaio multiplex -Luminex Xmap). Naquela avaliação foram incluídos 70 pacientes com ELT e 32 controles. Em uma das análises avaliou-se os níveis séricos de TNF α nos pacientes fármaco-resistentes (1,30 pcg/mL), fármaco-responsivos (1,2 pcg/mL) e controles (1,38 pcg/mL)⁶³. Apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística entre os grupos, podemos notar que os controles também apresentavam níveis séricos maiores que os pacientes, assim como no estudo atual.

O TNF, junto com seu receptor sTNFr1 estavam diminuídos nos nossos pacientes com maior quantidade de AEI ao EEG em relação àqueles com pouca AEI. O sTNFr2 não apresentou diferença. O sTNFr1 também estava reduzido nos pacientes que apresentaram crises no dia ou no dia anterior à coleta em relação aos pacientes que estavam há mais de 5 dias sem crises. Na literatura alguns estudos avaliaram especificamente a ação de citocinas no período pós ictal. Sinha *et al*, avaliou o nível sérico do TNF α em 16 pacientes logo após as crises e depois no período interictal e notou que o TNF α era mais elevado no período pós ictal³¹. Porém, Peltola *et al* e Gao *et al* não notaram tal comportamento, sendo que esse último avaliou plasma e LCR^{59; 64}. Nenhum desses avaliou os receptores solúveis do TNF. Assim, podemos notar que nas situações em que são esperadas uma maior

inflamação do SNC, como em pacientes em relação aos controles, EEG com maior quantidade de AEI e crises recentes, a tendência é o sTNFr1 e o TNF α séricos estarem reduzidos e o sTNFr2 elevado.

O último achado em relação a esse grupo de citocinas se dá no fato do sTNFr2 ter concentrações séricas mais elevadas em pacientes com ELT e antecedente de crises febris. Sabe-se que a crise febril é a causa mais comum de crises na infância e são muito frequentes em pacientes com ELT⁴³, sendo inclusive ponto de discussão se as crises podem gerar EH ou se os pacientes com EH apresentam maior incidências de crises durante os quadros febris. Em relação à expressão do TNF α nas crises febris, um estudo avaliou polimorfismos dos genes do TNF-308 e -238 em 137 pacientes de seis meses a seis anos com crises febris e 78 controles sadios e observou que tais polimorfismos eram mais encontrados em pacientes⁶⁵. Apesar de não haver estudos com os receptores, uma vez que assumimos que eles expressam indiretamente a atividade do TNF α , este pode estar relacionado com o insulto inicial desses pacientes. Sabidamente, o TNFr2 atua não apenas com a ligação do TNF α , mas também é receptor de diversas outras citocinas e neurotrofinas, que discutiremos mais a frente, e dependendo da célula em que está sendo expresso, do ligante e do contexto celular, esta molécula pode ter diversas ações, inclusive induzindo a apoptose⁶⁶, o que poderia ocorrer nas crianças com crises febris e EH secundária.

Na avaliação das imagens, o TNF α teve correlação inversa com a espessura cortical do lobo frontal contralateral à EH e com o tálamo ipsilateral. Estudos de imagem já demonstraram que paciente com ELT apresentam redução volumétrica dessas regiões. Assim, possivelmente a concentração do TNF α está relacionada com uma alteração estrutural neuronal nesses pacientes.

Na análise ROC, a sTNFr2 foi o fator inflamatório com maior especificidade e sensibilidade para separar os pacientes com epilepsia dos controles, o que nos leva a crer que a sua concentração sérica realmente é capaz de refletir a atividade inflamatória do TNF α .

Assim podemos concluir que claramente o TNF α e seus receptores têm relação direta com a epilepsia. Podemos inferir que o TNF α e o TNFr1 são moléculas mais relacionadas com atividade inflamatória cerebral, uma vez que são

mais expressas no hipocampo em estudos experimentais; porém suas formas solúveis provavelmente apresentam menor circulação sérica nas situações com maior inflamação, como nos pacientes em relação aos controles, EEG com maior AIE e crises recentes. Já o sTNFr2 parece ter uma ação contrária, com sua forma solúvel mais facilmente detectada e sendo um melhor marcador de epilepsia. Além disso o TNFr2 e sua forma solúvel podem estar relacionados com a epileptogênese nos casos de pacientes com antecedente de crises febris. Os achados de imagem, em que se infere que maior o TNF α sérico, maior a perda neuronal, pode ser o resultado da dissociação entre a avaliação da lesão estrutural estabelecida e a inflamação atual.

7.2 Neurotrofinas - NT3, NT4/5, NGF e BDNF.

As neurotrofinas são proteínas de baixo peso molecular que têm papel na transmissão e plasticidade da sinapse^{67 68}, além de estarem envolvidas na regulação e diferenciação de populações neuronais durante o desenvolvimento⁶⁹. São elas o NT3, NT4/5, NGF e BDNF. O NGF foi a primeira neurotrofina a ser descrita, seguida pelo BDNF e NT3. A NT4/5 foi descrita por mais de um grupo, sendo também denominada NT4 e NT5, e por isso a nomenclatura mais usual desta é NT4/5³⁵.

A ação dessas ocorre através da ligação a determinados receptores. Todas ligam-se ao receptor de neurotrofina p75 (p75NR), um membro da superfamília do TNF, nesse trabalho denominado como TNFr2, já estudado aqui, mas também se ligam a um receptor específico. O NGF se liga ao TrkA, o BDNF e o NT4/5 ao TrkB e o NT3 ao TrkC^{69; 70}. Essas inter-relações estão esquematizadas na figura 16.

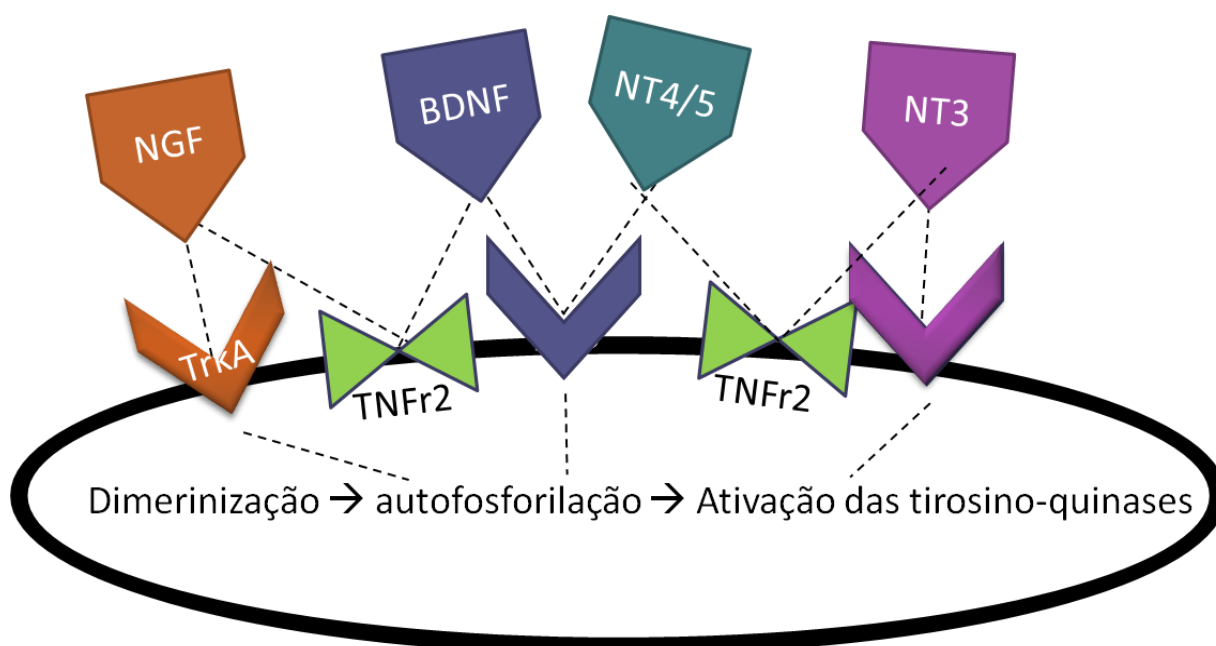


Figura 15: Esquema demonstrando a interação entre as neurotrofinas e seus receptores.

Os receptores Trk, quando ligados às neurotrofinas, sofrem dimerização e auto fosforilação, e assim ocorre consequente ativação das tirosino-quinases. O sinal é transmitido até o núcleo através de uma cascata de sinalização que irá definir a sobrevivência, diferenciação neuronal e expressão genética da célula^{68; 70; 71}. A ação do receptor TNFr2 quando ligado às neurotrofinas, ainda não é clara, mas aparentemente atua como facilitador da ativação do Trk^{69; 70}. Porém, na ausência de receptores Trk, o sTNFr2 pode contribuir para a apoptose celular⁷⁰.

Cada neurotrofina e seu receptor parecem ser mais expressos por células distribuídas em diferentes regiões. No hipocampo o NGF é expresso em células granulares e piramidais enquanto o receptor TrkA está localizado em fibras colinérgicas específicas no corpo estriado e determinadas regiões do hipocampo⁷⁰. Isso permitem ao NGF a modulação da função do septo-hipocampal, associada a potenciação de longa duração (*long term potentiation* – LTP), o que aumenta a sinapse estimulando neurônios de maneira síncrona e está relacionada com a memória de longo prazo / espacial⁶⁹. Já o BDNF e o NT3, junto com seus receptores, são expressos pelos neurônios e interneurônios de maneira mais difusa

⁷⁰ e em várias regiões do hipocampo, sendo o NT3 expresso preferencialmente por células granulares e piramidais da região CA2^{69; 72}.

Além da clara distribuição das neurotrofinas e seus receptores em regiões envolvidas na ELT, estudos experimentais demonstraram alterações na expressão das neurotrofinas, de seus RNAs mensageiros (RNAm) e receptores induzidas por crises⁷³. Sabidamente a inflamação induz o brotamento de fibras musgosas, relacionado com a epileptogênese da ELT, e acredita-se que os fatores neurotróficos atuam diretamente nesse processo uma vez que regulam a plasticidade neuronal ⁷³. Em modelos animais de ELT, o NGF, BDNF e NT3 parecem ser os principais responsáveis pelo brotamento de fibras musgosas ⁶⁷.

O BDNF, que é a neurotrofina mais bem estudada, está difusamente distribuído no SNC, sendo mais expresso em córtex entorrinal e hipocampus, que são áreas envolvidas na geração de crises na ELT^{37; 46}. No hipocampo, a máxima expressão ocorre em células granulares e piramidais do giro denteado, que expressam também trkB³⁷, além de neurônios gabaérgicos na região do hilo^{37; 46}. Além da expressão em neurônios, o BDNF também está presente na micróglia e astrócitos⁴⁶.

O BDNF tem papel no desenvolvimento e manutenção da população neuronal⁴⁶ através da sua atuação na regulação de síntese de proteínas⁶⁹, controlando também transmissão e plasticidade sináptica⁶⁹, porém também parece ter ação catalítica quando ligado ao receptor TrkB⁶⁹. Em algumas regiões, como na região CA1 do hipocampo, o BDNF age aumentando a eficácia das respostas sinápticas, uma forma de LTP ^{68; 69; 71}. Há evidências que este tem atuação apenas nas sinapses ativas, e não nas inativas, sendo secretado localmente em sinapses com transmissão de alta frequência⁶⁸. A transcrição do BDNF é regulada pela atividade neuronal⁶⁸ e este é capaz de regular sua própria liberação, que é realizada por neurônios glutamatérgicos⁶⁹. No entanto, em algumas situações a expressão de mRNA do BDNF aumenta com a ativação de receptores de glutamato (não NMDA) e diminui com a ativação de receptores GABA⁶⁸.

A correlação do BDNF com a epilepsia parece bem estabelecida, uma vez que este atua na modulação da transmissão gabaérgica⁶⁹. Sabe-se que as crises aumentam a expressão de RNAm do BDNF tanto em animais como em humanos

com ELT refrataria ^{46; 71}, e a ligação do BDNF ao TrkB compromete a inibição mediada pelo GABA ⁷¹. Além disso, estudos com animais demonstraram que a injeção crônica de BDNF pode gerar crises⁶⁹. O TrkB tem importante papel na manutenção da inflamação gerada pelo BDNF⁴⁶. O complexo BDNF/TrkB atua também alterando o desenvolvimento axonal, principalmente em giro denteado, hilo e CA3, ocorrendo após crises e outros insultos, em modelos animais, o que parece ser um dos mecanismos da epileptogênese associada ao BDNF ⁴⁶.

A correlação entre os níveis intracerebrais de BDNF e os níveis séricos foi estudada em modelos animais e pareceu ser positiva em dois estudos, apesar de um terceiro não ter observado essa correlação⁴⁶.

Em humanos, o BDNF também é produzido em glândulas endócrinas, sistema respiratório, macrófagos e linfócitos, endotélio vascular e músculo liso. Em estudo com crianças, a concentração plasmática de BDNF parece ser influenciada pelo status hormonal, desenvolvimento puberal, contagem plaquetária e massa corpórea. Porém apesar disso, estudos com adultos sugerem uma possível correlação positiva entre os níveis de BDNF em tecido cerebral e o nível sérico dessa citocina. Já o nível plasmático, seria influenciado pela quantidade de plaquetas⁴⁶, o que não é o caso do nosso estudo.

O NGF, em situações normais, parece ter um papel mais neuroprotetor. Sua afinidade com o TNFr2, que induz a apoptose em algumas situações, é baixa, enquanto com o TrkA é alta, estimulando o crescimento neuroplasticidade sináptica e aumento da sobrevivência celular ⁷⁴. No SNC, sua maior produção e concentração ocorrem no hipocampo, córtex e região fronto basal, regiões de maior expressão de neurônios colinérgicos^{70; 74} e aparentemente é responsável pela maturação da interação entre o hipocampo e as fibras colinérgicas, uma vez que modelos animais que não expressavam NGF não desenvolveram a inervação colinérgica no hipocampo⁷⁰. Durante crises, ocorre aumento tanto do BDNF quanto do NGF nos neurônios do hipocampo^{37; 66}, assim como suas pró moléculas (células imaturas), que também são observadas nos astrócitos⁶⁶. O pró-NGF parece ter uma afinidade alta com o TNFr2 e baixa com o TrkA, que está mais ligado a morte celular, comportamento oposto ao de sua célula madura ⁶⁸.

Poucos estudos em humanos avaliaram o NGF sérico. Peltola *et al* avaliou os níveis séricos e líquóricos de diversas citocinas de 22 paciente que haviam apresentado crises há menos de 24 horas, e 18 controles, e não notou diferença estatística do NGF entre paciente e controles^{64; 75}.

Em relação ao NT3, sabe-se que este tem afinidade tanto pelo TrkA quanto pelo TrkB, apesar de seu receptor primário ser o TrkC⁷³. Enquanto o NGF e o BDNF claramente têm suas concentrações e de seus mRNA aumentadas no hipocampo após crises, o NT3 varia de um modelo para outro⁶⁷. Assim sua concentração e expressão não parecem ter o mesmo comportamento que o BDNF e NGF⁶⁷. Estudos experimentais mostraram que a infusão de NT3 no hipocampo, reduz a expressão do BDNF, além do NGF, TrkA e TrkC, e a injeção de BDNF parece aumentar o NT3⁷³. Ullal *et al* sugere que o NT3 reduz a expressão de TrkA e isso reduziria a síntese de BDNF induzida pelo NGF no hipocampo⁷³. Outro estudo observou que a indução de crises em ratos gera um aumento de BDNF em determinadas regiões do cérebro do rato, incluindo hipocampo e córtex entorrinal, mas não do NT3 e NGF⁷⁶. Já trabalhos que avaliaram a concentração hipocampal das neurotrofinas mais a longo prazo (em 4, 45 e 120 dias após crises), observaram um aumento mais tardio do NT3 (45 dias) em um período em que o BDNF já não estava mais sendo expresso (que só estava elevado na medida no 4º dia). Além disso, a maior ocorrência do brotamento de fibras musgosas ocorreu entre 45 e 120 dias, provavelmente correlacionadas com o NT3 e NGF⁷², demonstrando o provável papel desses na epileptogênese. Um estudo realizado com 50 hipocampus humanos, sendo 40 de pacientes com ELT submetidos à cirurgia de epilepsia e 10 controles (necropsia por mortes de outras causas) também concluiu que o NGF parece ter maior correlação com BFM enquanto o BDNF e o NT3 não⁶⁷.

A NT4/5 realmente é pouco estudada e não parece ter grande expressão na epilepsia. Na evolução o NT4/5, por também se ligar ao TrkB, assim como o BDNF, parece ter função redundante a esse e por isso sua expressão foi sendo reduzida ao longo da evolução³⁵. Em modelos animais de crises o NT4/5 parece ter pouca expressividade⁷⁷ e não estar envolvido na epileptogênese⁷⁸.

Em relação aos nossos resultados, os níveis séricos das neurotrofinas foram aumentados em pacientes em relação aos controles tanto considerando todas

as epilepsias, quanto só nos pacientes com ELT, outras etiologias ou com malformações corticais, exceto o NT4/5 que não se mostrou diferente em pacientes e controles. As neurotrofina também não se mostraram diferentes entre os pacientes com epilepsias genéticas generalizadas e controles, talvez pelo menor número de pacientes, porém podemos inferir que pode ser pela via de ativação das epilepsias generalizadas, que nem sempre envolve a região hipocampal ou córtex entorrinal.

Além disso, o BDNF também se demonstrou elevado em pacientes com crises frequentes, enquanto que o NT3 foi reduzido nesses pacientes. Nenhum deles apresentou diferença significativa quando avaliamos os pacientes com crises nas últimas 24 horas. Corroborando com nossos dados, estudos demonstraram que em modelos animais de crises, houve aumento da expressão de mRNA de BDNF e TrKB, além de NGF, e redução de NT3³⁷. Em relação ao momento em que ocorre a elevação do BDNF, alguns estudos notaram que o aumento máximo de BDNF após as crises foi em 12h em giro denteado e 24h em CA3³⁷, o que pode justificar o porquê dos níveis séricos ainda não estarem alterados nos pacientes que referiram crises no último dia em nosso estudo, apesar de que a coleta não foi controlada para esse fato.

Já estudos em humanos apresentam resultados controversos. Um estudo com 34 pacientes asiáticos com ELT, sendo 11 com AHs bilaterais e 23 unilaterais notou menores níveis séricos de BDNF nos pacientes, principalmente nos com AH bilateral, que apresentavam maior frequência de crises e uma relação negativa com a duração da epilepsia⁷⁹. Outro estudo com população asiática, com maior número de pacientes, 135 com diagnóstico de epilepsia, de diversas etiologias (38 idiopáticas, 15 sintomáticas e 83 criptogênicas), não notou diferença entre pacientes e controles⁸⁰. Observou-se também correlação negativa com a duração da epilepsia e a frequência de crises, além de diferença da concentração de BDNF entre homens e mulheres, sendo maior em homens. Um estudo com apenas 15 pacientes com epilepsia, 12 pacientes com episódios paroxísticos não epilépticos e 17 controles, observou níveis séricos aumentados nos controles quando comparados aos dois grupos de pacientes⁸¹

O NGF apresentou correlação inversa com a amígdala contralateral dos pacientes com ELT-AH, apesar de não ter sobrevivido à correção do FDR. Apesar

disso, possivelmente esse fator esteja envolvido na perda neuronal difusa, principalmente nas alterações estruturais da via límbica contralateral.

Assim, o BDNF, o NGF e o NT3 estão relacionados com a epilepsia, sendo que a ação conjunta desses contribui para modular o BFM e a plasticidade sináptica, possivelmente atuando tanto na epileptogênese como na manutenção da epilepsia. O BDNF, por atuar mais nas sinapses ativas, durante as crises deve ter maior ação nessas sinapses, principalmente quando ligado ao TrKB assumindo um papel mais catalítico, e por isso estaria elevado nos pacientes com maior frequência de crises, que apresentam maiores danos neuronais. Já o NT3 parece ter papel de tentar controlar a inflamação local, sendo por isso elevado nos pacientes com epilepsia, porém, diminuído em relação aos que apresentam crises mais frequentes, a nível sérico. Já NGF parece ter correlação no achado remoto de perda neuronal do circuito límbico e nem tanta participação na inflamação ativa vigente. Como estudos sugerem que o pró-NGF tem maior papel na apoptose e lesão celular, o NGF pode ser um marcador sérico da atividade da sua pró molécula, mas são necessários estudos específicos para elucidar essas interpretações.

7.3 IL1 β

A família da IL1 consiste em 11 citocinas, sendo que a mais relevante é a IL1 beta (IL1 β)³³, que é avaliada nesse estudo. Os estudos geralmente focam na IL1 β pois ela e a IL1 alfa exibem sequências bastante homólogas com papéis semelhantes³³.

A IL1 β está envolvida no aumento da excitabilidade. Ela aumenta a liberação de glutamato pelos astrócitos e reduz a recaptação deste, aumentando assim sua concentração e atividade. Além disso ela tem papel na redução da neurotransmissão do GABA, também aumentando a excitabilidade neuronal e, secundariamente, aumentando a predisposição a crises. Além disso, a IL1 β atua na maior expressão do receptor NMDA na célula, estando assim envolvida na plasticidade sináptica, o que pode gerar a disfunção neuronal, que sabidamente ocorre nos pacientes com epilepsia^{55; 82}. A IL1 β parece ter uma ação modulatória no hipocampo, promovendo LTP³³.

Em nosso estudo, a IL1 β foi elevada na comparação de pacientes com ELT e outras epilepsias em relação aos controles, mas não houve diferença

significativa entre outras formas de epilepsia e controles. A IL1 β foi a citocina com menor número de indivíduos avaliados, assim esse pode ter sido um viés. Por exemplo não havia pacientes com epilepsias genéticas generalizadas e com dosagem de IL1 β . A IL1 β também não pareceu estar envolvida com nenhum dos fatores clínicos e de imagem, sendo assim apenas um marcador para epilepsia.

Corroborando nossos achados, um estudo com 70 pacientes e 68 controles demonstrou nível de IL1 β sérico elevado nos pacientes, mas sem alterações em relação a outros parâmetros como frequência de crises, FAEs utilizados, duração de doença e a gravidade de doenças⁸³. Uludag *et al.* e Sinha *et al.* também apresentaram resultados semelhantes^{31; 84}. Porém Bauer *et al.* e Gao *et al.* avaliando 25 e 48 pacientes, respectivamente, com epilepsias de diversas etiologias, não notaram diferenças das concentrações séricas de IL1 entre pacientes e controles^{59; 62}. Estudos que avaliaram a IL1 β no período pós ictal, não encontraram diferenças nos níveis séricos de IL1 β ^{59; 64; 85}. Apenas Sinha *et al.* 2008 notou aumento de IL1 β avaliando 100 pacientes (primeira crise ou com epilepsia) no pós ictal em relação a 100 controles³¹. Exceto esse último trabalho, os demais e o nosso estudo demonstram que a IL1 β parece ter papel na epilepsia, aumentando a excitabilidade neuronal, mas não apenas no período com crises ou influenciando a frequência dessas.

É importante lembrar que muitas vezes os marcadores inflamatórios têm papéis indiretos na inflamação. Apesar de não termos encontrado mais correlações com a IL1, sabemos que ela é essencial na ativação da HMGB1 (*High mobility group box protein 1*). Esta é uma proteína liberada quando ocorre dano / inflamação celular. Para iniciar sua resposta pró-inflamatória mediada pelo receptor TLR4, a HMGB1 se liga a IL1 e a lipopolissacarídeos, e assim estimula a produção de TNF α , IL6, IL8 e a da própria IL1 por macrófagos e monócitos, como esquematizado na figura 16⁸⁶. A HMGB1 parece ter importante papel na epileptogênese e no distúrbio cognitivo. Para aprofundar sobre mais esse fator inflamatório, realizamos uma revisão que está disponível no anexo 4.

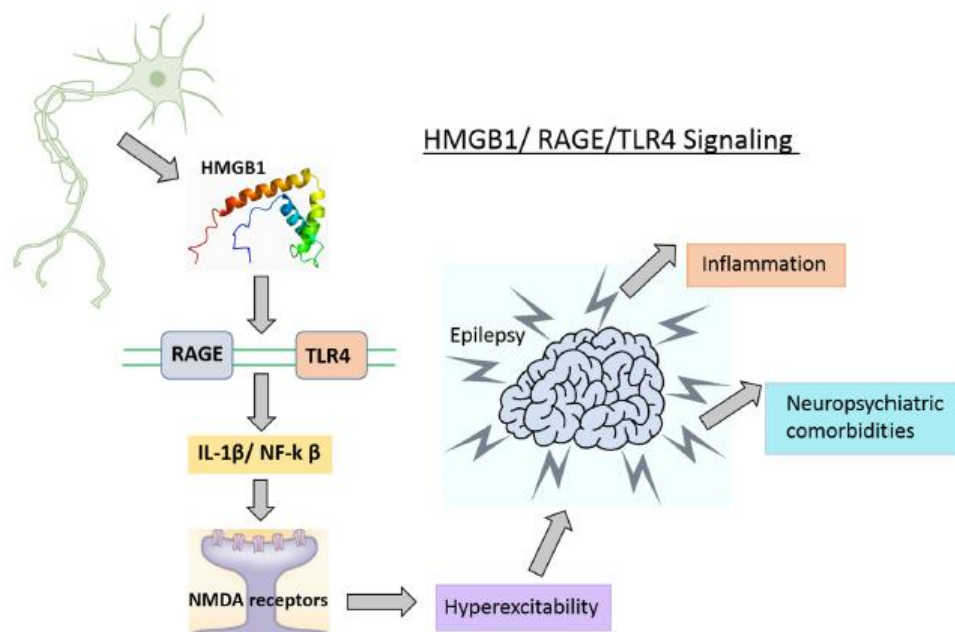


Figura 16: Interação entre a HMGB1 e a IL1 no desencadeamento da hiperexcitabilidade neuronal - Adaptada de Paudel et al⁸⁶

Assim a IL1 tem papel na epilepsia e é um possível marcador desta, provavelmente atuando no aumento da excitabilidade neuronal e intermediando outras vias e neuroinflamação.

7.4 Interleucinas 2, 4, 17 e IFN γ

As interleucinas 2, 4 e 17, junto com o IFN γ , fazem parte do grupo de citocinas que regulam preferencialmente a imunidade adaptativa, aquela que depende da ação linfocitária³⁰. A interação entre essas é demonstrada na figura 17.

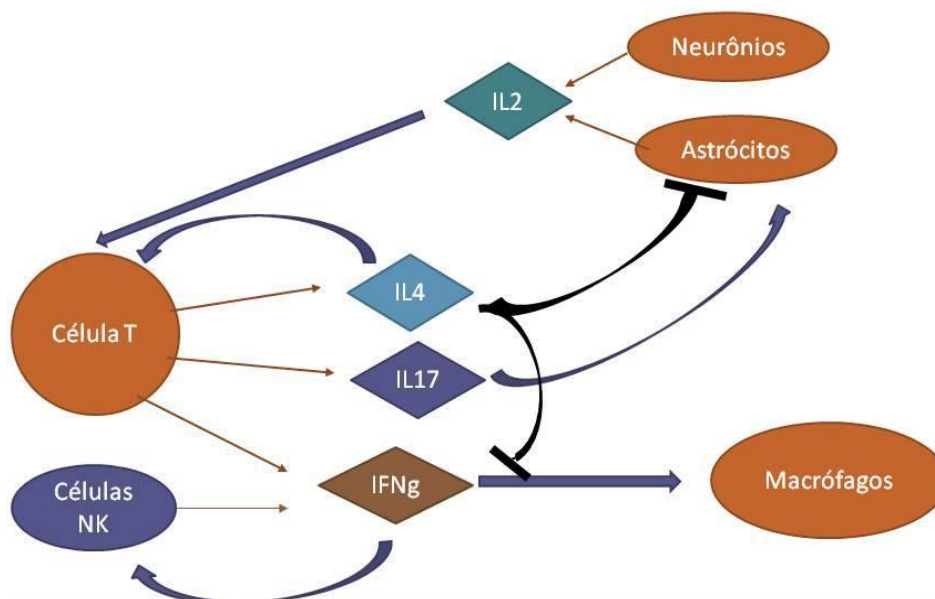


Figura 17: Interação IL2, IL4, IL17 e IFN γ e suas células produtoras. A seta com ponta significa estimulação e a seta sem ponta, inibição.

O IFN γ tem também ação na resposta inata, além da adaptativa mediada por células. É a principal citocina ativadora de macrófagos. É produzida por linfócitos T, após estímulo pela IL12, e pelas células NK, quando estimuladas pelo IL2. O IFN γ , num feedback positivo, é capaz de estimular a ação citolítica das células NK. A IL17 também é produzida pelas células T ativadas³⁰ tem papel na inflamação ativando neutrófilos e astrócitos, e assim estimulando a produção de IL6, IL1 e TNF α ^{30; 87}. Além disso, a IL17 parece ter papel direto no dano neuronal quando ligada ao seu receptor (IL17r)⁸⁷.

Já a IL4 é uma interleucina pleiotrópica, ou seja, é capaz de agir em diversos tipos celulares. Esta é derivada da célula T e é responsável por regular diversas respostas imunes, principalmente a resposta Th2, além de induzir o crescimento dos linfócitos T e aumentar sua atividade citolítica e antagonizar os efeitos da IFN γ sobre os macrófagos^{30; 88}. A IL4 induz o crescimento de células endoteliais e fibroblastos e inibe proliferação de astrócitos. A proliferação e hipertrofia de astrócitos gera gliose, e costuma ser induzida pela IL1 β IFN γ e TNF α . Assim, o IL4 parece contrabalancear a atividade das citocinas inflamatórias⁸⁸.

A IL2, assim como a IL4, é conhecida por ser um fator de crescimento da célula T, sendo responsável pela expansão clonal destas. Além disso, dependendo

do estímulo, pode induzir à produção de outras citocinas, como o IL4 e o IFN γ ³⁰. Apesar de seu papel predominantemente neuroprotetor, a IL2 tem importância na inflamação e epilepsia. Produzida por neurônios e astrócitos de maneira difusa, sua produção já foi relacionada a perda de SB³⁹. Acredita-se que o IL2 permite a infiltração de linfócitos T no tecido cerebral e tenta proteger estes da apoptose e assim contribuindo para o estado inflamatório³⁹. Estudos em modelos animais comprovam a atuação da IL2 na epileptogênese. A injeção intraventricular dessa em modelos animais foi capaz de gerar crises enquanto a injeção de altas doses desencadeou atividade epileptiforme recorrente³⁹.

Em tecidos humanos, Guo *et al.*, demonstraram maior expressão de mRNA do IL2 em córtex temporal e em tecidos com DCF de pacientes submetidos a cirurgia de epilepsia em relação ao córtex normal, não havendo diferença entre DCF e córtex de ELT³⁹. Além do mais, a concentração era ainda mais elevada em pacientes com DCF tipo II em relação ao tipo I³⁹. Como esta interleucina tem efeito neuroprotetor, aumentando a viabilidade e sobrevivência de neurônios corticais, provavelmente ela protege as células malformadas da morte celular em lesões como DCF³⁹. Receptores de IL17 também já foram encontrados em maiores concentrações em tecido ressecado de DCF, no caso do tipo Ia, IIa e IIb⁸⁷. Avaliando tecidos humanos de pacientes com ELT, Strauss *et al.* avaliou o hipocampo, córtex entorrinal e córtex temporal de 58 pacientes com ELT submetidos a cirurgia de epilepsia além do tecido de 4 pacientes sem epilepsia. Observou-se que as concentrações locais de TNF α , IL2, IL4, e IL-17A eram aumentadas no hipocampo dos pacientes, sendo que o IFN γ estava presente em apenas 10 pacientes⁴⁵. As correlações entre os fatores inflamatórios eram diferentes entre as regiões sugerindo que a regulação deles é local, como por exemplo o IL17, que apresentou maior concentração no hipocampo, parece ter efeito sinérgico com o TNF α , IL1 β e IFN γ ⁴⁵.

Alguns estudos em humanos já tentaram correlacionar a epilepsia com esses marcadores. IL17 e IFN γ séricos foram elevados em 70 pacientes com epilepsia, sendo que a IL17 também esteve relacionada com a frequência de crises dos pacientes⁸³. Gao *et al.* encontrou níveis séricos aumentados de IL6, IL17 e IFN γ em 48 pacientes com epilepsia, e também notou a relação da IL17, além do IFN γ com a frequência de crises⁵⁹. O estudo ENIGMA, do qual também participamos, também avaliou alterações genéticas relacionadas à expressão do IFN γ com a frequência de crises, demonstrando que a resposta mediada pelas células da glia,

podem influenciar no fenótipo das epilepsias, sendo mais responsivas ou refratárias⁸⁹.

Sinha *et al.* avaliou o nível sérico de marcadores no período pós ictal e, dos 100 pacientes avaliados, apenas 22 apresentavam níveis séricos detectáveis de IL2 e IL4 e 20 de IFN γ ³¹.

Um estudo com 16 pacientes com diagnóstico de ELT e 13 controles evidenciou que os pacientes apresentaram redução das células T CD8 que expressavam IFN γ , TNF, IL17 e IL4 enquanto não houve diferença entre as T CD8 que expressavam IL2, IL8 e IL10. O autor teoriza a possibilidade de que ocorra migração de células TCD8 para as regiões cerebrais e por isso ocorreria a redução da concentração sérica destas⁹⁰.

Em contrapartida a diversos desses resultados, nosso estudo demonstrou redução sérica de IFN γ , IL2, IL4 e IL17 nos pacientes com ELT ou outras etiologias em relação aos controles. Encontramos ainda o mesmo padrão ao avaliarmos apenas os pacientes com malformação do desenvolvimento cortical. Apenas a IL 2 e a IL17 foram reduzidas na análise com epilepsias generalizadas. Curiosamente observamos que apenas as IL2 e IL4 estavam aumentadas nos pacientes com maior frequência de crises, e não a IL17 e o IFN γ conforme estudos previamente citados, porém os critérios de frequência não foram os mesmos. A IL17, junto com a IL6, foram as únicas a apresentarem diferenças entre grupos, com níveis mais elevados em pacientes com ELT em relação àqueles com outras etiologias.

Nas análises de imagem o IFN γ apresentou relação inversa com o volume com caudado contralateral à AH e com o lobo frontal ipsilateral. Apesar de esses dois dados não terem sobrevivido à correção do FDR, acreditamos que sejam relevantes. O menor volume do lobo frontal nos pacientes com ELT já foi demonstrado nos dois estudos de imagem citados^{21; 26}, porém o lobo caudado contralateral, não foi um achado dos estudos transversais, mas sim da análise longitudinal dos pacientes benignos do trabalho no anexo 3²⁶. Mais uma vez é importante pontuar que os achados de imagem se referem a um achado remoto. A correlação com os marcadores com a frequência de crises é relacionada a uma inflamação vigente.

Além disso o IFN γ foi elevado no grupo de pacientes ELT com antecedente familiar positivo, sugerindo que essa molécula atue numa inflamação mais crônica nos pacientes.

Apesar do IL2, IL4, IL17 e IFN γ terem papéis distintos na inflamação, a nível sérico, todos se demonstraram reduzidos nos pacientes em relação aos controles. O IFN γ denota importância na inflamação remota desses pacientes, uma vez que associado à redução do volume cerebral em algumas áreas pelo fato de ser maior nos pacientes com antecedente familiar, resultando assim em uma provável influência genética da produção deste. O IL2 e IL4, que parecem ter um papel mais protetor das células, apesar de colaborarem com a inflamação local, aparecem elevados com a maior frequência de crises dos pacientes. Todos esses fatores são mediadores da resposta imune adaptativa e assim podemos concluir que os linfócitos também participam da inflamação local que ocorre na epilepsia, tanto relacionados com a frequência de crises dos pacientes como com a possível perda neuronal que ocorre com estas. Esses marcadores se autorregulam localmente e são influenciados por outros mecanismos, principalmente a nível sérico, e por isso devem apresentar resultados conflitantes em diversos estudos. A interação entre esses é complexa, e essa tese não é capaz de explicar totalmente esse processo.

7.5 IL 6 e IL10

A IL6 e a IL10 participam preferencialmente da resposta imune inata, e têm por vezes ações opostas. A IL6, que é considerada uma interleucina pró inflamatória na maioria das situações, é produzida após estimulação de astrócitos e micróglia e se apresenta em pequenas quantidades no SNC. Sua produção aumenta com a concentração de outras citocinas, como IL1 β , IL17, TNF α e IFN γ ⁸². Apesar de ser considerada uma citocina pro inflamatória, o IL6 tem função de reduzir a LTP, tendo assim um papel contrário ao BDNF, diminuindo a eficácia das respostas sinápticas e a neurogênese no hipocampo, aumentando a gliose local, o que também demonstra sua importância na epileptogênese⁸². Estudos animais demonstraram que a IL6 tem passagem pela placenta e a exposição a doses elevadas de IL6 no período pré-natal levou a perda neuronal hipocampal além de maior expressão de IL6 no hipocampo e na circulação, e ainda afetar no aprendizado dos camundongos⁹¹. A IL6 prolonga o tempo de crise em estudos experimentais³² e parece aumentar em insultos neurológicos, e também estar relacionada com o dano neuronal, porém modelos animais que não produziam IL6 apresentavam maior susceptibilidade a crise, demonstrando que a relação com as

crises não é tão trivial⁹². Um estudo com hipocampos de humanos demonstrou que a IL6 foi maior nos hipocampos dos controles que nos pacientes ELT submetidos à cirurgia. (Strauss 2016)

A IL10, assim como a IL6, é uma citocina da imunidade inata, mas que também têm relevância na resposta adaptativa. Esta é um inibidor de macrófagos e células dendríticas, sendo assim uma ação mais anti-inflamatória. Ela é produzida majoritariamente por linfócitos e macrófagos, sendo que nesse último age realizando um *feedback* negativo, regulando a ação deste. A IL10 também inibe as células apresentadoras de antígenos⁹³ e a IL12, umas das principais interleucinas que estimulam a produção de IFN γ ³⁰. Estudos em animais já demonstraram essa ação anti-inflamatória na epilepsia. A IL10 reduziu a presença de crises em modelos de hipóxia em hipocampos animais.

Estudos em humanos encontraram IL6 sérica elevada nos pacientes em relação a controles em epilepsias de diversas etiologias^{61; 62; 84}, epilepsias generalizadas⁶¹, e no pós ictal^{31; 59} (42), mas alguns não encontraram diferença nos pacientes com ELT⁸⁴ ou em pacientes com ou sem EH⁶². Níveis séricos de IL10 não foram diferentes entre pacientes com epilepsia e controles e nem teve relação com a frequência de crises no estudo de Gao *et al.*, aqui já citado⁵⁹. Tais resultados não são compatíveis com os nossos, em que os pacientes apresentaram níveis séricos de IL6 e IL10 reduzidos em relação aos controles nos grupos ELT e em epilepsias de outras etiologias. Apenas o IL6 também foi reduzido nas epilepsias generalizadas e com malformações do desenvolvimento corticais. Além disso, nas comparações entre grupos, a IL6 foi maior no grupo ELT quando comparado ao grupo de outras epilepsias.

Quando avaliamos apenas os pacientes, a IL10 se apresentou, junto com o BDNF, IL2 e IL4, com níveis séricos elevados nos pacientes com maior frequência de crises.

Outro achado interessante foi a correlação negativa da IL6 em relação ao lobo frontal ipsilateral, junto com o IFN γ , sendo que, como citado, a IFN γ tem influência na liberação da IL6. Como já dito, a IL6 parece estar envolvida na perda neuronal, e sabemos que os pacientes com ELT apresentam atrofia de diversas regiões, inclusive lobo frontal^{21; 26}. Além disso, o gene da IL6 e seus níveis séricos já foram relacionados com depressão maior⁹⁴, patologia associada também a

alterações estruturais em lobo frontal^{94; 95}, inclusive em pacientes com ELT⁹⁵. Assim, apesar de após correção pelo FDR a IL6 não ter sido significativa, a sua tendência a estar relacionada com a perda neuronal em lobo frontal parece ser justificável e deve ser melhor estudada em pesquisas futuras.

A impressão é de que o IL6 tenha importância na epileptogênese e influenciando na gliose e perda neuronal, com provável maior ação em lobo frontal, porém suas concentrações séricas reduzidas em pacientes com epilepsia. No entanto, entre pacientes, ela é aumentada nos pacientes com ELT que nas demais epilepsias. Como a concentração da IL6 é muito influenciada pela produção de outros fatores inflamatórios, podendo assim ter suas concentrações alteradas por diversas outras vias inflamatórias, dificultando assim a sua interpretação. Já o IL10, nos pacientes parece ter ação na inflamação vigente, uma vez que está elevado nos pacientes com maior frequência de crises, e reduzido nos pacientes em relação aos controles.

7.6 GDNF

O GDNF é um fator neurotrófico que foi inicialmente descrito como fator de sobrevivência de neurônios colinérgicos. Estudos já demonstraram aumento de seu RNAm em regiões de hipocampo após crises em modelos animais⁹⁶, porém sua ação parece ser suprimir a atividade nas crises^{20; 96}. Um estudo com modelo animal sugere inclusive que o GDNF estaria envolvido na via que preserva o hipocampo contralateral nos modelos de ELT⁹⁷. Em nosso estudo o GDNF não se mostrou diferente entre os pacientes e controles com epilepsia, porém quando avaliamos apenas os pacientes observamos que este fator tem correlação inversa com o tálamo ipsilateral, apesar de ter sido uma relação não tão importante, ($r = -0,301$), isso além de não ter sobrevivido ao FDR, podendo representar um achado aleatório. Porém encontramos também que os pacientes com pouca AIE ao EEG apresentavam GDNF mais elevado do que os com maior atividade. Não encontramos estudos que avaliassem os níveis séricos ou tecidos de humanos. Provavelmente o GDNF tem função local na epilepsia que não foi identificado a nível sérico nos pacientes, no entanto ele foi significativamente maior no grupo de pacientes com menor quantidade de atividade epileptiforme, o que pode significar uma ação protetora deste, assim como sugerem os estudos com ratos sugerem.

7.7 CNTF

O CNTF foi originalmente isolado como uma neurotrofina, mas descobriu que este apresenta muitas ações em diferentes tipos de neurônios. Um dos papéis do CNTF é aumentar a sobrevivência de oligodendrócitos maduros e imaturos⁹⁸. Em um modelo animal com hipocampus, o GDNF parece ter tido função anti-epileptogênese⁹⁹. Em nosso estudo o CNTF não se mostrou diferente entre pacientes e controles. Assim acreditamos que este não tenha uma relação clara com a epilepsia.

7.8 Calcificações

Nosso estudo demonstrou que pacientes com calcificações apresentavam concentrações séricas menores de BDNF, IL10 e IL17 do que os que não as tinham, sendo que esses dados não estavam correlacionados com a frequência de crises.

Sabe-se que a forma vesicular da neurocisticercose na fase aguda é circundada por células NK, macrófagos, granulócitos e linfócitos T. Na fase do granuloma esse infiltrado tem ainda concentrações aumentadas de macrófagos e células da glia além de citocinas pró inflamatórias, como a IL17. A IL10 parece ter atividade no controle da resposta inflamatória diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativando células T reguladoras para controlar o dano tecidual¹⁰⁰.

A nível periférico, um estudo que avaliou 6 pacientes com neurocisticercose ativa, antes do tratamento medicamentoso e avaliou IL2, IL4, IL5, IL6, IL17A, IL17F, IL10, IL35 não notou diferença estatística entre os grupos, a não ser no nível sérico reduzido de IL6 nos pacientes resistentes ao tratamento¹⁰¹. Um outro estudo do mesmo autor avaliou amostras de sangue de 20 pacientes com neurocisticercose ativa e 16 controles, além de LCR de 11 pacientes encontrou maior concentração de IL10 periférica, mas não no LCR¹⁰². Já um outro estudo que analisou a concentração de IL1 β , TNF α , IL5, IL10 e IFN γ no LCR de 22 pacientes com forma ativa de neurocisticercose, 13 com a forma inativa e 15 controles. Nesses, a IL5 e a IL10 foram maiores nos pacientes com a forma ativa que apresentavam LCR com aumento de células e proteínas¹⁰³. Não se tem relatos do papel do BDNF na neurocisticercose.

Todos nossos pacientes apresentavam ELT com EH, e o papel da IL17, IL10 e BDNF nesses casos já foi explorado. Assim provavelmente a IL10 e IL17, que tem funções antagônicas, têm papel no controle da neurocisticercose nesses pacientes, porém a exata função na fase crônica e inativa da doença deve ser

melhor elucidada e não pode ser explicada pelos achados desta tese. Além disso nosso estudo abre portas para futuras investigações do papel do BDNF nessa fase crônica da doença, podendo estar relacionada com o possível desenvolvimento da atrofia hipocampal associada a neurocisticercose.

8. LIMITAÇÕES

Esse trabalho é um estudo retrospectivo com caráter exploratório, que avaliou 16 fatores inflamatórios, 12 áreas corticais e 12 regiões subcorticais, além dos parâmetros clínicos de frequência de crises, EEG, presença de calcificações, antecedentes entre outros, o que gerou grande quantidade de dados. A consequência disso foi a correção severa que nossos resultados sofreram devido as múltiplas comparações. Para não correremos o risco de perder dados relevantes devido a correção estatística e nem valorizar achados que poderiam ser fortuitos, discutimos cada achado com base no conhecimento atual que se tem desses marcadores, porém devemos lembrar que poucos desses achados foram significativos após as correções.

Outra limitação é avaliação de alguns parâmetros que foram pouco controlados. A análise dos EEGs foi realizada com base na existência ou não de AEI nos laudos, a atividade não foi quantificada em cada exame. A presença de crises antes da coleta foi a referida pelos pacientes, e não foi realizada monitorização antes da coleta. As comorbidades não foram excluídas.

Devemos lembrar também que nem todas as análises incluíram todos os pacientes, e que a grande parte deles era ELT com poucos representantes dos outros tipos de epilepsia, porém mesmo assim a nossa amostra era maior do que já apresentado nos estudos citados.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os maioria dos marcadores inflamatórios aqui avaliados apresentam claramente papel na inflamação associada à epilepsia. Nesse estudo, surpreendentemente, encontramos níveis séricos reduzidos de interleucinas, TNF e sTNFr1 nos pacientes e notamos que a compreensão da interrelação desses fatores

é essencial para a interpretação desses achados. Além disso, o TNF e seus receptores foram fatores que se destacaram nas análises, apesar de serem pouco estudados em relação à epilepsia.

O processo de inflamação apresenta diversas fases e atua de diversas maneiras corroborando com a epilepsia, seja no momento da epileptogênese, na perda neuronal, na manutenção da hiperexcitabilidade que promove crises ou induz atividade epileptiforme ao EEG, seja na resposta a medicações. Também não conseguimos avaliar se a inflamação observada é causa ou consequência das crises. As inter-relações entre esses marcadores ocorrem claramente a nível celular, porém não sabemos a exata função e nem a interação desses na circulação. A análise da inflamação indireta (marcadores circulantes) é uma visão do que está ocorrendo depois de um insulto muito intenso (que obviamente envolveu inflamação intensa como demonstra os estudos experimentais). Esta inflamação atual é diferente em intensidade e qualidade, e por isso os resultados são conflitantes em relação a modelos animais, mas pode ser um marcador biológico interessante.

O conhecimento da função desses marcadores fora do SNC é de extrema importância uma vez que na circulação eles são de fácil acesso e podem auxiliar a melhor conduzir os pacientes com epilepsia. Dessa maneira, nosso estudo contribui no - ainda limitado - conhecimento da inflamação na epilepsia e ainda fornece dados para que futuros estudos possam avaliar os dados de maneira mais específica. Nosso intuito com o estudo está longe de conseguir explicar o papel e comportamento das citocinas e fatores neurotróficos na circulação periférica dos pacientes com epilepsia, mas sim levantar ideias para novos caminhos de pesquisa para melhor compreensão dessa doença.

10. CONCLUSÕES

1. Os marcadores inflamatórios apresentam concentrações séricas diferentes entre indivíduos com e sem epilepsia: níveis séricos de BDNF, NGF, sTNFr2 e NT3 estão elevados, enquanto que os níveis de TNF α , sTNFr1, IFN γ e das interleucinas estão reduzidos em pacientes com epilepsias e esse mesmo padrão ocorre em um grupo homogêneo de pacientes com ELT.

2. Em pacientes com ELT, o TNF sérico apresenta correlação inversa com o volume do tálamo ipsilateral à AH.
3. Em pacientes com ELT, a IL2 e a IL4 estão elevadas nos pacientes com maior frequência de crises.
4. Em pacientes com ELT, o GDNF é mais elevado em pacientes com pouca atividade epileptiforme ao EEG.
5. O sTNFr2 é um bom marcador para diferenciar pacientes com epilepsias de controles.

REFERÊNCIAS

1. World_Health_Organization. Epilepsy, 2018: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/epilepsy>. Accessed December, 2018.
2. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun* 2008;22:797-803.
3. Noronha AL, Borges MA, Marques LH, et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia* 2007;48:880-885.
4. Nogueira MH, Yasuda CL, Coan AC, et al. Concurrent mood and anxiety disorders are associated with pharmaco-resistant seizures in patients with MTLE. *Epilepsia* 2017;58:1268-1276.
5. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:475-482.
6. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017;58:512-521.
7. Engel J, Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 2001;7:340-352.
8. Golyala A, Kwan P. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. *Seizure* 2017;44:147-156.
9. Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007;7:348-354.
10. Walter G Bradley RBD, Gerald M. Fenichel, Joseph Jankovic. Neurology in Clinical Practice. Elsevier: Philadelphia, PA; 2008.
11. Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat* 2012;2012:630853.
12. Lachos J, Zattoni M, Wieser HG, et al. Characterization of the gene expression profile of human hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res Treat* 2011;2011:758407.
13. Blumcke I, Thom M, Aronica E, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013;54:1315-1329.
14. Mumoli L, Labate A, Vasta R, et al. Detection of hippocampal atrophy in patients with temporal lobe epilepsy: a 3-Tesla MRI study. *Epilepsy Behav* 2013;28:489-493.
15. Wieser HG, Epilepsy ICoNo. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004;45:695-714.
16. Engel J, Jr. Surgery for seizures. *N Engl J Med* 1996;334:647-652.
17. Blumcke I, Spreafico R. Cause matters: a neuropathological challenge to human epilepsies. *Brain Pathol* 2012;22:347-349.
18. Alvim MKM, Morita ME, Yasuda CL, et al. Is inpatient ictal video-electroencephalographic monitoring mandatory in mesial temporal lobe epilepsy with unilateral hippocampal sclerosis? A prospective study. *Epilepsia* 2018;59:410-419.
19. Adams B, Sazgar M, Osehobo P, et al. Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci* 1997;17:5288-5296.
20. Simonato M, Tongiorgi E, Kokaia M. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:631-638.
21. Whelan CD, Altmann A, Botia JA, et al. Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study. *Brain* 2018;141:391-408.
22. Labate A, Cerasa A, Aguglia U, et al. Voxel-based morphometry of sporadic epileptic patients with mesiotemporal sclerosis. *Epilepsia* 2010;51:506-510.
23. Coan AC, Campos BM, Yasuda CL, et al. Frequent seizures are associated with a network of gray matter atrophy in temporal lobe epilepsy with or without hippocampal sclerosis. *PLoS One* 2014;9:e85843.
24. Coan AC, Appenzeller S, Bonilha L, et al. Seizure frequency and lateralization affect progression of atrophy in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2009;73:834-842.

25. Bilevicius E, Yasuda CL, Silva MS, et al. Antiepileptic drug response in temporal lobe epilepsy: a clinical and MRI morphometry study. *Neurology* 2010;75:1695-1701.
26. Alvim MK, Coan AC, Campos BM, et al. Progression of gray matter atrophy in seizure-free patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2016;57:621-629.
27. Sorel L, Dusaucy-Bauloye A. [Findings in 21 cases of Gibbs' hypsarrhythmia; spectacular effectiveness of ACTH]. *Acta Neurol Psychiatr Belg* 1958;58:130-141.
28. Rogawski MA, Loya CM, Reddy K, et al. Neuroactive steroids for the treatment of status epilepticus. *Epilepsia* 2013;54 Suppl 6:93-98.
29. Silveira G, de Oliveira AC, Teixeira AL. Insights into inflammation and epilepsy from the basic and clinical sciences. *J Clin Neurosci* 2012;19:1071-1075.
30. Abul K. Abbas AHL. *Imunologia Celular*. Elsevier; 2005.
31. Sinha S, Patil SA, Jayalekshmy V, et al. Do cytokines have any role in epilepsy? *Epilepsy Res* 2008;82:171-176.
32. Liimatainen S, Fallah M, Kharazmi E, et al. Interleukin-6 levels are increased in temporal lobe epilepsy but not in extra-temporal lobe epilepsy. *J Neurol* 2009;256:796-802.
33. Arisi GM. Nervous and immune systems signals and connections: cytokines in hippocampus physiology and pathology. *Epilepsy Behav* 2014;38:43-47.
34. Hauser SL. *Neurologia Clínica de Harrison: Porto Alegre*; 2015.
35. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:3-15.
36. Rosa DV, Rezende VB, Costa BS, et al. Circulating CD4 and CD8 T cells expressing pro-inflammatory cytokines in a cohort of mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2016;120:1-6.
37. Binder DK, Croll SD, Gall CM, et al. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 2001;24:47-53.
38. Altmann A, Ryten M, Di Nunzio M, et al. A systems-level analysis highlights microglial activation as a modifying factor in common forms of human epilepsy. *bioRxiv* 2018:470518.
39. Guo W, Zheng DH, Sun FJ, et al. Expression and cellular distribution of the interleukin 2 signaling system in cortical lesions from patients with focal cortical dysplasia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014;73:206-222.
40. van Vliet EA, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Semin Cell Dev Biol* 2014.
41. Lehtimäki KA, Keränen T, Huhtala H, et al. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. *J Neuroimmunol* 2004;152:121-125.
42. Yamamoto A, Schindler CK, Murphy BM, et al. Evidence of tumor necrosis factor receptor 1 signaling in human temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2006;202:410-420.
43. Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, et al. Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol* 2013;244:11-21.
44. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 2015;56:1515-1523.
45. Strauss KI, Elisevich KV. Brain region and epilepsy-associated differences in inflammatory mediator levels in medically refractory mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuroinflammation* 2016;13:270.
46. Iughetti L, Lucaccioni L, Fugetto F, et al. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides* 2018;72:23-29.
47. Takayanagui OM, Leite JP. [Neurocysticercosis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34:283-290.
48. Nash T. Edema surrounding calcified intracranial cysticerci: clinical manifestations, natural history, and treatment. *Pathog Glob Health* 2012;106:275-279.
49. Velasco TR, Zanello PA, Dalmagro CL, et al. Calcified cysticercotic lesions and intractable epilepsy: a cross sectional study of 512 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:485-488.

50. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, et al. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 2006;31:968-980.
51. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* Lawrence Erlbaum Associates United State of America; 1988.
52. Diez-Ruiz A, Tilz GP, Zangerle R, et al. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur J Haematol* 1995;54:1-8.
53. Balosso S, Ravizza T, Perego C, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol* 2005;57:804-812.
54. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117:244-279.
55. Teixeira AL, de Sousa RT, Zanetti MV, et al. Increased plasma levels of soluble TNF receptors 1 and 2 in bipolar depression and impact of lithium treatment. *Hum Psychopharmacol* 2015;30:52-56.
56. Shandra AA, Godlevsky LS, Vastyanov RS, et al. The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats. *Neurosci Res* 2002;42:147-153.
57. Ashhab MU, Omran A, Kong H, et al. Expressions of tumor necrosis factor alpha and microRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci* 2013;51:950-958.
58. Weinberg MS, Blake BL, McCown TJ. Opposing actions of hippocampus TNFalpha receptors on limbic seizure susceptibility. *Exp Neurol* 2013;247:429-437.
59. Gao F, Gao Y, Zhang SJ, et al. Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2017;135:663-669.
60. Teocchi MA, Ferreira AE, da Luz de Oliveira EP, et al. Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuroinflammation* 2013;10:53.
61. Nowak M, Bauer S, Haag A, et al. Interictal alterations of cytokines and leukocytes in patients with active epilepsy. *Brain Behav Immun* 2011;25:423-428.
62. Bauer S, Cepok S, Todorova-Rudolph A, et al. Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Res* 2009;86:82-88.
63. Silva LRPd. Resposta farmacológica, esclerose hipocampal e inflamação em epilepsia do lobo temporal mesial : efeito sobre metabólitos hipocampais medidos por espectroscopia de prótons por ressonância magnética In Editor (Ed)^(Eds) Book Resposta farmacológica, esclerose hipocampal e inflamação em epilepsia do lobo temporal mesial : efeito sobre metabólitos hipocampais medidos por espectroscopia de prótons por ressonância magnética Universidade Estadual de Campinas: Campinas; 2018.
64. Peltola J, Hurme M, Miettinen A, et al. Elevated levels of interleukin-6 may occur in cerebrospinal fluid from patients with recent epileptic seizures. *Epilepsy Res* 1998;31:129-133.
65. Zare-Shahabadi A, Ashrafi MR, Shahrokhi A, et al. Single nucleotide polymorphisms of TNF-Alpha gene in febrile seizures. *J Neurol Sci* 2015;356:153-156.
66. Volosin M, Trotter C, Cragolini A, et al. Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *J Neurosci* 2008;28:9870-9879.
67. Kandratavicius L, Monteiro MR, Assirati JA, Jr., et al. Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:1029-1042.
68. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003;10:86-98.
69. Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 2005;76:99-125.
70. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 2013;138:155-175.

71. McNamara JO, Scharfman HE. Temporal Lobe Epilepsy and the BDNF Receptor, TrkB. In th, Noebels JL, Avoli M, et al. (Eds) Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies: Bethesda (MD); 2012.
72. Shetty AK, Zaman V, Shetty GA. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *J Neurochem* 2003;87:147-159.
73. Ullal GR, Michalski B, Xu B, et al. NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naive and kindled rat hippocampus. *Neurochem Int* 2007;50:866-871.
74. Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, brain and behavioral plasticity. *Neural Plast* 2012;2012:784040.
75. Peltola J, Palmio J, Korhonen L, et al. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res* 2000;41:205-211.
76. Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Inaguma Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth and neurotrophin-3 selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neurosci Res* 1999;35:19-29.
77. Schmidt-Kastner R, Humpel C, Wetmore C, et al. Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Brain Res* 1996;107:331-347.
78. He XP, Butler L, Liu X, et al. The tyrosine receptor kinase B ligand, neurotrophin-4, is not required for either epileptogenesis or tyrosine receptor kinase B activation in the kindling model. *Neuroscience* 2006;141:515-520.
79. Chen NC, Chuang YC, Huang CW, et al. Interictal serum brain-derived neurotrophic factor level reflects white matter integrity, epilepsy severity, and cognitive dysfunction in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2016;59:147-154.
80. Hong Z, Li W, Qu B, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol* 2014;21:57-64.
81. LaFrance WC, Jr., Leaver K, Stopa EG, et al. Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures. *Neurology* 2010;75:1285-1291.
82. Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation* 2018;15:144.
83. Mao LY, Ding J, Peng WF, et al. Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. *Epilepsia* 2013;54:e142-145.
84. Uludag IF, Duksal T, Tiftikcioglu BI, et al. IL-1beta, IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy. *Seizure* 2015;26:22-25.
85. Lehtimaki KA, Keranen T, Palmio J, et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2007;116:226-230.
86. Paudel YN, Shaikh MF, Chakraborti A, et al. HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction. *Front Neurosci* 2018;12:628.
87. He JJ, Li S, Shu HF, et al. The interleukin 17 system in cortical lesions in focal cortical dysplasias. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:152-163.
88. Estes ML, Iwasaki K, Jacobs BS, et al. Interleukin-4 down-regulates adult human astrocyte DNA synthesis and proliferation. *Am J Pathol* 1993;143:337-341.
89. Andre Altmann MR, Martina Di Nunzio, Teresa Ravizza, Daniele Tolomeo, Regina H Reynolds, Alyma Somani, Marco Bacigaluppi, Valentina Iori, Edoardo Micotti, Juan A Botia, Julie Absil, Saud Alhusaini, Marina K. M. Alvim, Pia Auvinen, Nuria Bargallo, Emanuele Bartolini, Benjamin Bender, Felipe Bergo, Tauana Bernardes, Andrea Bernasconi, Neda Bernasconi, Boris C Bernhardt, Karen Blackmon, Barbara Braga, Maria E Caligiuri, Anna Cavallo, Chad Carlson, Sarah Carr, Gianpiero Cavalleri, Fernando Cendes, Jian Chen, Shuai Chen, Andrea Cherubini, Luis Concha, Philippe David, Norman Delanty, Chantal Depondt, Orrin Devinsky, Colin P Doherty, Martin Domin, Niels Focke, Sonya Foley, Wendy Franca, Antonio Gambardella, Renzo Guerrini, Khalid Hamandi, Derrek P Hibar, Dmitry Y Isaev, Graeme

- Jackson, Neda Jahanshad, Reetta Kalviainen, Simon Keller, Peter Kochunov, Raviteja Kotikalapudi, Magdalena A Kowalczyk, Ruben Kuzniecky, Patrick Kwan, Angelo Labate, Soenke Langer, Matteo Lenge, Min Liu, Pascal Martin, Mario Mascalchi, Stefano Meletti, Marcia E Morita, Terence J O'Brien, Jose C Pariente, Mark P Richardson, Raul Rodriguez-Cruces, Christian Rummel, Taavi Saavalainen, Mira K Semmelroch, Mariasavina Severino, Pasquale Striano, Thomas Thesen, Rhys H Thomas, Manuela Tondelli, Domenica Tortora, Anna Elisabetta Vaudano, Lucy Vivash, Felix von Podewils, Jan Wagner, Bernd Weber, Roland Wiest, Clarissa L Yasuda, Guohao Zhang, Junsong Zhang, ENIGMA-Epilepsy Working Group, Costin Leu, Andreja Avbersek, EpiPGX Consortium, Maria Thom, Christopher D Whelan, Paul Thompson, Carrie McDonald, Annamaria Vezzani, Sanjay M Sisodiya. A systems-level analysis highlights microglial activation as a modifying factor in common forms of human epilepsy. In Editor (Ed)^(Eds) Book A systems-level analysis highlights microglial activation as a modifying factor in common forms of human epilepsy; 2018.
90. Vieira ELM, de Oliveira GNM, Lessa JMK, et al. Peripheral leukocyte profile in people with temporal lobe epilepsy reflects the associated proinflammatory state. *Brain Behav Immun* 2016;53:123-130.
 91. Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, et al. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1345-1356.
 92. De Sarro G, Russo E, Ferreri G, et al. Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:761-766.
 93. Li G, Bauer S, Nowak M, et al. Cytokines and epilepsy. *Seizure* 2011;20:249-256.
 94. Baune BT, Smith E, Reppermund S, et al. Inflammatory biomarkers predict depressive, but not anxiety symptoms during aging: the prospective Sydney Memory and Aging Study. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:1521-1530.
 95. Butler T, Blackmon K, McDonald CR, et al. Cortical thickness abnormalities associated with depressive symptoms in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2012;23:64-67.
 96. Kanter-Schlifke I, Georgievska B, Kirik D, et al. Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. *Mol Ther* 2007;15:1106-1113.
 97. Duveau V, Fritschy JM. PSA-NCAM-dependent GDNF signaling limits neurodegeneration and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2010;32:89-98.
 98. Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, et al. CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 1995;685:55-67.
 99. Gerlach J, Donkels C, Munzner G, et al. Persistent Gliosis Interferes with Neurogenesis in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Front Cell Neurosci* 2016;10:131.
 100. Moura VB, Lima SB, Matos-Silva H, et al. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology* 2016;143:334-342.
 101. Arce-Sillas A, Cardenas G, Alvarez-Luquin D, et al. Treatment-Resistant Human Extraparenchymal Neurocysticercosis: An Immune-Inflammatory Approach to Cysticidal Treatment Outcome. *Neuroimmunomodulation* 2018;25:103-109.
 102. Arce-Sillas A, Alvarez-Luquin DD, Cardenas G, et al. Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. *Clin Exp Immunol* 2016;183:271-279.
 103. Rodrigues V, Jr., de-Mello FA, Magalhaes EP, et al. Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:1059-1063.
 104. Nogueira MH. Transtornos de humor e de ansiedade na epilepsia de lobo temporal mesial: uma perspectiva clínica, laboratorial e morfológica. In Editor (Ed)^(Eds) Book Transtornos de humor e de ansiedade na epilepsia de lobo temporal mesial: uma perspectiva clínica, laboratorial e morfológica, Universidade Estadual de Campinas: Campinas; 2016.

APÊNDICE 1

Diversos pacientes e controles apresentavam comorbidades.

Os controles foram questionados sobre doenças neurológicas, porém em relação às outras comorbidades, temos as informações apenas daqueles que referiram espontaneamente fazer uso de medicações contínuas. Além de não termos essas informações dos controles de BDNF advindos da UFMG.

Já dos pacientes, as informações foram adquiridas em prontuários médicos. Considerando neoplasias e infecciosas, nenhum paciente estava em tratamento ativo das patologias, exceto o paciente com HIV que apresentava bom controle da doença com terapia anti-retroviral. Sobre as doenças endocrinológicas, não foram consideradas as obesidades pois para realização de RM os pacientes devem pesar menos de 120kg, e assim os muito obesos não foram convidados a participar da pesquisa. As demais doenças discriminadas abaixo na tabela 1S, são de baixa frequência, exceto tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes e dislipidemia. Nenhuma dessas doenças é mais prevalente em pacientes com epilepsia e acreditamos que a mesma proporção deve ser encontrada nos controles.

Tabela 1S: Comorbidades encontradas em prontuários de pacientes.

Classe	Comorbidade	N
Neoplasias	Câncer de tireoide	1
	Carcinoma basocelular de pele	2
	Carcinoma espinocelular (CEC) de pele	1
	Linfoma não Hodgkin	1
	Melanoma	1
	Neoplasia de estômago	1
	Neoplasia de parede torácica	1
	Neoplasia de pulmão	2
	Osteosarcomatose familiar	1
	Tumor esofágico	1
Doenças Reumatológicas	Artrite Reumatóide	2
	FAN +	2
	Fenômeno de Raynaud	1
Doenças Endocrinológicas	Bócio difuso atóxico	1
	Hipotireoidismo (clínico e	15

	subclínico)	
	Lupus Eritematoso Sistêmico	1
	Nódulo assintomático de tireoide	1
	Panptuitarismo	1
	resistência à insulina	1
	Diabetes Melitus	11
Doenças Renais	Glomerulonefrite Difusa Aguda	1
	Glomerulonefrite por lesão mínima	1
Doenças Dermatológicas	Eritema multiforme	1
	Eritema nodoso	1
	Psoríase	1
	Urticária Crônica	2
Doenças Genéticas	Sd Kalmann	1
	Síndrome do X Frágil	2
	Traço falciforme	1
Doenças Infeciosas	Doença de Chagas	1
	Esquistossomose	1
	Hepatite C	4
	HIV	1
	Leishmaniose cutânea	1
Doenças Cardiovasculares	Doença coronariana	1
	Insuficiência cardíaca	3
	HAS	80
	Dislipidemia	27
Doenças Pulmonares	DPOC	2
	SAHOS	2
	Tabagismo	17
Doenças Hepáticas	Cirrose hepática	1

Não foram listadas as mulheres com síndrome de ovário policístico uma vez que isso pode ser secundário à medicação e grande parte dos pacientes não sabe ter o diagnóstico (apenas no prontuário de apenas 3 pacientes havia essa informação e acreditamos que essa proporção seja maior).

Em relação a doenças psiquiátricas, essas são bastante comuns na população com epilepsia. Esse estudo não tem como objetivo avaliar a influência dessas doenças nos marcadores inflamatórios. Dessa maneira fizemos uma análise simples. Comparamos os marcadores inflamatórios entre todos pacientes em que havia relatos em prontuários sobre doenças psiquiátricas (n= 47 - transtorno

depressivo, transtorno de ansiedade etc.), independente do tratamento, e comparamos com aqueles que não apresentavam tal antecedente, não foi significativa a diferença em nenhuma das análises. Uma tese do nosso grupo, que avaliou 160 pacientes com ELT (a grande maioria deles avaliado nesse trabalho atual) e 67 controles, que aplicou questionários estruturados para avaliar transtornos depressivos, de humor e de ansiedade, avaliou a IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13 e TNF- α por imunensaio multiplex, não notou diferença entre os marcadores entre os grupos com e sem transtornos psiquiátricos e os controles¹⁰⁴.

ANEXO 1

Documento de aprovação do Comitê de Universidade estadual de Campinas



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO ENTRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E PADRÃO DE ATROFIA HIPOCAMPAL E EXTRA-HIPOCAMPAL EM PACIENTES COM EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

Pesquisador: Marina Koutsodontis Machado Alvim

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69153817.1.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.224.333

Apresentação do Projeto:

Serão estudados pacientes do ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP com diagnóstico de Epilepsia de Lobo Temporal, com e sem esclerose hipocampal. Todos realizarão Ressonância Magnética. A volumetria hipocampal será realizada de forma automática através do programa Freesurfer, e o padrão de atrofia hipocampal, pela por segmentação automática das sub regiões hipocampais pelo mesmo programa. O padrão de lesão extra hipocampal será avaliado por volumetria baseada em voxels (VBM). Os marcadores inflamatórios que serão estudados serão IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN e IL-17 que já foram previamente colhidos e dosados no sangue de pacientes e controles saudáveis.

As análises dos exames de ressonância magnética e dos marcadores inflamatórios do projeto de Doutorado acima serão realizadas com imagens e dados arquivados em formato digital para os fins de pesquisa, conforme Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido já aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP e assinado pelos pacientes avaliados (parecer Nº1158/2009).

Esclarecemos que durante este projeto de doutorado não realizaremos novos procedimentos com os pacientes.

Desta forma, solicitamos dispensa de solicitação de novo Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.224.333

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Definir a associação de marcadores inflamatórios e padrões de alteração hipocampal em pacientes com epilepsia de lobo temporal.

Objetivo Secundário:

Objetivos específicos: 1- Definir a associação entre marcadores inflamatórios e o padrão de dano cerebral extra hipocampal nos pacientes com ELT. 2 - Definir a associação entre marcadores inflamatórios e resposta medicamentosa dos pacientes com ELT. 3- Definir associação entre marcadores inflamatórios e o padrão de perda progressiva de substância branca e substância cinzenta em pacientes com ELT.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este projeto será realizado com dados já obtidos em outra pesquisas, aprovadas pelo Comitê de Ética e Pesquisa, em que ocorreu a coleta de sangue para a avaliação de marcadores inflamatórios, assim, não serão realizadas novas coletas e não serão mais manipulados materiais biológicos. Além disso as imagens analisadas já encontram-se no banco de dados arquivados em formato digital para os fins de pesquisa, logo os pacientes não precisaram ser submetidos a nova aquisição de imagem de ressonância magnética.

A definição do padrão de marcadores inflamatórios na epilepsia é importante para a melhor compreensão de sua fisiopatologia e criação de mecanismos que possam auxiliar no seu diagnóstico, prognóstico e decisão de tratamento. A Epilepsia de Lobo Temporal ainda é bastante refratária ao tratamento medicamentoso em muitos pacientes, o que restringe a qualidade de vida destes e aumenta a morbi-mortalidade, principalmente quando associada a esclerose hipocampal. Assim, a definição do padrão de lesão hipocampal e a tentativa de determinar os marcadores inflamatórios envolvidos em sua fisiopatologia e, talvez, a resposta destes ao tratamento atualmente utilizado, auxiliaria nas decisões terapêuticas destes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto já submetido a este CEP com TCLE aprovado anteriormente. Projeto este que dará continuidade ao anterior sem realização de novos exames (ressonância e coleta de sangue).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.224.333

Projeto Plataforma: Adequado

Comprovação de vínculo: Adequado

TCLE: solicita dispensa, e esclareceu que não serão realizados novos exames de imagem e sangue. Que todos os exames já foram realizados e que os mesmos dados serão analisados.

Anexou relatório enviado a FAPESP como solicitado.

Recomendações:

Iniciar o projeto somente após aprovação do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram adequadas e respondidas as pendências.

Solicitamos que o relatório do protocolo de pesquisa “Análise da Relação entre Expressão de Vias Inflamatórias Sistêmicas, Epileptogênese e Atrofia Cerebral nas Epilepsias Parciais” seja enviado ao CEP através de Notificação via Plataforma Brasil. Foi anexado relatório final com detalhamento dos resultados técnicos. Não foi anexado formulário do relatório no modelo preconizado pelo CEP, que visa detalhar possíveis intercorrências éticas durante o estudo.

Preencher, assinar e anexar o formulário de relatório no modelo do CEP, detalhando as possíveis intercorrências éticas durante o estudo. O arquivo encontra-se disponível em

<https://www.prp.unicamp.br/pt-br/relatorios-0>

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.224.333

terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_917591.pdf	11/07/2017 14:56:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto2017corrigido.pdf	11/07/2017 14:55:06	Marina Koutsodontis Machado Alvim	Aceito
Outros	CartaRespostaCEP.pdf	11/07/2017 14:54:30	Marina Koutsodontis	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 2.224.333

Outros	CartaRespostaCEP.pdf	11/07/2017 14:54:30	Machado Alvim	Aceito
Outros	RelatorioFinalFAPESPfapemig.pdf	11/07/2017 14:51:44	Marina Koutsodontis Machado Alvim	Aceito
Outros	AtestadoMatriculaNovo.pdf	07/07/2017 16:48:50	Marina Koutsodontis Machado Alvim	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	10/05/2017 14:07:02	Marina Koutsodontis Machado Alvim	Aceito
Outros	Carta_Comite_Etica_Marina_Alvim.pdf	10/05/2017 14:00:26	Marina Koutsodontis Machado Alvim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 17 de Agosto de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2

Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study.

Brain 2018;141:391-408.



RightsLink®



Title: Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study
Author: Whelan, Christopher D; Altmann, Andre
Publication: Brain
Publisher: Oxford University Press
Date: 2018-01-30
Copyright © 2018, Oxford University Press

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

Structural brain abnormalities in the common epilepsies assessed in a worldwide ENIGMA study

Christopher D. Whelan,^{1,2} Andre Altmann,³ Juan A. Botía,⁴ Neda Jahanshad,¹ Derrek P. Hibar,¹ Julie Absil,⁵ Saud Alhusaini,^{2,6} Marina K. M. Alvim,⁷ Pia Auvinen,^{8,9} Emanuele Bartolini,^{10,11} Felipe P. G. Bergo,⁷ Tauana Bernardes,⁷ Karen Blackmon,^{12,13} Barbara Braga,⁷ Maria Eugenia Caligiuri,¹⁴ Anna Calvo,¹⁵ Sarah J. Carr,¹⁶ Jian Chen,¹⁷ Shuai Chen,^{18,19} Andrea Cherubini,¹⁴ Philippe David,⁵ Martin Domin,²⁰ Sonya Foley,²¹ Wendy França,⁷ Gerrit Haaker,^{22,23} Dmitry Isaev,¹ Simon S. Keller,²⁴ Raviteja Kotikalapudi,^{25,26} Magdalena A. Kowalczyk,²⁷ Ruben Kuzniecky,¹² Soenke Langner,²⁰ Matteo Lenge,¹⁰ Kelly M. Leyden,^{28,29} Min Liu,³⁰ Richard Q. Loi,^{28,29} Pascal Martin,²⁵ Mario Mascalchi,^{31,32} Marcia E. Morita,⁷ Jose C. Pariente,¹⁵ Raul Rodríguez-Cruces,³³ Christian Rummel,³⁴ Taavi Saavalainen,^{9,35} Mira K. Semmelroch,²⁷ Mariasavina Severino,³⁶ Rhys H. Thomas,^{37,38} Manuela Tondelli,³⁹ Domenico Tortora,³⁶ Anna Elisabetta Vaudano,³⁹ Lucy Vivash,^{40,41} Felix von Podewils,⁴² Jan Wagner,^{43,44} Bernd Weber,^{43,45} Yi Yao,⁴⁶ Clarissa L. Yasuda,⁷ Guohao Zhang,⁴⁷ UK Brain Expression Consortium, Nuria Bargalló,^{15,48} Benjamin Bender,²⁶ Neda Bernasconi,³⁰ Andrea Bernasconi,³⁰ Boris C. Bernhardt,^{30,49} Ingmar Blümcke,²³ Chad Carlson,^{12,50} Gianpiero L. Cavalleri,^{2,51} Fernando Cendes,⁷ Luis Concha,³³ Norman Delanty,^{2,51,52} Chantal Depondt,⁵³ Orrin Devinsky,¹² Colin P. Doherty,^{51,54} Niels K. Focke,^{25,55} Antonio Gambardella,^{14,56} Renzo Guerrini,^{10,11} Khalid Hamandi,^{37,38} Graeme D. Jackson,^{27,57} Reetta Kälviäinen,^{8,9} Peter Kochunov,⁵⁸ Patrick Kwan,⁴¹ Angelo Labate,^{14,56} Carrie R. McDonald,^{28,29} Stefano Meletti,³⁹ Terence J. O'Brien,^{41,59} Sebastien Ourselin,³ Mark P. Richardson,^{16,60} Pasquale Striano,⁶¹ Thomas Thesen,^{12,13} Roland Wiest,³⁴ Junsong Zhang,^{18,19} Annamaria Vezzani,⁶² Mina Ryten,^{4,63} Paul M. Thompson¹ and Sanjay M. Sisodiya^{64,65} for the ENIGMA-Epilepsy Working Group

Progressive functional decline in the epilepsies is largely unexplained. We formed the ENIGMA-Epilepsy consortium to understand factors that influence brain measures in epilepsy, pooling data from 24 research centres in 14 countries across Europe, North and South America, Asia, and Australia. Structural brain measures were extracted from MRI brain scans across 2149 individuals with epilepsy, divided into four epilepsy subgroups including idiopathic generalized epilepsies ($n=367$), mesial temporal lobe epilepsies with hippocampal sclerosis (MTLE; left, $n=415$; right, $n=339$), and all other epilepsies in aggregate ($n=1026$), and compared to 1727 matched healthy controls. We ranked brain structures in order of greatest differences between patients and controls, by meta-analysing effect sizes across 16 subcortical and 68 cortical brain regions. We also tested effects of duration of disease, age at onset, and age-by-diagnosis interactions on structural measures. We observed widespread patterns of altered subcortical volume and reduced cortical grey matter thickness. Compared to controls, all epilepsy groups showed lower volume in the right thalamus

Received June 12, 2017. Revised October 1, 2017. Accepted October 24, 2017

© The Author(s) (2018). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Cohen's $d = -0.24$ to -0.73 ; $P < 1.49 \times 10^{-4}$), and lower thickness in the precentral gyri bilaterally ($d = -0.34$ to -0.52 ; $P < 4.31 \times 10^{-6}$). Both MTLE subgroups showed profound volume reduction in the ipsilateral hippocampus ($d = -1.73$ to -1.91 , $P < 1.4 \times 10^{-19}$), and lower thickness in extrahippocampal cortical regions, including the precentral and paracentral gyri, compared to controls ($d = -0.36$ to -0.52 ; $P < 1.49 \times 10^{-4}$). Thickness differences of the ipsilateral temporopolar, parahippocampal, entorhinal, and fusiform gyri, contralateral pars triangularis, and bilateral precuneus, superior frontal and caudal middle frontal gyri were observed in left, but not right, MTLE ($d = -0.29$ to -0.54 ; $P < 1.49 \times 10^{-4}$). Contrastingly, thickness differences of the ipsilateral pars opercularis, and contralateral transverse temporal gyrus, were observed in right, but not left, MTLE ($d = -0.27$ to -0.51 ; $P < 1.49 \times 10^{-4}$). Lower subcortical volume and cortical thickness associated with a longer duration of epilepsy in the all-epilepsies, all-other-epilepsies, and right MTLE groups (beta, $b < -0.0018$; $P < 1.49 \times 10^{-4}$). In the largest neuroimaging study of epilepsy to date, we provide information on the common epilepsies that could not be realistically acquired in any other way. Our study provides a robust ranking of brain measures that can be further targeted for study in genetic and neuropathological studies. This worldwide initiative identifies patterns of shared grey matter reduction across epilepsy syndromes, and distinctive abnormalities between epilepsy syndromes, which inform our understanding of epilepsy as a network disorder, and indicate that certain epilepsy syndromes involve more widespread structural compromise than previously assumed.

- 1 Imaging Genetics Center, Mark and Mary Stevens Neuroimaging and Informatics Institute, University of Southern California, Los Angeles, California, USA
- 2 Department of Molecular and Cellular Therapeutics, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland
- 3 Translational Imaging Group, Centre for Medical Image Computing, University College London, London, UK
- 4 Reta Lila Weston Institute and Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London WC1N 3BG, UK
- 5 Department of Radiology, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels 1070, Belgium
- 6 Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
- 7 Department of Neurology, University of Campinas, Campinas, Brazil
- 8 Epilepsy Center, Department of Neurology, Kuopio University, Kuopio, Finland
- 9 Institute of Clinical Medicine, Neurology, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland
- 10 Pediatric Neurology Unit, Children's Hospital A. Meyer-University of Florence, Italy
- 11 IRCCS Stella Maris Foundation, Pisa, Italy
- 12 Comprehensive Epilepsy Center, Department of Neurology, New York University School of Medicine, New York, USA
- 13 Department of Physiology, Neuroscience and Behavioral Science, St. George's University, Grenada, West Indies
- 14 Institute of Molecular Bioimaging and Physiology of the National Research Council (IBFM-CNR), Catanzaro, Italy
- 15 Magnetic Resonance Image Core Facility, IDIBAPS, Barcelona, Spain
- 16 Department of Basic and Clinical Neuroscience, Institute of Psychiatry, Psychology and Neuroscience, King's College London, UK
- 17 Department of Computer Science and Engineering, The Ohio State University, USA
- 18 Cognitive Science Department, Xiamen University, Xiamen, China
- 19 Fujian Key Laboratory of the Brain-like Intelligent Systems, China
- 20 Functional Imaging Unit, Institute of Diagnostic Radiology and Neuroradiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany
- 21 Cardiff University Brain Research Imaging Centre, School of Psychology, Wales, UK
- 22 Department of Neurosurgery, University Hospital, Freiburg, Germany
- 23 Department of Neuropathology, University Hospital Erlangen, Germany
- 24 Department of Molecular and Clinical Pharmacology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, UK
- 25 Department of Neurology and Epileptology, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen, Germany
- 26 Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University of Tübingen, Tübingen, Germany
- 27 The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, Austin Campus, Melbourne, VIC, Australia
- 28 Multimodal Imaging Laboratory, University of California San Diego, San Diego, California, USA
- 29 Department of Psychiatry, University of California San Diego, San Diego, California, USA
- 30 Neuroimaging of Epilepsy Laboratory, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
- 31 Neuroradiology Unit, Children's Hospital A. Meyer, Florence, Italy
- 32 "Mario Serio" Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Italy
- 33 Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, Querétaro, México
- 34 Support Center for Advanced Neuroimaging (SCAN), University Institute for Diagnostic and Interventional Neuroradiology, Inselspital, University of Bern, Bern, Switzerland
- 35 Central Finland Central Hospital, Medical Imaging Unit, Jyväskylä, Finland
- 36 Neuroradiology Unit, Department of Head and Neck and Neurosciences, Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy
- 37 Institute of Psychological Medicine and Clinical Neurosciences, Hadyn Ellis Building, Maindy Road, Cardiff, UK
- 38 Department of Neurology, University Hospital of Wales, Cardiff, UK

- 39 Department of Biomedical, Metabolic, and Neural Science, University of Modena and Reggio Emilia, NOCSE Hospital, Modena, Italy
- 40 Melbourne Brain Centre, Department of Medicine, University of Melbourne, Parkville, VIC, 3052, Australia
- 41 Department of Neurology, Royal Melbourne Hospital, Parkville, 3050, Australia
- 42 Department of Neurology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany
- 43 Department of Epileptology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany
- 44 Department of Neurology, Philips University of Marburg, Marburg Germany
- 45 Department of Neurocognition / Imaging, Life&Brain Research Centre, Bonn, Germany
- 46 The Affiliated Chenggong Hospital of Xiamen University, Xiamen, China
- 47 Department of Computer Science and Electrical Engineering, University of Maryland, Baltimore County, USA
- 48 Centre de Diagnostic Per la Imatge (CDIC), Hospital Clinic, Barcelona, Spain
- 49 Multimodal Imaging and Connectome Analysis Lab, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
- 50 Medical College of Wisconsin, Department of Neurology, Milwaukee, WI, USA
- 51 FutureNeuro Research Centre, RCSI, Dublin, Ireland
- 52 Division of Neurology, Beaumont Hospital, Dublin 9, Ireland
- 53 Department of Neurology, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels 1070, Belgium
- 54 Neurology Department, St. James's Hospital, Dublin 8, Ireland
- 55 Department of Clinical Neurophysiology, University Medicine Göttingen, Göttingen, Germany
- 56 Institute of Neurology, University "Magna Græcia", Catanzaro, Italy
- 57 Florey Department of Neuroscience and Mental Health, The University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia
- 58 Maryland Psychiatric Research Center, Department of Psychiatry, University of Maryland School of Medicine, Maryland, USA
- 59 Department of Medicine, University of Melbourne, Parkville, VIC, 3052, Australia
- 60 Department of Neurology, King's College Hospital, London, UK
- 61 Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health, University of Genoa, Genova, Italy
- 62 Dept of Neuroscience, Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Via G. La Masa 19, 20156 Milano, Italy
- 63 Department of Medical and Molecular Genetics, King's College London, London SE1 9RT, UK
- 64 Department of Clinical and Experimental Epilepsy, UCL Institute of Neurology, London, UK
- 65 Chalfont Centre for Epilepsy, Bucks, UK

Correspondence to: Sanjay M. Sisodiya
 Department of Clinical and Experimental Epilepsy
 UCL Institute of Neurology
 Box 29
 Queen Square
 London WC1N 3BG, UK
 E-mail: s.sisodiya@ucl.ac.uk

Keywords: epilepsy; MRI; thalamus; precentral gyrus

Abbreviations: ENIGMA = Enhancing Neuro Imaging Genetics through Meta-Analysis; IGE = idiopathic generalized epilepsy; MTLE-L/R = mesial temporal lobe epilepsy with left/right hippocampal sclerosis

Introduction

Epilepsy is a prevalent neurological disorder, comprising many different syndromes and conditions, affecting 0.6–1.5% of the population worldwide (Bell *et al.*, 2014). Approximately one-third of affected individuals do not respond to antiepileptic drug therapy (French, 2007). Alternative treatment options may not be appropriate (Englot *et al.*, 2011), and are not always effective (Télez-Zenteno *et al.*, 2005; Englot *et al.*, 2011). The identification of shared biological disease pathways may help elucidate diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets, which, in turn, could help to optimize individual treatment (Pitkänen *et al.*, 2016). However, disease biology remains unexplained for most cases—especially in commonly occurring epilepsies.

Epilepsy is a network disorder typically involving widespread structural alterations beyond the putative epileptic focus (Bernhardt *et al.*, 2015; Vaughan *et al.*, 2016). Hippocampal sclerosis is a common pathological substrate of mesial temporal lobe epilepsy (MTLE), but extrahippocampal abnormalities are also frequently observed in MTLE, notably in the thalamus (Keller and Roberts, 2008; Coan *et al.*, 2014; Alvim *et al.*, 2016) and neocortex (Keller and Roberts, 2008; Bernhardt *et al.*, 2009b, 2010; Blanc *et al.*, 2011; Labate *et al.*, 2011; Vaughan *et al.*, 2016). Neocortical abnormalities are also reported in idiopathic generalized epilepsies (IGE) (Bernhardt *et al.*, 2009a), and many childhood syndromes (O'Muircheartaigh *et al.*, 2011; Vollmar *et al.*, 2011; Ronan *et al.*, 2012; Overvliet *et al.*, 2013). Thus, common epilepsies may be characterized by shared disturbances in distributed cortico-subcortical

brain networks (Berg *et al.*, 2010), but the pattern, consistency and cause of these disturbances, and how they relate to functional decline (Vlooswijk *et al.*, 2010; Bernasconi, 2016; Nickels *et al.*, 2016), are largely unknown.

Currently, we lack reliable data from large cross-sectional neuroimaging, brain tissue, or biomarker studies in the common epilepsies. Brain tissue is not available from large cohorts of patients: common forms of epilepsy are often unsuitable for surgical treatment, so biopsied tissues are simply unavailable in sufficient numbers for research into disease biology. Brain-wide post-mortem studies also require extensive effort for comprehensive analysis. MRI offers detailed information on brain structure, but MRI measures from groups of individuals with and without epilepsy are not always consistent. For example, MTLE is associated with hippocampal sclerosis in up to 70% of brain MRI scans (Blümcke *et al.*, 2013). However, the effects of laterality, and the extent of extrahippocampal grey matter loss are inconsistently reported in studies of left versus right MTLE (Kemotsu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). Similarly, abnormalities of the basal ganglia, hippocampus, lateral ventricles, and neocortex have all been reported in IGE (Betting *et al.*, 2006), but most alterations are non-specific, and visual inspection of clinical MRI in IGE is typically normal (Woermann *et al.*, 1998). Genome-wide association studies (GWAS) have identified genetic variants associated with complex epilepsies by ‘lumping’ different epilepsy types together (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2014), but MRI studies are typically of smaller scale, and have not widely explored whether distinct epilepsy syndromes share common structural abnormalities.

There are many sources of inconsistency in previously reported MRI findings. First, epileptic seizures and syndromes are diverse; classifications are often revised and contested (Berg *et al.*, 2010; Scheffer *et al.*, 2017). Second, most cross-sectional brain imaging studies are based on small samples (typically <50 cases), limiting the power to detect subtle group differences (Button *et al.*, 2013). Third, variability in scanning protocols, image processing, and statistical analysis may affect the sensitivity of brain measures across studies.

The Enhancing Neuro Imaging Genetics through Meta-Analysis (ENIGMA) Consortium was formed to address these issues (Bearden and Thompson, 2017). ENIGMA is a global initiative, combining large samples with coordinated image processing, and integrating genomic and MRI data across hundreds of research centres worldwide. Prior ENIGMA studies have identified genetic variants associated with variations in brain structure (Stein *et al.*, 2012; Hibar *et al.*, 2015, 2017a; Adams *et al.*, 2016), and have reliably characterized patterns of brain abnormalities in schizophrenia (van Erp *et al.*, 2016), major depression (Schmaal *et al.*, 2016), obsessive compulsive disorder (Boedhoe *et al.*, 2017), attention deficit hyperactivity disorder (Hoogman *et al.*, 2017), and many other brain illnesses (Thompson *et al.*, 2017). Large-scale, collaborative

initiatives such as ENIGMA may improve our understanding of epilepsy, helping clinicians make more informed decisions and provide personalized treatment strategies (Ben-Menachem, 2016). Thus, we formed the Epilepsy Working Group of ENIGMA (‘ENIGMA-Epilepsy’) to apply coordinated, well-powered studies of imaging and genetic data in epilepsy.

Here, in the largest analysis of structural brain abnormalities in epilepsy to date, we ranked effect sizes for 16 subcortical and 68 cortical brain regions in 2149 individuals with epilepsy and 1727 healthy controls, using harmonized image processing, quality control, and meta-analysis. First, we grouped all epilepsies together, to determine whether biologically distinct syndromes show robust, common structural deficits. Second, we assessed a well-characterized form of epilepsy: MTLE with hippocampal sclerosis, analysing patients with left- and right-sided hippocampal sclerosis as independent groups. Third, we examined another major set of epilepsy syndromes: IGE. Finally, we studied all remaining epilepsies as a combined subgroup, to understand the relative contributions of IGE, MTLE-L, MTLE-R, and all other syndromes on shared patterns of structural compromise. We tested how age at scan, age of onset, and epilepsy duration affected brain structural measures. Based on existing neuroimaging (Gotman *et al.*, 2005; Bernhardt *et al.*, 2009a; Liu *et al.*, 2016), neurophysiological (Gotman *et al.*, 2005), neuropathological (Thom *et al.*, 2009), and genetic data (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2014), we predicted that (i) biologically distinct epilepsy syndromes would exhibit shared patterns of structural abnormalities; (ii) MTLEs with left or right hippocampal sclerosis would show distinct patterns of hippocampal and extrahippocampal structural deficits; and (iii) IGEs would also display subcortical volume and cortical thickness differences, compared to healthy controls.

Materials and methods

Each centre received approval from their local institutional review board or ethics committee. Written informed consent was provided according to local requirements (Supplementary Table 1).

Experimental design

Participants

Twenty-four cross-sectional samples from 14 countries were included in the study, totalling 2149 people with epilepsy and 1727 research centre-matched healthy control subjects (Fig. 1 and Table 1). The locations, dates, and periods of participant recruitment are provided in Supplementary Table 1. An epilepsy specialist assessed seizure and syndrome classifications at each centre, using International League Against Epilepsy terminology (Berg *et al.*, 2010). Participants were aged 18–55.

To test for shared and syndrome-specific structural alterations, analyses included one group combining all epilepsies ('all-epilepsies'; $n = 2149$), and four stratified subgroups: (i) left MTLE with left hippocampal sclerosis (MTLE-L; $n = 415$); (ii) right MTLE with right hippocampal sclerosis (MTLE-R; $n = 339$); (iii) IGE ($n = 367$); and (iv) all other epilepsies ($n = 1028$). Supplementary Table 2 lists all syndromic diagnoses included in the aggregate 'all-epilepsies' group. For the MTLE subgroups, we included anyone with the typical electroclinical constellation (Berg *et al.*, 2010), and a neuroradiologically-confirmed diagnosis of unilateral hippocampal sclerosis on clinical MRI. Participants were included in the IGE subgroup if they presented with tonic-clonic, absence or myoclonic seizures with generalized spike-wave discharges on EEG. Participants were included in the 'all-other-epilepsies' subgroup if they were diagnosed with non-lesional MTLE (43.3%), occipital (1.67%), frontal (8.78%), or parietal lobe epilepsy (0.84%), focal epilepsies not otherwise specified (37.03%), or another unclassified syndrome (8.37%; Supplementary Table 2). We excluded participants with a progressive disease (e.g. Rasmussen's encephalitis), malformations of cortical development, tumours or previous neurosurgery.

MRI data collection and processing

Structural T₁-weighted MRI brain scans were collected at the 24 participating centres. Scanning details are provided in

Supplementary Table 3. T₁-weighted images from cases and controls were analysed at each site using FreeSurfer 5.3.0, for automated analysis of brain structure (Fischl, 2012). Volumetric measures were extracted for 12 subcortical grey matter regions (six left and six right, including the amygdala, caudate, nucleus accumbens, pallidum, putamen, and thalamus), the left and right hippocampi, and the left and right lateral ventricles. Cortical thickness measures were extracted for 34 left-hemispheric grey matter regions, and 34 right-hemispheric grey matter regions (68 total; Supplementary Table 4). Visual inspections of subcortical and cortical segmentations were conducted following standardized ENIGMA protocols (<http://enigma.usc.edu>), used in prior genetic studies of brain structure (Stein *et al.*, 2012; Hibar *et al.*, 2015, 2017a; Adams *et al.*, 2016), and large-scale case-control studies of neuropsychiatric illnesses (Schmaal *et al.*, 2015, 2016; Hibar *et al.*, 2016; van Erp *et al.*, 2016; Boedhoe *et al.*, 2017). Analysts were blind to participants' diagnoses. Each analyst was instructed to execute a series of standardized bash scripts, identifying participants with volumetric or thickness measures greater or less than 1.5 times the interquartile range as outliers. Outlier data were then visually inspected, by overlaying the participant's cortical segmentations on their whole-brain anatomical images. If the blinded local analyst judged any structure as inaccurately segmented, that structure was omitted from the analysis. The Supplementary material provides further information.

Statistical analysis

Participant demographics

All research centres tested for differences in age between individuals with epilepsy and controls using an unpaired, two-tailed *t*-test in the R statistics package (<https://www.r-project.org>). Each centre also tested for sex differences between individuals with epilepsy and controls using a chi-squared test in SPSS Statistics package (IBM Corp., Version 21.0).

Meta-analytical group comparisons

Each research centre tested for case-versus-control differences using multiple linear regressions (via the *lm* function implemented in R), where a binary indicator of diagnosis (0 = healthy control, 1 = person with epilepsy) was the predictor of interest, and the volume or thickness of a specified brain region was the outcome measure. We calculated effect size estimates across all brain regions using Cohen's *d*, adjusting for age, sex and intracranial volume (ICV). ICV is a reliable, indirect measure of head size (Hansen *et al.*, 2015), used as a covariate in other large-scale ENIGMA collaborations (Schmaal *et al.*, 2015, 2016; Hibar *et al.*, 2016; van Erp *et al.*, 2016; Boedhoe *et al.*, 2017). Cohen's *d* effect sizes and regression beta coefficients were pooled across centres using a random-effects, restricted maximum likelihood method of meta-analysis via the R package, *metafor* (Viechtbauer, 2010). The Supplementary material provides additional details.

Meta-analytical regression with clinical variables

Each centre conducted a series of linear regressions, testing the association between subcortical volume or cortical thickness, and: (i) age at onset of epilepsy; and (ii) duration of epilepsy.

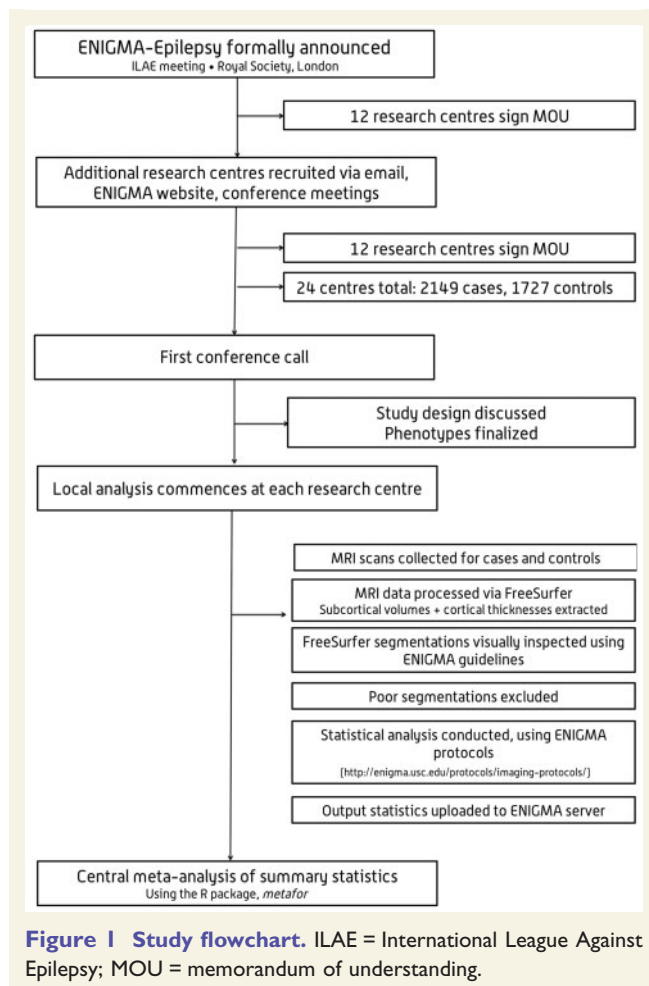


Table 1 ENIGMA - Epilepsy Working Group demographics, including age (in years), mean age at onset of epilepsy (in years), mean duration of illness (in years), sex, and case-control breakdown for participating sites

Site name	Age controls (Mean ± SD)	Age cases (Mean ± SD)	Age of onset (Mean ± SD)	Duration of illness (Mean ± years)	Female controls	Female cases	Total controls	Total cases	MTLE-L cases	MTLE-R cases	IGE cases	'Other' cases	Total n
Bern	32.5 ± 9.39	30.48 ± 10.13	-	-	41	28	78	56	10	8	12	26	134
Bonn	40.11 ± 13.4	39.68 ± 13.4	16.86 ± 11.96	22.82 ± 14.18	40	60	77	108	71	37	0	0	185
BRI	34.73 ± 10.61	33.28 ± 10.59	17.9 ± 11.49	17.9 ± 12.93	49	46	112	79	10	13	18	38	191
Brussels	26.64 ± 4.34	33.79 ± 9.9	14.46 ± 10.13	19.02 ± 12.77	24	49	44	83	11	0 (4)	8	60	127
CUBRIC	28.04 ± 8.16	28.42 ± 8.06	13.56 ± 5.18	14.81 ± 9.91	34	34	48	48	0	0	44	0 (4)	96
EKUT_A	34.82 ± 11.38	33.58 ± 11.07	17.04 ± 11.09	16.84 ± 13.18	30	28	49	47	6	0	5	36	96
EKUT_B	35.33 ± 12.27	31.13 ± 10.74	17.32 ± 10.8	14.45 ± 11.14	9	18	18	24	0	0	16	8	42
EPICZ	30.48 ± 9.39	30.42 ± 10.13	-	-	59	71	116	113	19	27	0	67	229
EPIGEN_3.0	34.75 ± 9.36	36.2 ± 9.97	17.03 ± 13.7	18.93 ± 10.88	30	37	70	60	8	5	0	47	130
EPIGEN_1.5	31.7 ± 9.24	37.46 ± 10.69	14.51 ± 11.8	22.68 ± 14.28	24	35	47	52	27	25	0	0	99
Florence	35.29 ± 8.48	28 ± 7.77	12.69 ± 8.02	14.27 ± 8.06	8	12	14	31	0 (1)	0	5	25	45
Greifswald	42.26 ± 14.97	26.23 ± 7.49	28.12 ± 17.86	14.13 ± 12.81	60	21	99	39	0	0	39	0	138
IDIBAPS-HCP	33.13 ± 5.99	36.77 ± 9.52	18.07 ± 11.72	17.64 ± 10.51	29	67	52	115	17	36	0 (3)	59	167
KCL_CNS	31.68 ± 8.4	33.2 ± 8.9	13.22 ± 8.2	20.67 ± 11.23	54	50	101	96	5	0 (4)	32	55	197
KCL_CRF	28.73 ± 8.29	31.47 ± 11.33	23.13 ± 7.55	8.33 ± 9.99	16	7	26	15	0 (3)	0 (2)	0 (4)	6	41
Kuopio	25.16 ± 1.55	33.35 ± 11.21	24 ± 13.22	9.35 ± 11.23	33	135	67	240	0	9	36	195	307
MNI	30.74 ± 7.38	32.53 ± 9.92	16.48 ± 9.72	16.05 ± 11.32	21	71	46	128	45	38	0	45	174
NYU	30.1 ± 10.36	33.23 ± 9.66	16.96 ± 11.27	16.43 ± 12.7	62	93	118	159	8	11	36	104	277
RMH	39.35 ± 20.26	38.08 ± 15.91	28.23 ± 17.98	10.18 ± 12.65	12	70	28	146	22	13	25	86	174
UCSD	36.89 ± 15.1	37.67 ± 11.79	19.32 ± 14.77	18.8 ± 15.36	16	22	37	43	14	8	0	21	80
UNAM	33.2 ± 12.29	31.47 ± 11.81	16.26 ± 11.33	15.03 ± 12.53	25	24	35	36	10	10	0	16	71
UNICAMP	34.39 ± 10.45	39.98 ± 10.25	12.07 ± 9.52	27.96 ± 12.54	249	183	398	291	107	84	40	60	689
UNIMORE	28.47 ± 5.25	28.36 ± 10.26	12.58 ± 8.13	14.34 ± 10.94	20	47	34	82	0 (3)	0 (2)	40	37	116
XMU	31.54 ± 6.99	28.79 ± 9.06	17.04 ± 12.2	11.76 ± 8.78	4	20	13	58	25	15	11	7	71
Combined	33.31 ± 9.91	34.36 ± 10.65	17.63 ± 11.47	17.42 ± 11.99	949	1228	1727	2149	415	339	367	1028	3876

Also provided is the total number of MTLE cases with left hippocampal sclerosis, MTLE cases with right hippocampal sclerosis, IGE and all-other-epilepsies ('other') cases per site. Research centres with fewer than five participants for a given phenotype are marked as '0' for that phenotype, with the original sample size noted in parentheses. SD = standard deviation.

All centres tested for interactions between diagnosis of epilepsy (including syndrome groups) and age at time of scan. Beta values representing the unstandardized slopes of each regression were extracted for each analysis. Sex and ICV were included as covariates in all secondary analyses.

Correction for multiple comparisons

We conducted four independent regressions (one case versus control regression, and three regressions with clinical variables) across 84 regions of interest, adjusting the statistical significance threshold to $P_{\text{thresh}} < 1.49 \times 10^{-4}$ to correct for 336 comparisons. To account for correlations between tests, we also applied a less conservative adjustment for false discovery rate (FDR), using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995). For clarity, we report only P -values significant after stringent Bonferroni correction; FDR-adjusted P -values are summarized in the Supplementary material.

Power analyses

Across all regions of interest, we calculated the sample sizes necessary to achieve 80% power to detect case-control differences, given the observed effect sizes at each region of interest, based on two-tailed t -tests, using G*Power Version 3.1. For each region of interest, we also estimated N_{80} : the total number of samples required, per group, to achieve 80% power to detect group differences using a t -test at the threshold of $P < 0.05$ (two-tailed).

Results

Participant demographics

The sample size-weighted mean age across all epilepsy samples was 34.4 (range: 26.2–40) years, and the weighted mean age of healthy controls was 33.3 (range: 25.2–42.3) years. The weighted mean age at onset of epilepsy and duration of epilepsy were 17.6 (range: 12.1–28.2) years and 17.4 (range: 8.3–28) years, respectively. Females comprised 57% of the total epilepsy sample (range: 34–75% by individual sample), and 53% of the controls (range: 31–71% by individual sample). Case-control differences in age were observed at 8 of 24 research centres, and case-control differences in sex were observed at 2 of 24 research centres (Supplementary Table 5); hence, age and sex were included as covariates in all group comparisons.

Volumetric findings

Compared to controls, the aggregate all-epilepsies group exhibited lower volumes in the left ($d = -0.36$; $P = 1.31 \times 10^{-6}$) and right thalamus ($d = -0.37$; $P = 7.67 \times 10^{-14}$), left ($d = -0.35$; $P = 3.04 \times 10^{-7}$) and right hippocampus ($d = -0.34$; $P = 6.63 \times 10^{-10}$), and the right pallidum ($d = -0.32$; $P = 8.32 \times 10^{-9}$). Conversely, the left ($d = 0.29$; $P = 2.14 \times 10^{-12}$) and right ($d = 0.27$; $P = 3.73 \times 10^{-15}$) lateral ventricles were enlarged across all epilepsies when compared to controls (Table 2 and Fig. 2A). A supplementary analysis of all-epilepsies,

excluding individuals with hippocampal sclerosis or other lesions, revealed similar patterns of volume loss in the right thalamus and pallidum, and bilaterally enlarged ventricles; however, volume differences were not observed in the hippocampus (Supplementary Table 6).

The MTLE-L subgroup showed lower volumes in the left hippocampus ($d = -1.73$; $P = 1.35 \times 10^{-19}$), left ($d = -0.46$; $P = 2.19 \times 10^{-11}$) and right thalamus ($d = -0.46$; $P = 8.12 \times 10^{-5}$), left putamen ($d = -0.39$; $P = 1.07 \times 10^{-6}$), and right pallidum ($d = -0.45$; $P = 5.48 \times 10^{-7}$). As in the overall group comparison, we observed larger left ($d = 0.47$; $P = 1.96 \times 10^{-7}$) and right lateral ventricles ($d = 0.36$; $P = 8.95 \times 10^{-5}$) in MTLE-L patients relative to controls (Table 2 and Fig. 2B).

The MTLE-R subgroup showed lower volumes across a number of regions in the right hemisphere only, including the hippocampus ($d = -1.91$; $P = 6.36 \times 10^{-37}$), thalamus ($d = -0.73$; $P = 1.6 \times 10^{-12}$), and pallidum ($d = -0.45$; $P = 3.96 \times 10^{-7}$), together with increased volumes of the left ($d = 0.39$; $P = 1.52 \times 10^{-6}$) and right lateral ventricles ($d = 0.44$; $P = 6.57 \times 10^{-12}$) compared to controls (Table 2 and Fig. 2C).

The IGE subgroup showed lower volumes in the right thalamus ($d = -0.4$; $P = 3.6 \times 10^{-6}$) compared to controls (Table 2 and Fig. 2D).

The all-other-epilepsies subgroup showed lower volumes in the right thalamus ($d = -0.31$; $P = 7.9 \times 10^{-11}$) and the right pallidum ($d = -0.24$; $P = 8.1 \times 10^{-5}$) compared to controls. The all-other-epilepsies subgroup also showed significant enlargements of the left ($d = 0.33$; $P = 5.1 \times 10^{-7}$) and right amygdala ($d = 0.22$; $P = 1.46 \times 10^{-4}$), and the left ($d = 0.2$; $P = 1.2 \times 10^{-5}$) and right lateral ventricles ($d = 0.21$; $P = 4.62 \times 10^{-6}$) compared to controls (Table 2 and Fig. 2E).

All volume differences can be visualized using the interactive ENIGMA-Viewer tool (Zhang *et al.*, 2017), at http://enigma-viewer.org/ENIGMA_epilepsy_subcortical.html (Supplementary material). Volume differences significant after FDR adjustment can also be visualized at http://enigma-viewer.org/ENIGMA_epilepsy_subcortical_fdr.html (Supplementary Tables 26–30).

Cortical thickness findings

The all-epilepsies group showed reduced thickness of cortical grey matter across seven regions bilaterally, including the left ($d = -0.38$; $P = 1.82 \times 10^{-18}$) and right precentral gyri ($d = -0.4$; $P = 8.85 \times 10^{-20}$), left ($d = -0.32$; $P = 2.11 \times 10^{-15}$) and right caudal middle frontal gyri ($d = -0.31$; $P = 2.09 \times 10^{-9}$), left ($d = -0.31$; $P = 2.05 \times 10^{-6}$) and right paracentral gyri ($d = -0.32$; $P = 2.19 \times 10^{-9}$), left ($d = -0.19$; $P = 1.29 \times 10^{-4}$) and right pars triangularis ($d = -0.2$; $P = 4.25 \times 10^{-8}$), left ($d = -0.28$; $P = 1.51 \times 10^{-7}$) and right superior frontal gyri ($d = -0.27$; $P = 4.49 \times 10^{-6}$), left ($d = -0.19$; $P = 1.05 \times 10^{-5}$) and right transverse temporal gyri ($d = -0.18$; $P = 2.81 \times 10^{-5}$), and left ($d = -0.23$; $P = 9.87 \times 10^{-5}$) and right

Table 2 Effect size differences between epilepsy cases and healthy controls (Cohen's *d*) for the mean volume of subcortical structures, controlling for age, sex and intracranial volume

Structure	Phenotype	Cohen's <i>d</i>	SE	Z score	95% CI	P-value	<i>f</i> ²	N ₈₀	Number of controls	Number of cases
Amygdala (LH)	All-other-epilepsies	0.327	0.065	5.024	0.199–0.455	5.05 × 10 ⁻⁷	45.470	148	1448	998
Amygdala (RH)	All-other-epilepsies	0.218	0.057	3.799	0.106–0.333	1.46 × 10 ⁻⁴	31.256	335	1422	989
Hippocampus (LH)	MTLE-L	-1.728	0.191	-9.056	-2.102 to -1.354	1.35 × 10 ⁻¹⁹	85.532	7	1412	410
	All epilepsies	-0.353	0.069	-5.121	-0.488 to -0.217	3.04 × 10 ⁻⁷	71.845	127	1707	2125
Hippocampus (RH)	MTLE-R	-1.906	0.15	-12.694	-2.2 to -1.611	6.36 × 10 ⁻³⁷	72.476	6	1286	336
	All epilepsies	-0.336	0.054	-6.175	-0.443 to -0.229	6.63 × 10 ⁻¹⁰	54.801	141	1719	2129
Lateral ventricle (LH)	MTLE-L	0.465	0.089	5.203	0.289–0.640	1.96 × 10 ⁻⁷	43.124	74	1417	414
	MTLE-R	0.39	0.081	4.808	0.231–0.549	1.52 × 10 ⁻⁶	26.750	105	1291	338
	All epilepsies	0.288	0.041	7.025	0.207–0.368	2.14 × 10 ⁻¹²	23.338	191	1722	2135
Lateral ventricle (RH)	All-other-epilepsies	0.198	0.045	4.373	0.109–0.287	1.23 × 10 ⁻⁵	0.218	402	1452	996
	MTLE-R	0.444	0.065	6.867	0.317–0.57	6.57 × 10 ⁻¹²	0.003	81	1292	338
	MTLE-L	0.363	0.093	3.917	0.1814–0.544	8.95 × 10 ⁻⁵	47.227	121	1418	414
	All epilepsies	0.268	0.034	7.864	0.2–0.334	3.73 × 10 ⁻¹⁵	0	220	1722	2137
Pallidum (RH)	All-other-epilepsies	0.212	0.046	4.581	0.122–0.303	4.62 × 10 ⁻⁶	3.528	350	1453	996
	MTLE-L	-0.452	0.09	-5.009	-0.628 to -0.275	5.48 × 10 ⁻⁷	43.985	78	1406	414
	MTLE-R	-0.451	0.089	-5.071	-0.624 to -0.276	3.96 × 10 ⁻⁷	36.432	79	1278	332
	All epilepsies	-0.316	0.055	-5.762	-0.424 to -0.208	8.32 × 10 ⁻⁹	55.575	159	1710	2112
Putamen (LH)	All-other-epilepsies	-0.235	0.060	-3.942	-0.352 to -0.118	8.07 × 10 ⁻⁵	36.141	286	1440	976
	MTLE-L	-0.385	0.079	-4.878	-0.539 to -0.23	1.07 × 10 ⁻⁶	28.474	107	1352	410
Thalamus (LH)	MTLE-L	-0.843	0.126	-6.693	-1.089 to -0.595	2.19 × 10 ⁻¹¹	70.462	24	1384	408
	All epilepsies	-0.358	0.074	-4.839	-0.503 to -0.213	1.31 × 10 ⁻⁶	75.649	124	1687	2104
Thalamus (RH)	MTLE-R	-0.727	0.103	-7.066	-0.928 to -0.525	1.60 × 10 ⁻¹²	51.499	31	1285	335
	MTLE-L	-0.462	0.117	-3.941	-0.691 to -0.232	8.12 × 10 ⁻⁵	67.376	75	1412	414
	IGE	-0.403	0.087	-4.633	-0.574 to -0.233	3.60 × 10 ⁻⁶	39.715	98	1210	363
	All epilepsies	-0.368	0.049	-7.476	-0.464 to -0.271	7.67 × 10 ⁻¹⁴	44.822	117	1716	2137
	All-other-epilepsies	-0.305	0.047	-6.502	-0.397 to -0.213	7.92 × 10 ⁻¹¹	4.985	170	1446	998

CI = confidence interval; LH = left hemisphere; RH = right hemisphere; SE = standard error; *f*² = heterogeneity index; N₈₀ = number of subjects required in each group to yield 80% power to detect significant group differences (*P* < 0.05, two-tailed). Uncorrected *P*-values are reported. Subcortical structures that failed to survive Bonferroni correction (*P* < 1.49 × 10⁻⁴) are not reported (see 'Materials and methods' section for statistical threshold determination). See Supplementary material for a full list of volume differences with adjustment for false discovery rate (FDR).

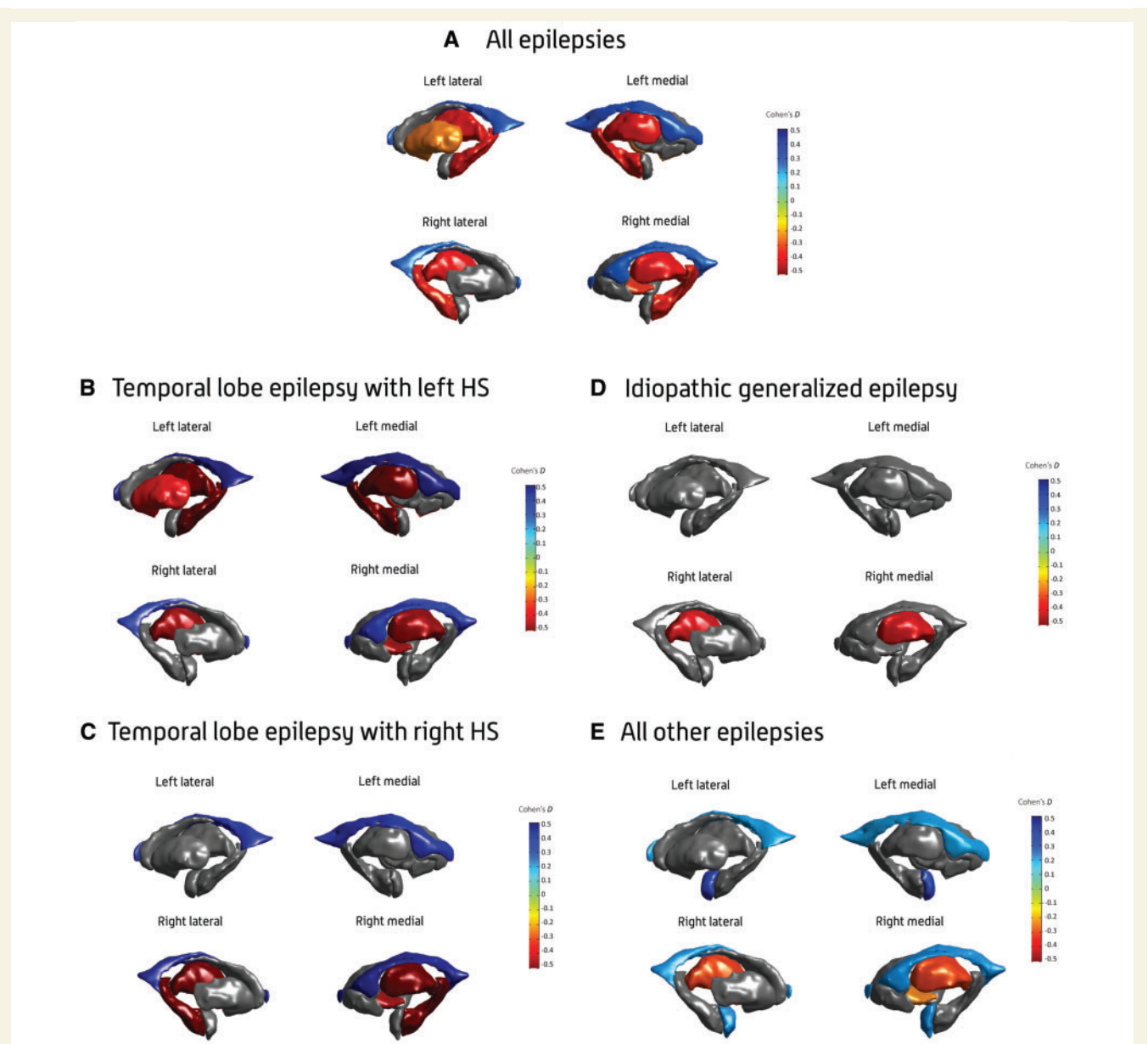


Figure 2 Subcortical volume findings. Cohen's *d* effect size estimates for case-control differences in subcortical volume, across the (A) all-epilepsies, (B) mesial temporal lobe epilepsies with left hippocampal sclerosis (HS; MTLE-L), (C) mesial temporal lobe epilepsies with right hippocampal sclerosis (MTLE-R), (D) idiopathic generalized epilepsies (IGE), and (E) all-other-epilepsies groups. Cohen's *d* effect sizes were extracted using multiple linear regressions, and pooled across research centres using random-effects meta-analysis. Subcortical structures with *P*-values $< 1.49 \times 10^{-4}$ are shown in heatmap colours; strength of heat map is determined by the size of the Cohen's *d* ($d < 0$ = blue, $d > 0$ = yellow/red). Image generated using MATLAB, with annotations added using Adobe Photoshop. An interactive version of this figure is available online, via 'ENIGMA-Viewer': http://enigma-viewer.org/ENIGMA_epilepsy_subcortical.html. See Supplementary material for guidelines on how to use the interactive visualization.

supramarginal gyri ($d = -0.22$; $P = 5.24 \times 10^{-5}$). The all-epilepsies group also showed unilaterally thinner right cuneus ($d = -0.2$; $P = 9.68 \times 10^{-8}$), right pars opercularis ($d = -0.18$; $P = 6.48 \times 10^{-7}$), right precuneus ($d = -0.28$; $P = 2.7 \times 10^{-5}$), and left entorhinal gyrus ($d = -0.26$; $P = 2.04 \times 10^{-5}$), compared to healthy controls (Table 3 and Fig. 3A). Supplementary analysis in a non-lesional epilepsy subgroup revealed a similar pattern of cortical thickness differences compared to controls, suggesting that the

changes observed in our main analysis were not driven by the inclusion of patients with hippocampal sclerosis or other common lesions (Supplementary Table 7).

The MTLE-L and MTLE-R subgroups showed distinct patterns of cortical thickness reductions when compared to healthy controls (Table 3, Fig. 3B and C). In MTLE-R, lower cortical thickness was reported across four motor regions, including the left ($d = -0.51$; $P = 7.67 \times 10^{-7}$) and right paracentral gyri ($d = -0.42$; $P = 6.24 \times 10^{-11}$),

Table 3 Effect size differences between epilepsy cases and healthy controls (Cohen's *d*) for the mean thickness of cortical structures, controlling for age, sex and intracranial volume

Structure	Phenotype	Cohen's <i>d</i>	SE	Z score	95% CI	P-value	<i>f</i> ²	N ₈₀	Number of controls	Number of cases
Caudal middle frontal gyrus (LH)	MTLE-L	-0.403	0.07	-5.789	-0.538 to -0.2663	7.07×10^{-9}	13.807	98	1344	412
	All epilepsies	-0.319	0.04	-7.935	-0.397 to -0.24	2.11×10^{-15}	17.112	156	1650	2061
	All other epilepsies	-0.291	0.045	-6.425	-0.38 to -0.202	1.32×10^{-10}	0	197	1447	1000
Caudal middle frontal gyrus (RH)	MTLE-L	-0.441	0.087	-5.089	-0.611 to -0.271	3.61×10^{-7}	39.444	82	1348	412
	All epilepsies	-0.307	0.051	-5.991	-0.407 to -0.206	2.09×10^{-9}	46.443	168	1653	2059
	All other epilepsies	-0.212	0.045	-4.699	-0.301 to -0.124	2.62×10^{-6}	0	350	1451	998
Cuneus (RH)	All other epilepsies	-0.234	0.045	-5.186	-0.323 to -0.146	2.15×10^{-7}	0	288	1449	996
	All epilepsies	-0.204	0.038	-5.333	-0.279 to -0.129	9.68×10^{-8}	11.423	379	1651	2057
	MTLE-L	-0.445	0.072	-6.158	-0.5865 to -0.303	7.35×10^{-10}	0	81	1102	303
Entorhinal gyrus (LH)	All epilepsies	-0.264	0.062	-4.261	-0.385 to -0.142	2.04×10^{-5}	56.648	227	1402	1724
	MTLE-L	-0.359	0.069	-5.183	-0.494 to -0.223	2.19×10^{-7}	13.465	123	1339	412
	All other epilepsies	-0.211	0.045	-4.659	-0.299 to -0.122	3.18×10^{-6}	2.50×10^{-3}	354	1450	997
Lateral occipital gyrus (RH)	All other epilepsies	-0.180	0.045	-3.972	-0.268 to -0.091	7.12×10^{-5}	1.25 $\times 10^{-2}$	491	1450	996
	Lingual gyrus (RH)	-0.505	0.102	-4.944	-0.705 to -0.305	7.67×10^{-7}	52.283	63	1292	338
	Paracentral gyrus (LH)	-0.426	0.099	-4.313	-0.62 to -0.232	1.61×10^{-5}	53.165	88	1344	412
Paracentral gyrus (RH)	All epilepsies	-0.311	0.065	-4.748	-0.439 to -0.182	2.05×10^{-6}	67.476	164	1650	2061
	All other epilepsies	-0.257	0.045	-5.680	-0.346 to -0.168	1.34×10^{-8}	0	239	1447	1000
	MTLE-R	-0.421	0.064	-6.538	-0.548 to -0.295	6.24×10^{-11}	0.407	90	1296	338
Parahippocampal gyrus (LH)	MTLE-L	-0.378	0.075	-5.021	-0.526 to -0.231	5.14×10^{-7}	23.536	111	1348	412
	All other epilepsies	-0.351	0.045	-7.733	-0.44 to -0.262	1.05×10^{-14}	3.43×10^{-3}	129	1451	998
	All epilepsies	-0.315	0.053	-5.983	-0.418 to -0.212	2.19×10^{-9}	49.261	160	1654	2059
Pars opercularis (RH)	MTLE-L	-0.3	0.073	-4.11	-0.444 to -0.1572	3.95×10^{-5}	19.366	176	1335	410
	MTLE-R	-0.271	0.071	-3.8	-0.411 to -0.131	1.45×10^{-4}	12.105	215	1295	338
	All epilepsies	-0.177	0.036	-4.976	-0.247 to -0.107	6.48×10^{-7}	2.624	503	1652	2059
Pars triangularis (LH)	All epilepsies	-0.192	0.05	-3.828	-0.2897 to -0.094	1.29×10^{-4}	44.414	427	1650	2060
	MTLE-L	-0.285	0.06	-4.738	-0.403 to -0.167	2.16×10^{-6}	0	195	1346	412
	All epilepsies	-0.199	0.036	-5.48	-0.27 to -0.128	4.25×10^{-8}	4.66	398	1652	2058
Precentral gyrus (LH)	All other epilepsies	-0.210	0.045	-4.650	-0.299 to -0.122	3.32×10^{-6}	2.58×10^{-3}	357	1449	998
	MTLE-L	-0.466	0.081	-5.755	-0.625 to -0.307	8.64×10^{-9}	31.602	74	1339	412
	MTLE-R	-0.415	0.09	-4.596	-0.592 to -0.238	4.31×10^{-6}	40.044	93	1287	338
Precentral gyrus (RH)	All epilepsies	-0.384	0.044	-8.768	-0.469 to -0.298	1.82×10^{-18}	27.649	108	1645	2058
	All other epilepsies	-0.375	0.046	-8.237	-0.464 to -0.286	1.76×10^{-16}	5.59×10^{-3}	113	1442	997
	IGE	-0.342	0.071	-4.78	-0.482 to -0.201	1.75×10^{-6}	0.003	136	1043	297
Precuneus (LH)	MTLE-R	-0.52	0.086	-6.073	-0.687 to -0.352	1.25×10^{-9}	33.288	60	1293	337
	MTLE-L	-0.492	0.078	-6.335	-0.6436 to -0.339	2.37×10^{-10}	26.33	66	1345	412
	All epilepsies	-0.399	0.044	-9.102	-0.485 to -0.313	8.85×10^{-20}	27.929	100	1649	2054
Precuneus (RH)	IGE	-0.39	0.072	-5.442	-0.531 to -0.25	5.27×10^{-8}	0.005	105	1044	295
	All other epilepsies	-0.348	0.045	-7.672	-0.437 to -0.259	1.70×10^{-14}	0	131	1448	996
	MTLE-L	-0.536	0.135	-3.965	-0.801 to -0.271	7.35×10^{-5}	75.18	56	1343	412
All other epilepsies	-0.178	0.047	-3.819	-0.27 to -0.087	1.34×10^{-4}	4.474	497	1446	998	

(continued)

Table 3 Continued

Structure	Phenotype	Cohen's <i>d</i>	SE	Z score	95% CI	P-value	<i>I</i> ²	<i>N</i> ₈₀	Number of controls	Number of cases
Precuneus (RH)	MTLE-L	-0.473	0.104	-4.558	-0.676 to -0.27	5.16 × 10 ⁻⁶	57.498	72	1348	412
	All epilepsies	-0.275	0.066	-4.197	-0.404 to -0.147	2.70 × 10 ⁻⁵	67.608	209	1654	2055
Superior frontal gyrus (LH)	All other epilepsies	-0.238	0.053	-4.471	-0.343 to -0.134	7.78 × 10 ⁻⁶	22.378	279	1451	994
	MTLE-L	-0.411	0.06	-6.804	-0.529 to -0.292	1.02 × 10 ⁻¹¹	0	94	1343	412
Superior frontal gyrus (RH)	All epilepsies	-0.283	0.054	-5.251	-0.389 to -0.177	1.51 × 10 ⁻⁷	51.773	197	1649	2059
	All other epilepsies	-0.243	0.059	-4.138	-0.358 to -0.128	3.51 × 10 ⁻⁵	34.545	267	1446	999
Superior parietal gyrus (LH)	MTLE-L	-0.365	0.06	-6.051	-0.483 to -0.246	1.44 × 10 ⁻⁹	0	119	1345	412
	All epilepsies	-0.269	0.059	-4.588	-0.385 to -0.154	4.49 × 10 ⁻⁶	59.483	218	1650	2058
Superior parietal gyrus (RH)	All other epilepsies	-0.235	0.052	-4.489	-0.337 to -0.132	7.15 × 10 ⁻⁶	20.049	286	1448	997
	All other epilepsies	-0.224	0.045	-4.954	-0.313 to -0.136	7.27 × 10 ⁻⁷	0.001	314	1444	996
Supramarginal gyrus (LH)	All other epilepsies	-0.220	0.045	-4.864	-0.309 to -0.131	1.15 × 10 ⁻⁶	0.002	326	1450	997
	All epilepsies	-0.232	0.06	-3.894	-0.348 to -0.115	9.87 × 10 ⁻⁵	59.391	293	1606	1965
Supramarginal gyrus (RH)	All epilepsies	-0.223	0.055	-4.045	-0.331 to -0.115	5.24 × 10 ⁻⁵	52.895	317	1597	1971
	All other epilepsies	-0.206	0.047	-4.418	-0.297 to -0.115	9.95 × 10 ⁻⁶	0	371	1395	961
Temporal pole (LH)	MTLE-L	-0.315	0.068	-4.649	-0.447 to -0.182	3.33 × 10 ⁻⁶	10.901	160	1341	410
	All other epilepsies	-0.192	0.073	-4.249	-0.456 to -0.168	2.15 × 10 ⁻⁵	15.614	163	1289	338
Transverse temporal gyrus (LH)	All epilepsies	-0.182	0.044	-4.406	-0.278 to -0.107	1.05 × 10 ⁻⁵	28.178	427	1647	2061
	All other epilepsies	-0.18	0.045	-4.188	-0.267 to -0.097	2.81 × 10 ⁻⁵	27.918	475	1654	2059
Transverse temporal gyrus (RH)	All other epilepsies	-0.18	0.045	-3.982	-0.269 to -0.091	6.84 × 10 ⁻⁵	0.012	486	1451	998

CI = confidence interval; LH = left hemisphere; RH = right hemisphere; SE = standard error; *I*² = heterogeneity index; *N*₈₀ = number of subjects required in each group to yield 80% power to detect significant group differences (*P* < 0.05, two-tailed). Uncorrected *P*-values are reported. Cortical regions that failed to survive Bonferroni correction (*P* < 1.49 × 10⁻⁴) are not reported (see 'Materials and methods' section for statistical threshold determination). See Supplementary material for a full list of cortical differences with adjustment for false discovery rate (FDR).

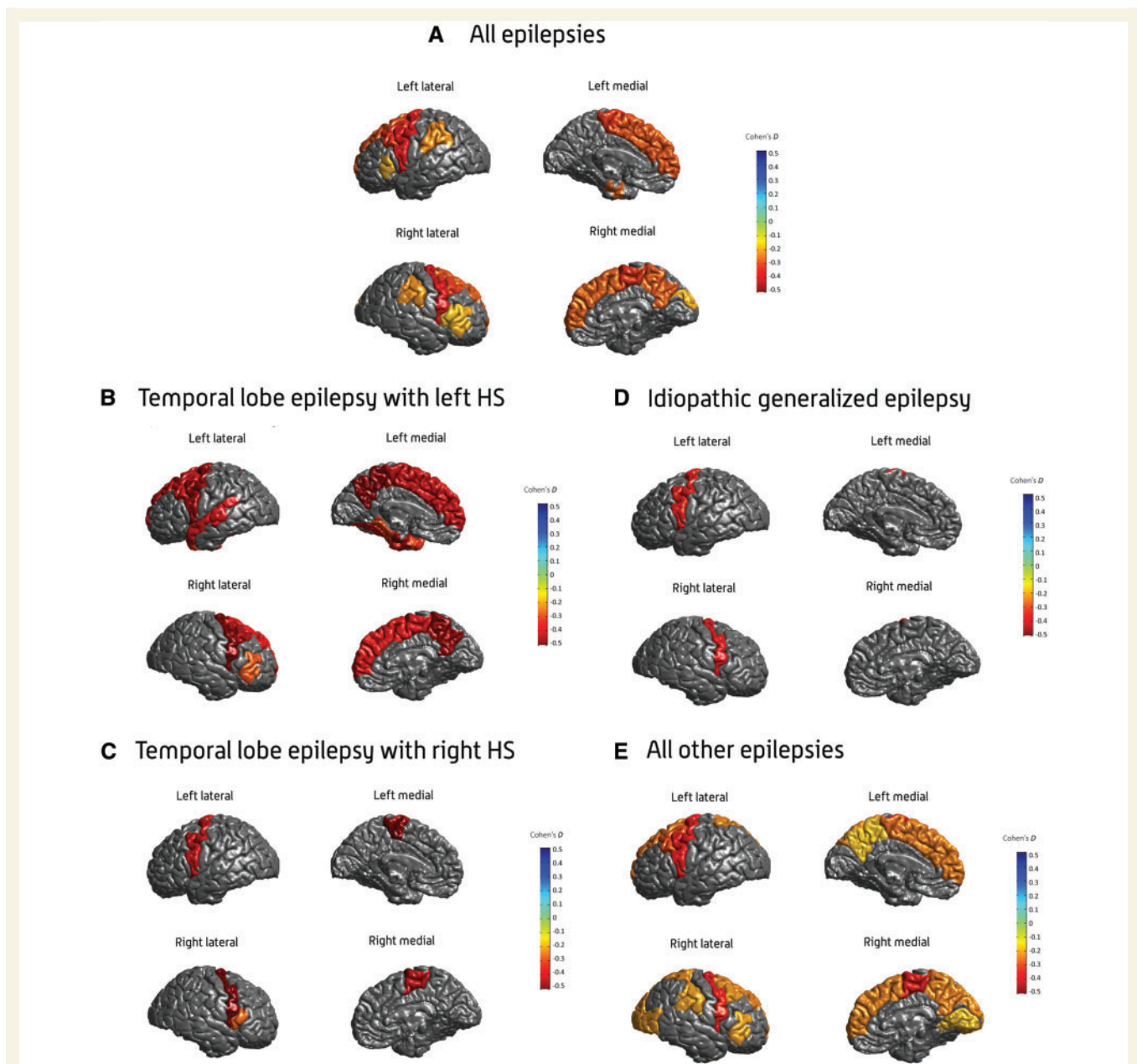


Figure 3 Cortical thickness findings. Cohen's *d* effect size estimates for case-control differences in cortical thickness, across the (A) all-epilepsies, (B) mesial temporal lobe epilepsies with left hippocampal sclerosis (MTLE-L), (C) mesial temporal lobe epilepsies with right hippocampal sclerosis (MTLE-R), (D) idiopathic generalized epilepsies (IGE), and (E) all-other-epilepsies groups. Cohen's *d* effect sizes were extracted using multiple linear regressions, and pooled across research centres using random-effects meta-analysis. Cortical structures with P -values $< 1.49 \times 10^{-4}$ are shown in heatmap colours; strength of heatmap is determined by the size of the Cohen's *d* ($d < 0 =$ blue, $d > 0 =$ yellow/red). Image generated using MATLAB with annotations added using Adobe Photoshop. An interactive version of this figure is available online, via 'ENIGMA-Viewer': http://enigma-viewer.org/ENIGMA_epilepsy_cortical.html. See Supplementary material for guidelines on how to use the interactive visualization. HS = hippocampal sclerosis.

and the left ($d = -0.42$; $P = 4.31 \times 10^{-6}$) and right precentral gyri ($d = -0.52$; $P = 1.25 \times 10^{-9}$). The MTLE-R subgroup also showed thickness changes in the left transverse temporal gyrus ($d = -0.31$; $P = 2.15 \times 10^{-5}$), and right pars opercularis ($d = -0.27$; $P = 1.45 \times 10^{-4}$) (Table 3 and Fig. 3C). By contrast, in MTLE-L, lower thickness was observed across six regions of the motor cortex, including the left ($d = -0.43$; $P = 1.61 \times 10^{-5}$) and right

paracentral gyri ($d = -0.38$; $P = 5.14 \times 10^{-7}$), left ($d = -0.47$; $P = 8.64 \times 10^{-9}$) and right precentral gyri ($d = -0.49$; $P = 2.37 \times 10^{-10}$), and left ($d = -0.54$; $P = 7.35 \times 10^{-5}$) and right precuneus ($d = -0.47$; $P = 5.16 \times 10^{-6}$). The MTLE-L group also showed thickness changes across five regions of the frontal cortex, including the left ($d = -0.41$; $P = 1.02 \times 10^{-11}$) and right superior frontal gyri ($d = -0.37$; $P = 1.44 \times 10^{-9}$), left ($d = -0.4$;

$P = 7.07 \times 10^{-9}$) and right caudal middle frontal gyri ($d = -0.44$; $P = 3.61 \times 10^{-7}$), and the right *pars triangularis* ($d = -0.29$; $P = 2.16 \times 10^{-6}$). In MTLE-L, thickness alterations were also observed in four regions of the temporal cortex, including the left temporopolar cortex ($d = -0.32$; $P = 3.33 \times 10^{-6}$), left parahippocampal gyrus ($d = -0.3$; $P = 3.95 \times 10^{-5}$), left entorhinal gyrus ($d = -0.45$; $P = 7.35 \times 10^{-10}$), and left fusiform gyrus ($d = -0.36$; $P = 2.19 \times 10^{-7}$) (Table 3 and Fig. 3B).

The IGE subgroup showed reduced thickness in the left ($d = -0.34$; $P = 1.75 \times 10^{-6}$) and right precentral gyri ($d = -0.39$; $P = 5.27 \times 10^{-8}$), when compared to healthy controls (Table 3 and Fig. 3D).

The all-other-epilepsies subgroup showed lower thickness across six cortical regions bilaterally, including the left ($d = -0.38$; $P = 1.76 \times 10^{-16}$) and right precentral gyri ($d = -0.35$; $P = 1.7 \times 10^{-14}$), left ($d = -0.26$; $P = 1.34 \times 10^{-8}$) and right paracentral gyri ($d = -0.35$; $P = 1.1 \times 10^{-14}$), left ($d = -0.29$; $P = 1.32 \times 10^{-10}$) and right caudal middle frontal gyri ($d = -0.21$; $P = 2.62 \times 10^{-6}$), left ($d = -0.22$; $P = 7.27 \times 10^{-7}$) and right superior parietal gyri ($d = -0.22$; $P = 1.15 \times 10^{-6}$), left ($d = -0.24$; $P = 3.51 \times 10^{-5}$) and right superior frontal gyri ($d = -0.23$; $P = 7.15 \times 10^{-6}$), and the left ($d = -0.18$; $P = 1.34 \times 10^{-4}$) and right precuneus ($d = -0.24$; $P = 7.78 \times 10^{-6}$) compared to controls. The all-other-epilepsies group also showed unilaterally reduced thickness in six right hemispheric regions, including the cuneus ($d = -0.23$; $P = 2.15 \times 10^{-7}$), lateral occipital gyrus ($d = -0.21$; $P = 3.18 \times 10^{-6}$), *pars triangularis* ($d = -0.21$; $P = 3.32 \times 10^{-6}$), supramarginal gyrus ($d = -0.21$; $P = 9.95 \times 10^{-6}$), transverse temporal gyrus ($d = -0.18$; $P = 6.84 \times 10^{-5}$), and lingual gyrus ($d = -0.18$; $P = 7.12 \times 10^{-5}$), compared to controls (Table 3 and Fig. 3E).

An interactive 3D visualization of these results is available via the ENIGMA-Viewer tool (Zhang *et al.*, 2017), at http://enigma-viewer.org/ENIGMA_epilepsy_cortical.html (Supplementary material). Cortical thickness differences significant after FDR adjustment can also be visualized at http://enigma-viewer.org/ENIGMA_epilepsy_cortical_fdr.html (Supplementary Tables 31–35).

Duration of illness, age at onset, and age-by-diagnosis effects on brain abnormalities

A secondary analysis identified significant associations between duration of epilepsy and several affected brain regions in the all-epilepsies, MTLE-R, and all-other-epilepsies groups. In the all-epilepsies group, duration of epilepsy negatively associated with volume measures in the left hippocampus ($b = -8.32$; $P = 8.16 \times 10^{-13}$), left ($b = -13.58$; $P = 3.52 \times 10^{-15}$), and right thalamus ($b = -12.25$; $P = 1.58 \times 10^{-13}$), and right pallidum ($b = -2.67$; $P = 1.78 \times 10^{-7}$), in addition to bilateral thickness measures in the left ($b = -0.003$; $P = 2.99 \times 10^{-11}$) and right *pars*

triangularis ($b = -0.002$; $P = 4.24 \times 10^{-9}$), left ($b = -0.003$; $P = 1.61 \times 10^{-15}$) and right caudal middle frontal gyri ($b = -0.003$; $P = 1.65 \times 10^{-17}$), left ($b = -0.003$; $P = 1.77 \times 10^{-13}$) and right supramarginal gyri ($b = -0.003$; $P = 2.58 \times 10^{-19}$), left ($b = -0.003$; $P = 5.84 \times 10^{-12}$) and right precentral gyri ($b = -0.003$; $P = 2.54 \times 10^{-24}$), left ($b = -0.004$; $P = 1.94 \times 10^{-12}$) and right superior frontal gyri ($b = -0.003$; $P = 4.65 \times 10^{-11}$), left ($b = -0.004$; $P = 1.05 \times 10^{-10}$) and right transverse temporal gyri ($b = -0.003$; $P = 8.24 \times 10^{-10}$), and left ($b = -0.002$; $P = 5.22 \times 10^{-6}$) and right paracentral gyri ($b = -0.002$; $P = 5.63 \times 10^{-6}$). Duration of epilepsy also negatively associated with unilateral thickness measures in the right precuneus ($b = -0.003$; $P = 6.03 \times 10^{-21}$), right *pars opercularis* ($b = -0.003$; $P = 5.59 \times 10^{-13}$), and right cuneus ($b = -0.002$; $P = 1.1 \times 10^{-9}$; Supplementary Table 8). In the MTLE-R subgroup, duration of epilepsy negatively associated with volume measures in the right hippocampus ($b = -22.42$; $P = 1.1 \times 10^{-7}$), and the right thalamus ($b = -18.11$; $P = 1.84 \times 10^{-5}$), and thickness measures in the left transverse temporal gyrus ($b = -0.007$; $P = 8.39 \times 10^{-5}$; Supplementary Table 8). In the all-other-epilepsies subgroup, duration of epilepsy negatively associated with bilateral thickness measures in the left ($b = -0.003$; $P = 3.39 \times 10^{-7}$) and right caudal middle frontal gyri ($b = -0.003$; $P = 6.91 \times 10^{-8}$), left ($b = -0.003$; $P = 1.36 \times 10^{-9}$) and right superior frontal gyri ($b = -0.003$; $P = 3.16 \times 10^{-7}$), and the left ($b = -0.003$; $P = 3.17 \times 10^{-5}$) and right precuneus ($b = -0.003$; $P = 5.01 \times 10^{-9}$), in addition to unilateral thickness measures in the right precentral gyrus ($b = -0.004$; $P = 1.16 \times 10^{-12}$), right cuneus ($b = -0.003$; $P = 8.57 \times 10^{-8}$), right *pars triangularis* ($b = -0.003$; $P = 5.16 \times 10^{-7}$), and right supramarginal gyrus ($b = -0.003$; $P = 2.24 \times 10^{-7}$). Duration of epilepsy also showed a positive association with the size of the left lateral ventricle in the all-other-epilepsies group ($b = 13.6$; $P = 1.17 \times 10^{-5}$).

In the all-epilepsies group, age at onset of epilepsy negatively associated with thickness measures in the left ($b = -0.003$; $P = 2.66 \times 10^{-15}$) and right superior frontal gyri ($b = -0.003$; $P = 9.77 \times 10^{-10}$), left ($b = -0.003$; $P = 2.78 \times 10^{-9}$) and right *pars triangularis* ($b = -0.003$; $P = 6.51 \times 10^{-7}$), right *pars opercularis* ($b = -0.003$; $P = 5.4 \times 10^{-14}$), left transverse temporal gyrus ($b = -0.003$; $P = 1.03 \times 10^{-8}$), and right cuneus ($b = -0.001$; $P = 4.9 \times 10^{-6}$). In the all-other-epilepsies subgroup, age at onset negatively correlated with thickness measures in the left ($b = -0.003$; $P = 3.21 \times 10^{-8}$) and right superior frontal gyri ($b = -0.002$; $P = 1.18 \times 10^{-4}$), left ($b = -0.002$; $P = 8.42 \times 10^{-6}$) and right precuneus ($b = -0.002$; $P = 7.23 \times 10^{-5}$), right *pars triangularis* ($b = -0.003$; $P = 2.53 \times 10^{-5}$), and right supramarginal gyrus ($b = -0.002$; $P = 2.38 \times 10^{-6}$). Age at onset also positively associated with the size of the right lateral ventricle in the all-other-epilepsies subgroup ($b = 57.73$; $P = 1.62 \times 10^{-7}$).

Age at onset negatively associated with other regional volumetric and thickness measures in the all-epilepsies, IGE, MTLE-L, MTLE-R, and all-other-epilepsies groups, but these associated areas showed no significant structural differences in the primary case-control analysis (Table 1 and Supplementary Table 8).

There were no interaction effects between age and syndromic diagnosis in the all-epilepsies, MTLE-L, MTLE-R, IGE, or all-other-epilepsies groups.

Power analyses for detection of case-control differences

In our sample of 2149 individuals with epilepsy and 1727 healthy controls, we had 80% power to detect Cohen's d effect sizes as small as $d = 0.091$ at the standard alpha level of $P < 0.05$ (two-tailed), and 80% power to detect Cohen's d effect sizes as small as $d = 0.149$ at the study's stringent Bonferroni-corrected threshold of $P < 1.49 \times 10^{-4}$.

N_{80} , the number of cases and controls required to achieve 80% power to detect group differences using a two-tailed t -test at $P < 0.05$, ranged from $N_{80} = 6$, to detect group effects in the right hippocampus in our MTLE-R group, to $N_{80} = 503$, to detect group effects in the right pars opercularis in our 'all epilepsies' group (Tables 2 and 3).

Discussion

In the largest coordinated neuroimaging study of epilepsy to date, we identified a series of quantitative imaging signatures—some shared across common epilepsy syndromes, and others characteristic of selected, specific epilepsy syndromes. Our sample of 2149 individuals with epilepsy and 1727 controls provided 80% power to detect differences as small as $d = 0.091$ ($P < 0.05$, two-tailed), allowing us to identify subtle, consistent brain abnormalities that are typically undetectable on visual inspection, or overlooked using smaller case-control designs. This international collaboration addresses prior inconsistencies in the field of epilepsy neuroimaging, providing a robust, *in vivo* map of structural aberrations, upon which future studies of disease mechanisms may expand.

In the first of five cross-sectional MRI analyses, we investigated a diverse aggregation of epilepsy syndromes, putative causes, and durations of disease. This all-epilepsies group exhibited shared, diffuse brain structural differences across several regions including the thalamus, pallidum, precentral, paracentral, and superior frontal cortices. With the exception of hippocampal volume and entorhinal thickness differences (Supplementary material), these structural alterations were not driven by any specific syndrome or dataset (Supplementary Figs 3 and 7). Our findings suggest a common neuroanatomical signature of epilepsy across a wide spectrum of disease types, complementing recent evidence for shared genetic susceptibility to a wide spectrum

of epilepsies (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2014). Some structural and genetic pathways may be shared across syndromes, despite the heterogeneity of epilepsy and seizure types. This shared MRI signature underpins the contemporary shift towards the study of epilepsies as network phenomena (Caciagli *et al.*, 2014).

In MTLE, as expected, we observed hippocampal volume abnormalities ipsilateral to the patient's side of seizure onset. Neither MTLE-L nor MTLE-R showed significant contralateral hippocampal volume reductions, confirming that sporadic, unilateral MTLE is not routinely underpinned by bilateral hippocampal damage (Blümcke *et al.*, 2013). Both MTLE groups showed extrahippocampal abnormalities in the ipsilateral thalamus and pallidum, with widespread reductions in cortical thickness, supporting a growing body of literature indicating that MTLE, as an example of a specific disease constellation in the epilepsies, is also a network disease, extending beyond the mesial temporal regions (Keller *et al.*, 2014; de Campos *et al.*, 2016). Disruption of this network, notably in the thalamus (Keller *et al.*, 2015; He *et al.*, 2017) and thalamo-temporal white matter tracts (Keller *et al.*, 2015, 2017), may be associated with postoperative seizure outcome in MTLE.

Patients with left and right MTLE showed distinct patterns of structural abnormalities when compared to controls, resolving conflicting findings from smaller studies, some reporting an equal distribution of structural differences (Liu *et al.*, 2016), and others indicating more diffuse abnormalities, either in left MTLE (Keller *et al.*, 2002, 2012; Bonilha *et al.*, 2007; Kemmotsu *et al.*, 2011; de Campos *et al.*, 2016) or in right MTLE (Pail *et al.*, 2009). The structural differences observed in the present study may reflect a younger age at onset of epilepsy in left MTLE, which occurred, on average, 1.2 years earlier than those with right MTLE (Supplementary Table 20). Independent, large-scale studies of MTLE patients have confirmed a significantly earlier age at onset in left, compared to right, MTLE (Blümcke *et al.*, 2017). Duration-related effects were also observed in right, but not left, MTLE, pointing to possible biological distinctions between the two.

In IGE, a clinically and biologically distinct group of epilepsies typically associated with 'normal' MRI on clinical inspection (Woermann *et al.*, 1998), we identified reduced volume of the right thalamus, and thinner precentral gyri in both hemispheres, supporting prior reports of structural (Bernhardt *et al.*, 2009a), electroencephalographic, and functional (Gotman *et al.*, 2005) abnormalities in IGE. These IGE cases were considered typical by reviewing neurologists, suggesting that this common type of epilepsy is also associated with quantifiable structural brain abnormalities.

The precentral gyri, site of the primary motor cortex, showed bilateral structural deficits across all epilepsy groups (all-epilepsies, IGE, MTLE-L, MTLE-R, and all-other-epilepsies), without detectable inter-cohort or between-disease heterogeneity (Supplementary Figs 3–12).

Atrophy of the motor cortex has been linked to seizure frequency and duration of epilepsy in MTLE (Coan *et al.*, 2014); here, we observed a negative correlation between precentral (and postcentral) grey matter thickness and duration of epilepsy in the aggregate all-epilepsies group.

The right thalamus also showed evidence of structural compromise across all epilepsy cohorts, re-emphasizing the importance of the thalamus as a major hub in the epilepsy network (He *et al.*, 2017; Jobst and Cascino, 2017). Loss of feed-forward inhibition between the thalamus and its neocortical connections may be epileptogenic (Paz and Huguenard, 2015), and thalamocortical abnormalities have previously been reported in IGE (Gotman *et al.*, 2005; Bernhardt *et al.*, 2009a; O’Muircheartaigh *et al.*, 2012) and MTLE (Mueller *et al.*, 2010; Bernhardt *et al.*, 2012). These findings support prior ‘system epilepsies’ hypotheses of pathophysiology (Avanzini *et al.*, 2012), suggesting that a broad range of common epilepsies share vulnerability within a thalamocortical structural pathway involved in, and likely affected by, seizures (Liu *et al.*, 2003; Bernhardt *et al.*, 2013). Given this study’s cross-sectional design, we cannot determine if these are causative changes, consequences of recurrent seizures, prolonged drug treatment, or a combination of factors. The epilepsies, as a broad group, may involve progressive structural change (Caciagli *et al.*, 2017), indicating the need for large-scale longitudinal studies.

A heterogeneous subgroup of individuals without confirmed diagnoses of IGE or MTLE with hippocampal sclerosis showed similar patterns of structural alterations to those observed in the aggregate all-epilepsies cohort. The findings included enlarged ventricles, smaller right pallidum and right thalamus, and reduced thickness across the motor and frontal cortices. Hippocampal abnormalities were not observed in this subgroup, suggesting that the patterns of reduced hippocampal grey matter observed in the aggregate group were driven by the inclusion of MTLEs with hippocampal sclerosis. Unlike the IGE, MTLE, and aggregate epilepsy cohorts, this subgroup also showed bilateral enlargement of the amygdala—a phenomenon previously reported in non-lesional localization-related epilepsies (Reyes *et al.*, 2017) and non-lesional MTLEs (Takaya *et al.*, 2012; Coan *et al.*, 2013). Non-lesional MTLEs formed a large proportion of this ‘all-other-epilepsies’ cohort (43.3%; 445 individuals), but the subgroup included many other focal and unclassified syndromes, potentially obscuring specific biological interpretations. Future, sufficiently powered studies will stratify this cohort into finer-grained subtypes to delineate syndrome-specific effects.

Despite its international scale, our study has limitations. All results were derived from cross-sectional data: we cannot distinguish between historical acute damage and progressive abnormalities. We cannot disentangle the relative contributions of environmental and treatment-related factors, including antiepileptic medications, seizure types and frequencies, disease severity, language dominance, and other initial precipitating factors. On average, duration

of epilepsy was at least 10 years; longitudinal investigations of new-onset and paediatric epilepsies will provide a more comprehensive understanding. Despite using standardized image processing protocols, quality control, and statistical techniques, some brain measures showed a wide distribution of effect sizes across research centres, which may reflect sample heterogeneity and differences in scanning protocols (Supplementary material).

We observed modest thickness differences across the majority of cortical regions; Cohen’s *d* effect sizes ranged from small to moderate ($d = 0.2–0.5$), with some very small effects ($d < 0.2$) noted in the right pars opercularis, bilateral pars triangularis, and bilateral transverse temporal gyri of the aggregate all-epilepsies group. Other large-scale ENIGMA studies have reported similarly modest (albeit less widespread) cortical abnormalities in psychiatric illnesses including major depression (Schmaal *et al.*, 2016) and bipolar disorder (Hibar *et al.*, 2017b). Although epilepsy is characterized by an enduring predisposition to generate abnormal excessive or synchronous neuronal activity in the brain (Fisher *et al.*, 2014), our findings indicate that common epilepsies are associated with widespread, but relatively subtle, structural alterations of the neocortex. Replication in independent MRI cohorts, complemented by advanced imaging modalities and large-scale gene expression datasets, will help elucidate how these cortical abnormalities relate to underlying disease processes.

Overall, in the largest neuroimaging analysis of epilepsy to date, we demonstrate a pattern of robust brain structural abnormalities within and between syndromes. Specific functional interpretations cannot be inferred from grey matter differences, but lower volume and thickness measures may reflect tissue loss, supporting recent observations that the common epilepsies cannot always be considered benign (Gaitatzis *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2016; Devinsky *et al.*, 2017). The study provides a macroscopic neuroanatomical map upon which neuropathological work, animal models, and further gene expression studies, can expand. Our consortium plans to investigate more specific neuroanatomical traits and epilepsy phenotypes, explore sophisticated shape and sulcal measures, and eventually conduct genome-wide association analysis of brain measures, to improve our understanding and treatment of the epilepsies.

Web resources

All image processing, quality assurance, and statistical analysis protocols for this study can be downloaded from the ENIGMA website, at: <http://enigma.usc.edu/ongoing/enigma-epilepsy/enigma-epilepsy-protocols/>.

Acknowledgements

We thank Dr Costin Leu, Dr Sinéad Kelly, Dr Michael Nagle, and Dr Craig Hyde for helpful discussions. The

RCSI EPIGEN centre thanks Professor James F. Meaney, Dr Andrew J. Fagan, Dr Jason McMorrow and Dr Gerard Boyle for designing MR acquisition protocols and assisting in the acquisition of MRI data. The IDIBAPS-HCP centre thanks Dr Mar Carreño for providing clinical data. The NYU centre thanks Dr Heath Pardoe for designing MR acquisition protocols, and Xiuyuan Wang for conducting image quality inspection and analysis. The Bern centre thanks Prof. Kaspar Schindler, epilepsy surgery program PI, for providing clinical input, Dr Christian Weisstanner for supporting neuroradiological quality assessment, Dr. Andrea Seiler for collecting clinical information, and Dr Heinz Krestel for supporting data collection. The Tübingen centre thanks Dr Silke Klamer for recruitment of the EKUT_B cohort. The Brussels site thanks Dr Xavier De Tiège for making the control scans available. We thank the International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies for advertising the ENIGMA-Epilepsy project amongst its members. New groups are welcome to join the consortium at <http://enigma.usc.edu>

Funding

This study was supported in part by a Center grant (U54 EB020403) from the National Institutes of Health as part of the 2014 Big Data to Knowledge (BD2K) Initiative. The work was partly undertaken at UCLH/UCL, which received a proportion of funding from the Department of Health's NIHR Biomedical Research Centres funding scheme. We are grateful to the Wolfson Trust and the Epilepsy Society for supporting the Epilepsy Society MRI scanner. The UNICAMP research centre was funded by FAPESP (São Paulo Research Foundation); Contract grant number: 2013/07559-3. The BRI at the Florey Institute of Neuroscience and Mental Health acknowledges funding from the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC Project Grant 628952, Practitioner Fellowship 1060312). The UCSD research centre acknowledges support from the U.S. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NIH/NINDS, grant no. R01NS065838). The UNAM centre was funded by grants UNAM-DGAPA IB201712 and Conacyt 181508 RRC Graduate Fellowship Conacyt 329866. UNIMORE acknowledges funding from the Carismo Foundation (grant number: A.010@FCRMO RINT@MELFONINFO) and the Italian Ministry of Health, Emilia-Romagna Region (N. PRUA1GR-2013-00000120). Work conducted at Kuopio University Hospital was funded by Government Grant 5772810. Work at the University of Eastern Finland was funded by Vaajasalo Foundation and Saastamoinen Foundation. Funding sources for the King's College London research centre include: National Institute for Health Research Biomedical Research Centre at the South London and Maudsley NHS Foundation Trust; Medical Research Council (grants G0701310 and MR/K013998/

1); Epilepsy Research UK. Work conducted at the University of Liverpool was funded by the UK Medical Research Council (grant MR/K023152/1). The Cardiff University centre acknowledges funding from Cardiff University Brain Research Imaging Centre, Cardiff and Vale University Health Board, Epilepsy Research UK and Health and Care Research Wales, Wales Government. Montreal Neurological Institute funding sources include the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-57840 and CIHR MOP-123520). Dr. Bernhardt acknowledges funding through NSERC Discovery, CIHR Foundation, SickKids New Investigator, and FRQS Junior 1. NYU funding includes: Finding a Cure for Epilepsy and Seizures (FACES); The Morris and Alma Schapiro Fund; Epilepsy Foundation. The Royal Melbourne Hospital group received funding from The Royal Melbourne Hospital Neurosciences Foundation. The Bern research centre was funded by Swiss National Science Foundation, grants no. 124089, 140332 and 320030-163398. The NYU School of Medicine site acknowledges support from Finding A Cure for Epilepsy and Seizures (FACES). Dr. Chen at the Ohio State University was partially sponsored by the National Science Foundation IIS-1302755, DBI-1260795, DBI-1062057, and CNS-1531491. At the Florence research centre, Dr. Blümcke and Dr. Haaker received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement no: Health-Fs-602531-2013 (see DESIRE, <http://epilepsydesire-project.eu/>, for more information). The Xiamen University group was partly supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 61772440), and the Open Project Program of the State Key Lab of CAD&CG (No. A1706). Dr Altmann holds an MRC eMedLab Medical Bioinformatics Career Development Fellowship. This work was partly supported by the Medical Research Council [grant number MR/L016311/1], and supported by the MRC through the MRC Sudden Death Brain Bank (C.S.) and by a Project Grant (G0901254 to J.H. and M.W.) and Training Fellowship (G0802462 to M.R.).

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Adams HH, Hibar DP, Chouraki V, Stein JL, Nyquist PA, Rentería ME, et al. Novel genetic loci underlying human intracranial volume identified through genome-wide association. *Nat Neurosci* 2016; 19: 1569–82.
- Alvim MK, Coan AC, Campos BM, Yasuda CL, Oliveira MC, Morita ME, Cendes F. Progression of gray matter atrophy in seizure-free patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2016; 57: 621–9.

- Avanzini G, Manganotti P, Meletti S, Moshé SL, Panzica F, Wolf P, et al. The system epilepsies: a pathophysiological hypothesis. *Epilepsia* 2012; 53: 771–8.
- Bearden CE, Thompson PM. Emerging global initiatives in neurogenetics: the Enhancing Neuroimaging Genetics Through Meta-Analysis (ENIGMA) Consortium. *Neuron* 2017; 94: 232–6.
- Bell GS, Neligan A, Giavasi C, Keezer MR, Novy J, Peacock JL, et al. Outcome of seizures in the general population after 25 years: a prospective follow-up, observational cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87: 843–50.
- Bell GS, Neligan A, Sander JW. An unknown quantity—the worldwide prevalence of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 958–62.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995; 57: 289–300.
- Ben-Menachem E. Epilepsy in 2015: the year of collaborations for big data. *Lancet Neurol* 2016; 15: 6–7.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 2010; 51: 676–85.
- Bernasconi N. Is epilepsy a curable neurodegenerative disease? *Brain* 2016; 139: 2336–7.
- Bernhardt BC, Bernasconi N, Concha L, Bernasconi A. Cortical thickness analysis in temporal lobe epilepsy: reproducibility and relation to outcome. *Neurology* 2010; 74: 1776–84.
- Bernhardt BC, Bernasconi N, Kim H, Bernasconi A. Mapping thalamocortical network pathology in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2012; 78: 129–36.
- Bernhardt BC, Bonilha L, Gross DW. Network analysis for a network disorder: the emerging role of graph theory in the study of epilepsy. *Epilepsy Behav* 2015; 50: 162–70.
- Bernhardt BC, Kim H, Bernasconi N. Patterns of subregional mesio-temporal disease progression in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2013; 81: 1840–7.
- Bernhardt BC, Rozen DA, Worsley KJ, Evans AC, Bernasconi N, Bernasconi A. Thalamo-cortical network pathology in idiopathic generalized epilepsy: insights from MRI-based morphometric correlation analysis. *Neuroimage* 2009a; 46: 373–81.
- Bernhardt BC, Worsley KJ, Kim H, Evans AC, Bernasconi A, Bernasconi N. Longitudinal and cross-sectional analysis of atrophy in pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2009b; 72: 1747–54.
- Betting LE, Mory SB, Lopes-Cendes I, Li LM, Guerreiro MM, Guerreiro CAM, et al. MRI reveals structural abnormalities in patients with idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 2006; 67: 848–52.
- Blanc F, Martinian L, Liagkouras I, Catarino C, Sisodiya SM, Thom M. Investigation of widespread neocortical pathology associated with hippocampal sclerosis in epilepsy: a postmortem study. *Epilepsia* 2011; 52: 10–21.
- Blümcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, Pfäfflin M, et al. Histopathological findings in tissue obtained from epilepsy surgery. *N Engl J Med* 2017; 377: 1648–56.
- Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a task force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013; 54: 1315–29.
- Boedhoe PSW, Abe Y, Ameis SH, Arnold PD, Batistuzzo MC, Benedetti F, et al. Distinct subcortical volume alterations in pediatric and adult OCD: a worldwide meta- and mega-analysis. *AJP* 2017; 174: 60–9.
- Bonilha L, Rorden C, Halford JJ, Eckert M, Appenzeller S, et al. Asymmetrical extra-hippocampal grey matter loss related to hippocampal atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 286–94.
- Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 365–76.
- Caciagli L, Bernhardt BC, Hong S-J, Bernasconi A, Bernasconi N. Functional network alterations and their structural substrate in drug-resistant epilepsy. *Front Neurosci* 2014; 8: 411.
- Caciagli L, Bernasconi A, Wiebe S, Koepp MJ, Bernasconi N, Bernhardt BC. A meta-analysis on progressive atrophy in intractable temporal lobe epilepsy: time is brain? *Neurology* 2017; 89: 506–16.
- Coan AC, Campos BM, Yasuda CL, Kubota BY, Bergo FP, Guerreiro CA, et al. Frequent seizures are associated with a network of gray matter atrophy in temporal lobe epilepsy with or without hippocampal sclerosis. *PLoS One* 2014; 9: e85843.
- Coan AC, Morita ME, de Campos BM, Yasuda C, Cendes F. Amygdala enlargement in patients with mesial temporal lobe epilepsy without hippocampal sclerosis. *Front Neurol* 2013; 4: 1–5.
- de Campos B, Coan A, Yasuda C, Casseb R, Cendes F. Large-scale brain networks are distinctly affected in right and left mesial temporal lobe epilepsy. *Hum Brain Mapp* 2016; 37: 3137–52.
- Devinsky O, Friedman D, Cheng JY, Moffatt E, Kim A, Tseng ZH. Underestimation of sudden deaths among patients with seizures and epilepsy. *Neurology* 2017; 89: 886–92.
- Englot DJ, Chang EF, Auguste KI. Vagus nerve stimulation for epilepsy: a meta-analysis of efficacy and predictors of response. *J Neurosurg* 2011; 115: 1248–55.
- Fischl B. FreeSurfer. *Neuroimage* 2012; 62: 774–81.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475–82.
- French JA. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 2007; 48: 3–7.
- Gaitatzis A, Johnson AL, Chadwick DW, Shorvon SD, Sander JW. Life expectancy in people with newly diagnosed epilepsy. *Brain* 2004; 127: 2427–32.
- Gotman J, Grova C, Bagshaw A, Kobayashi E, Aghakhani Y, Dubeau F. Generalized epileptic discharges show thalamocortical activation and suspension of the default state of the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15236–40.
- Hansen TI, Brezova V, Eikenes L, Haberg A, Vangberg TR. How does the accuracy of intracranial volume measurements affect normalized brain volumes? Sample size estimates based on 966 subjects from the HUNT MRI cohort. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015; 36: 1450–6.
- He X, Doucet GE, Pustina D, Sperling MR, Sharan AD, Tracy JJ. Presurgical thalamic “hubness” predicts surgical outcome in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2017; 88: 2285–93.
- Hibar DP, Adams HHH, Jahanshad N, Chauhan G, Stein JL, Hofer E, et al. Novel genetic loci associated with hippocampal volume. *Nat Commun* 2017a; 8: 13624.
- Hibar DP, Stein JL, Rentería ME, Arias-Vasquez A, Desrivières S, Jahanshad N, et al. Common genetic variants influence human subcortical brain structures. *Nature* 2015; 520: 224–9.
- Hibar DP, Westlye LT, Doan NT, Jahanshad N, Cheung JW, Ching CRK, et al. Cortical abnormalities in bipolar disorder: an MRI analysis of 6503 individuals from the ENIGMA bipolar disorder working group. *Mol Psychiatry* 2017b, in press.
- Hibar DP, Westlye LT, van Erp TGM, Rasmussen J, Leonardo CD, Faskowitz J, et al. Subcortical volumetric abnormalities in bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 1710–16.
- Hoogman M, Bralten J, Hibar DP, Mennes M, Zwiers MP, Schweren LSJ, et al. Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *Lancet Psychiatry* 2017; 4: 310–19.
- International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 2014; 13: 893–903.

- Jobst BC and Cascino GD. Thalamus as a “hub” to predict outcome after epilepsy surgery. *Neurology* 2017; 88: 2246–7.
- Keller SS, Glenn GR, Weber B, Kreilkamp BAK, Jensen JH, et al. Preoperative automated fibre quantification predicts postoperative seizure outcome in temporal lobe epilepsy. *Brain* 2017; 140: 68–2.
- Keller SS, Mackay CE, Barrick TR, Wieschmann UC, Howard MA, Roberts N. Voxel-based morphometric comparison of hippocampal and extrahippocampal abnormalities in patients with left and right hippocampal atrophy. *Neuroimage* 2002; 16: 23–31.
- Keller SS, O’Muircheartaigh J, Traynor C, Towgood K, Barker G, Richardson MP. Thalamotemporal impairment in temporal lobe epilepsy: a combined MRI analysis of structure, integrity, and connectivity. *Epilepsia* 2014; 55: 306–15.
- Keller SS, Richardson MP, Schoene-Bake J, O’Muircheartaigh J, et al. Thalamotemporal alteration and postoperative seizures in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2015; 77: 760–74.
- Keller SS, Roberts N. Voxel-based morphometry of temporal lobe epilepsy: an introduction and review of the literature. *Epilepsia* 2008; 49: 741–57.
- Keller SS, Schoene-Bake S, Gerdes JS, Weber B, Deppe M. Concomitant fractional anisotropy and volumetric abnormalities in temporal lobe epilepsy: cross-sectional evidence for progressive neurologic injury. *PLoS One* 2012; 7: e46791.
- Kemmotsu N, Girard HM, Bernhardt BC, Bonilha B, Lin JJ, Tecoma ES, et al. MRI analysis in temporal lobe epilepsy: cortical thinning and white matter disruptions are related to side of seizure onset. *Epilepsia* 2011; 52: 2257–66.
- Labate A, Cerasa A, Aguglia U, Mumoli L, Quattrone A, Gambardella A. Neocortical thinning in ‘benign’ mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52: 712–17.
- Liu M, Bernhardt BC, Bernasconi A, Bernasconi N. Gray matter structural compromise is equally distributed in left and right temporal lobe epilepsy. *Human Brain Mapping* 2016; 37: 515–24.
- Liu RSN, Lemieux L, Bell GS, Hammers A, Sisodiya SM, Bartlett PA, et al. Progressive neocortical damage in epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53: 312–24.
- Mueller SG, Laxer KD, Barakos J, Cheong I, Finlay D, Garcia P, et al. Involvement of the thalamocortical network in TLE with and without mesiotemporal sclerosis. *Epilepsia* 2010; 51: 1436–45.
- Nickels KC, Zaccariello MJ, Hamiwka LD, Wirrell EC. Cognitive and neurodevelopmental comorbidities in paediatric epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2016; 12: 465–76.
- O’Muircheartaigh J, Vollmar C, Barker GJ, Kumari V, Symms MR, et al. Focal structural changes and cognitive dysfunctions in juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 2011; 76: 34–40.
- O’Muircheartaigh J, Vollmar C, Barker GJ, Kumari V, Symms MR, et al. Abnormal thalamocortical structural and functional connectivity in juvenile myoclonic epilepsy. *Brain* 2012; 135: 3635–44.
- Overvliet GM, Besseling RMH, Jansen JFA, van der Kruijs SJM, Vles JSH, Hofman PAM, et al. Early onset of cortical thinning in children with rolandic epilepsy. *Neuroimage Clin* 2013; 2: 434–9.
- Pail M, Brázdil M, Mareček R, Mikl M. An optimized voxel-based morphometric study of gray matter changes in patients with left-sided and right-sided mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis (MTLE/HS). *Epilepsia* 2009; 51: 511–18.
- Paz JT, Huguenard JR. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus? *Nat Neurosci* 2015; 18: 351–9.
- Pitkänen A, Löscher W, Vezzani A, Becker AJ, Simonato M, Lukasiuk K, et al. Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *Lancet Neurol* 2016; 15: 843–56.
- Reyes A, Thesen T, Kuzniecky R, Devinsky O, McDonald CR, et al. Amygdala enlargement: temporal lobe epilepsy subtype or nonspecific finding? *Epilepsy Res* 2017; 132: 34–40.
- Ronan L, Alhusaini S, Scanlon C, Doherty CP, Delanty N, Fitzsimons M. Widespread cortical morphologic changes in juvenile myoclonic epilepsy: evidence from structural MRI. *Epilepsia* 2012; 53: 651–8.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, et al. ILAE Classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58: 512–21.
- Schmaal L, Hibar DP, Sämann PG, Hall GB, Baune BT, Jahanshad N, et al. Cortical abnormalities in adults and adolescents with major depression based on brain scans from 20 cohorts worldwide in the ENIGMA Major Depressive Disorder Working Group. *Mol Psychiatry* 2016; 22: 900–9.
- Schmaal L, Veltman DJ, van Erp TGM, Sämann PG, Frodl T, Jahanshad N, et al. Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Mol Psychiatry* 2015; 21: 806–12.
- Stein JL, Medland SE, Vasquez AA, Hibar DP, Senstad RE, Winkler AM, et al. Identification of common variants associated with human hippocampal and intracranial volumes. *Nat Genet* 2012; 44: 552–61.
- Takaya S, Ikeda A, Takahiro M-O, Matsumoto R, Inouchi M, et al. Temporal lobe epilepsy with amygdala enlargement: a morphological and functional study. *J Neuroimaging* 2012; 24: 54–62.
- Téllez-Zenteno JF, Dhar R, Wiebe S. Long-term seizure outcomes following epilepsy surgery: a systematic review and meta-analysis. *Brain* 2005; 128: 1188–98.
- Thom M, Eriksson S, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Duncan JS, et al. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68: 928–38.
- Thompson PM, Andreassen OA, Arias-Vasquez A, Bearden CE, Boedhoe PS, Brouwer RM, et al. ENIGMA and the individual: predicting factors that affect the brain in 35 countries worldwide. *Neuroimage* 2017; 145: 389–408.
- Vaughan D, Rayner G, Tailby C, Jackson GD. MRI-negative temporal lobe epilepsy: a network disorder of neocortical connectivity. *Neurology* 2016; 87: 1934–42.
- van Erp TGM, Hibar DP, Rasmussen JM, Glahn DC, Pearlson GD, Andreassen OA, et al. Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA consortium. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 547–53.
- Viechtbauer W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J Stat Soft* 2010; 36.
- Vlooswijk MC, Jansen JF, de Krom MC, Majoie HM, Hofman PA, Backes WH, et al. Functional MRI in chronic epilepsy: associations with cognitive impairment. *Lancet Neurol* 2010; 9: 1018–27.
- Vollmar CV, O’Muircheartaigh J, Barker GJ, Symms MR, Thompson P, et al. Motor system hyperconnectivity in juvenile myoclonic epilepsy: a cognitive functional magnetic resonance imaging study. *Brain* 2011; 134: 1710–19.
- Woermann FG, Sisodiya SM, Free SL, Duncan JS. Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy. Evidence of widespread cerebral structural changes. *Brain* 1998; 121: 1661–7.
- Zhang G, Kochunov P, Hong E, Kelly S, Whelan CD, Jahanshad N, et al. ENIGMA-viewer: interactive visualization strategies for conveying effect sizes in meta-analysis. *BMC Bioinformatics* 2017; 18 (Suppl 6): 253.

ANEXO 3

Progression of gray matter atrophy in seizure-free patients with temporal lobe epilepsy.

Epilepsia 2016;57:621-629.

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Dec 18, 2018

This Agreement between Mrs. Marina Alvim ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4491850928891
License date	Dec 18, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Epilepsia
Licensed Content Title	Progression of gray matter atrophy in seizure-free patients with temporal lobe epilepsy
Licensed Content Author	Fernando Cendes, Marcia E. Morita, Mariana C. Oliveira, et al
Licensed Content Date	Feb 11, 2016
Licensed Content Volume	57
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	THE RELATIONSHIP BETWEEN INFLAMMATORY MARKERS AND HIPPOCAMPAL AND EXTRA-HIPPOCAMPAL ATROPHY PATTERNS IN PATIENTS WITH TEMPORARY LOBE EPILEPSY
Expected completion date	Feb 2019
Expected size (number of pages)	100
Requestor Location	Mrs. Marina Alvim Rua Hermantino Coelho, 691 Campinas, SP 13087-500 Brazil Attn: Mrs. Marina Alvim
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	



Progression of gray matter atrophy in seizure-free patients with temporal lobe epilepsy

Marina K. M. Alvim, Ana C. Coan, Brunno M. Campos, Clarissa L. Yasuda, Mariana C. Oliveira, Marcia E. Morita, and Fernando Cendes

Epilepsia, 57(4):621–629, 2016
doi: 10.1111/epi.13334

SUMMARY

Objectives: To investigate the presence and progression of gray matter (GM) reduction in seizure-free patients with temporal lobe epilepsy (TLE).

Methods: We enrolled 39 consecutive TLE patients, seizure-free for at least 2 years—20 with magnetic resonance imaging (MRI) signs of hippocampal sclerosis (TLE-HS), 19 with normal MRI (TLE-NL), and 74 healthy controls. For longitudinal analysis, we included individuals who had a second MRI with minimum interval of 18 months: 21 patients (10 TLE-HS, 11 TLE-NL) and 11 controls. Three-dimensional (3D) T₁-weighted images acquired in 3 Tesla MRI were analyzed with voxel-based morphometry (VBM). The images of patients with right-sided interictal epileptogenic zone (EZ) were right–left flipped, as well as a comparable proportion of controls. **Cross-sectional analysis:** The patients' images from each group were compared to controls to investigate differences in GM volumes. **Longitudinal analysis:** The first and second images were compared in each group to look for decreased GM volume.

Results: **Cross-sectional analysis:** Patients with TLE-HS had diffuse GM atrophy, including hippocampus and parahippocampal gyrus, insula, frontal, and occipital lobes ipsilateral to EZ, bilateral thalamus and contralateral orbitofrontal gyrus, and caudate. In contrast, TLE-NL group did not present significant differences compared to controls. **Longitudinal analysis:** TLE-HS presented progressive GM reduction in ipsilateral insula and occipital lobe, contralateral motor area, and bilateral temporal and frontal lobes. TLE-NL had GM progression in ipsilateral hypothalamus and parietal lobe, contralateral cerebellum, and bilateral temporal lobe. Controls did not show changes in GM volume between MRIs.

Significance: Diffuse extrahippocampal GM atrophy is present in seizure-free patients with TLE-HS. In addition, there is progressive GM atrophy in patients with and without HS. These results demonstrate that not only ongoing seizures are involved in the progression of GM atrophy. An underlying pathologic mechanism could be responsible for progressive brain volume loss in TLE patients even in seizure-free periods.

KEY WORDS: Magnetic resonance imaging, Voxel-based morphometry, Gray matter atrophy.



Dr. Marina K. M. Alvim is a doctoral student at Neuroimaging Laboratory at University of Campinas—UNICAMP.

Accepted January 13, 2016; Early View publication February 11, 2016.
Department of Neurology, Neuroimaging Laboratory, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Address correspondence to Fernando Cendes, Departamento de Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas—UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil. E-mail: fcendes@unicamp.br

Wiley Periodicals, Inc.

© 2016 International League Against Epilepsy

Patients with temporal lobe epilepsy (TLE) have diffuse temporal and extratemporal gray (GM) and white (WM) matter volume reduction.^{1–3} The recurrent seizures and duration of epilepsy are some of the suggested mechanisms of extrahippocampal atrophy in these patients.^{3,4} Indeed, this GM and WM decrease is more easily observed in patients with pharmacoresistant TLE, whereas it is more restricted and less intense in patients with adequate control

KEY POINTS

- Diffuse extrahippocampal GM atrophy occurs in patients with TLE-HS who are seizure-free with AEDs
- Seizure-free patients with TLE with and without MRI signs of HS present progression of GM atrophy
- There is a probable underlying pathologic mechanism causing progressive brain GM volume decrease in TLE, even in seizure-free periods

of seizures (including those defined previously as benign TLE).^{1–5} In addition, in patients with pharmacoresistant TLE, there is an apparent progression of atrophy over time, which was found to be associated with recurrent seizures in some studies.⁴ However, it is not clear whether these areas of diffuse atrophy in TLE are involved in the perpetuation of the seizures or they are actually a consequence of them.^{5,6}

Although TLE is classically associated with pharmacoresistant seizures, especially in patients with hippocampal sclerosis (HS),⁷ a “mild” form of TLE, with seizures easily controlled with medication, is recognized.⁸ In these patients, the presence of HS does not determine the outcome,^{9,10} and other factors, like genetic and environmental, play an important role in determining seizure severity.^{9–11} Epidemiologic studies featured patients with mild TLE as typically having seizure onset in late adolescence or adulthood, with normal neurologic and cognitive examination, and with about 30% of positive family history.⁸ Apparently, progressive decrease of hippocampal volume over time also occurs in patients with TLE and low seizure frequency.¹² However, the progression of extrahippocampal GM atrophy in TLE patients with prolonged periods of seizure freedom has not been thoroughly examined.

In the present study, we investigated the occurrence of GM reduction in patients with TLE (either with magnetic resonance imaging [MRI] signs of HS or with normal MRI) who had been seizure-free for at least 2 years. In addition, we examined whether there is a progression of GM atrophy over time in TLE patients in seizure remission.

METHODS

Patient’s selection and classification

All patients and controls were informed about the study and signed a written informed consent form approved by the ethics committee of the University of Campinas.

We enrolled 39 consecutive patients with TLE, in a retrospective study, followed at the epilepsy clinics of the University of Campinas Hospital, Campinas, Brazil, who were in seizure remission for at least 2 years before the acquisition of a structural MRI and 74 controls without neurologic or psychiatric symptoms and with normal MRI. The

control group was used for comparison of hippocampal volumetric analysis and morphometric analysis, as described below. Patients with any type of seizures, including auras, were not selected. The patients were subjected to an investigation based on clinical history, comprehensive neurologic examination, prolonged interictal electroencephalography (EEG; mean 8.8 h), and routine MRI. Ictal EEG recordings were not performed for these patient, as it would not be ethical to induce seizures in patients with a prolonged period of seizure freedom.

All patients had typical temporal lobe seizures and were classified as temporal lobe epilepsy according to the criteria of the International League Against Epilepsy (ILAE).¹³ The patients presented stereotyped seizures with TLE characteristics like viscerosensory or experiential auras, such as rising epigastric sensation, fear, déjà vu, and jamais vu, dreamy state, with or without autonomic symptoms, frequently followed by dyscognitive seizures with staring, oral, verbal, or gestural automatisms or dystonic posture of the contralateral hand.⁸ Interictal EEG studies presented either lateralized anterior or middle temporal epileptiform activity or no epileptiform abnormalities and normal background. Patients with extratemporal epileptiform or nonepileptiform abnormalities were not selected. As expected, in patients with prolonged periods of seizure freedom, six individuals did not present epileptiform activity on EEG.

Clinical data were collected retrospectively. To get homogenous quality of data for all individuals, we were able to accurately access the seizure frequency from 10 years prior to the first MRI acquisition and up to 5 years after the second MRI acquisition for all patients. During this period of evaluation, all patients, except one, remained either seizure-free or presented a low frequency of seizures. This one patient became drug resistant after the two-year period of seizure freedom. Because this patient clearly clinically diverges from all the others, we opted to exclude him from the analysis.

We performed independent visual analysis of the MRI studies and automated hippocampal volumetry in order to look for MRI signs of HS. MRI signs of HS were defined by loss of volume, increased signal intensity, and abnormal shape or positioning of the hippocampal formation.¹⁴ Automated hippocampal volumetry was performed with Freesurfer software (Version 5.3.0; <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>), according to the protocol of our institution,¹⁵ and hippocampal volumes (corrected by intracranial volumes) below or equal two standard-deviations from the control group were considered as abnormal. The visual and volumetry analysis were concordant in all cases, except one (reduced hippocampal volume detected by volumetry with no clear visual signs of HS). To keep a clear distinction between the groups with and without MRI signs of HS, we opted to exclude this patient. Therefore, according to the concordant visual and volumetry hippocampal analysis, the patients were divided into two groups: (1) MRI signs of HS

(TLE-HS, 19 patients) and (2) normal MRI (TLE-NL, 18 patients). Patients with TLE secondary to other structural lesions, such as tumors or malformations of cortical development, were not selected.

The patients had their interictal epileptogenic zone (EZ) lateralized according to electroencephalographic investigation (anterior and midtemporal interictal epileptiform discharges unilateral or bilateral with a predominance of one side). All patients with MRI signs of HS had the lateralization of the EZ concordant with the side of HS. Patients with extratemporal interictal epileptiform discharges were not selected. Duration of epilepsy was defined as the age at the first MRI minus the age of epilepsy onset.

For the longitudinal analysis, we included the individuals (patients and controls) who had a second MRI with minimum interval of 18 months from the first image and who remained seizure-free between the first and the second MRI scans.

MRI acquisition and analysis

The MRIs were acquired using a 3T scanner (Philips Achieva), in coronal, sagittal, and axial planes as well as T₁ high-resolution volumetric acquisition with 1 mm³ voxel size. The images for visual analysis were obtained perpendicular to the long axis of hippocampus, which was defined on the sagittal images for optimal analysis of this structure, and included T₁-weighted inversion recovery, T₂-weighted multiecho, and FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) images acquired in the coronal, axial and sagittal planes.

Voxel-based morphometry (VBM) analysis was done with SPM8 software (Wellcome Dept Cogn. Neurol, London; www.fil.ion.ucl.ac.uk) using T₁-weighted three-dimensional images (acquired in the sagittal plane (flip angle, 8 degrees; repetition time [TR] = 7.1 msec; echo time [TE] = 3.2 msec; matrix = 240 × 240 cm; field of view [FOV] = 240 × 240 cm). Patients with the EZ in the right side (nine TLE-HS and three TLE-NL) had their MRI images flipped in the right–left orientation, and the same was done with an equal proportion of images of controls for adequate comparison. For six patients (all TLE-NL) the side of the EZ could not be determined and these images were not flipped.

Cross-sectional VBM analysis

For the cross-sectional study, the VBM preprocessing steps included normalization of all MRI scans to the same stereotactic space (Montreal Neurological Institute [MNI] space), segmentation (to estimate the probability of each voxel being GM or WM), modulation (to compensate the deformity that occurs in normalization), and smoothing with a full width at half maximum of 8 (to render GM concentration normally distributed allowing the application of statistical parametric mapping techniques). DARTEL algorithm was used to increase the accuracy of the alignment between

subjects.¹⁶ After the VBM preprocess, the homogeneity test detected two outliers (MRIs with poor contrast quality; both from TLE-HS group), and these images were excluded. Thus, the preprocessing steps of the VBM analysis were redone with the final number of 35 patients (17 TLE-HS and 18 TLE-NL) and 74 controls.

Statistical analysis was performed using SPM8. For the cross-sectional study, we used two-sample *t*-tests to determine the differences of GM concentration between each patient's group and controls using age as a covariate (limit threshold of $p < 0.001$, extent threshold of 40 contiguous voxels).

We performed further analysis to explore the correlation between GM volume and duration of epilepsy for each TLE group (multiple regression, $p < 0.001$, minimum of 40 contiguous voxels).

Longitudinal VBM analysis

For the longitudinal study, 21 patients (10 TLE-HS and 11 TLE-NL) and 11 controls were submitted to two MRI examinations with at least an 18-month interval. All patients remained seizure-free between MRIs.

The preprocessing steps of VBM analysis were done with the VBM8 longitudinal toolbox. This toolbox permits the specific registration of the second MRI to the baseline image for each different individual and the use of individualized normalization for the specific pair of images of each subject. The preprocessing of VBM for longitudinal analysis included intrasubject realignment, bias correction, segmentation in different brain tissues, and normalization.

For the statistical analysis of the longitudinal study, three different paired *t*-tests were done, one for each group of individuals using time between the two MRI images as a covariate (TLE-HS, TLE-NL and controls) ($p < 0.001$, extent threshold of 40 contiguous voxels).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with MyStat software (Systat Software, a subsidiary of Cranes Software International Ltd, U.S.A.). All numeric data had nonparametric statistical distribution according to Shapiro-Wilk test, except "age" and "seizure onset" at cross-sectional and longitudinal studies. The following tests were used for statistical analysis: Fisher's exact test, two sample *t*-test, chi-square test, Wilcoxon-Mann-Whitney test, and analysis of variance (ANOVA).

RESULTS

All patients, except two, were under antiepileptic drug (AED) treatment in the moment of the acquisition of both MRI studies: 21 patients (60%) in monotherapy and 12 (34.3%) were using two AEDs. In the 10-year period prior to the 2 years of seizure freedom, all patients presented low frequency of seizures. The Table S1 describes the highest frequency of seizures during this period for each patient.

Cross-sectional GM quantification

Among the 35 patients, 17 (48.6%) were classified as TLE-HS and 18 (51.4%) as TLE-NL. The clinical aspects of each group are described in Table 1.

The VBM analysis showed that, in comparison with the control group, the patients with TLE-HS had diffuse GM atrophy, including the hippocampus, parahippocampal gyrus, inferior frontal gyrus, middle occipital gyrus, precentral cortex and insula ipsilateral of the EZ, bilateral thalamus and contralateral caudate, and orbitofrontal cortex (Fig. 1, Table 2).

In contrast, patients with TLE and normal MRI had no difference when compared with the control group.

In TLE-HS group, epilepsy duration was correlated with diffuse GM atrophy, including the temporal lobes, but also bilateral frontal and parietal regions, anterior cingulate contralateral cerebellum, and insula. In TLE-NL, duration of epilepsy was observed only in the bilateral cerebellum (Fig. 2; Table S2).

Longitudinal GM quantification

The interval between the MRI examinations varied from 18 to 56 months (median 31 months in TLE-HS group, and 34 months in both TLE-NL and controls groups). All patients remained free of any type of epileptic seizures between the two MRI studies. The clinical data of patients and controls included in the longitudinal study are presented in Table 3.

Paired *t*-test of both MRI studies in TLE-HS patients showed progression of GM atrophy in the second MRI in insula parietal and temporal lobes ipsilateral to the EZ; contralateral cingulum, medial frontal gyrus and superior motor area; bilateral cingulum, hippocampus, parahippocampal, orbitofrontal and superior temporal gyrus. Paired *t*-test in TLE-NL showed progression of GM atrophy in the second MRI in fusiform gyrus, hypothalamus, rolandic operculum, insula, pre- and postcentral gyrus, inferior parietal and temporal lobes ipsilateral to EZ, as well as in contralateral cerebellum and middle temporal gyrus. (Fig. 3, Table 4). Paired

Table 1. Clinical aspects—cross-sectional study

	TLE-HS	TLE-NL	p-Value
Number of patients	17	18	
Age (mean/range)	51 years (30–76)	39 years (19–60)	0.004 ^a
Sex (%)	Female: 9 (55.9) Male: 8 (47.1)	Female: 7 (38.9) Male: 11 (61.1)	0.41 ^b
Seizure onset (mean/range)	15 years (1–37)	17 years (3–36)	0.91 ^a
Duration of epilepsy (median/range)	35 years (9–64)	23 years (5–42)	0.19 ^c
Family history (%)	3 (17)	9 (50)	0.075 ^d
Seizure-free period at MRI acquisition (median/range)	3 years (2–10)	4 years (2–11)	0.183 ^c
Number of used AED (median/range)	3 (1–5)	3 (1–5)	0.063 ^c
Number of AED at MRI (median/range)	2 (1–2)	1 (0–2)	0.002 ^c
Hours of EEG monitoring (median/range)	4.8 h (1–35)	12.6 h (1–51)	0.987 ^c

TLE-HS, patients with MRI signs of HS; TLE-NL, patients with normal MRI.
^aTwo sample *t*-test.
^bChi-square test.
^cWilcoxon-Mann-Whitney Test.
^dFisher's exact test.

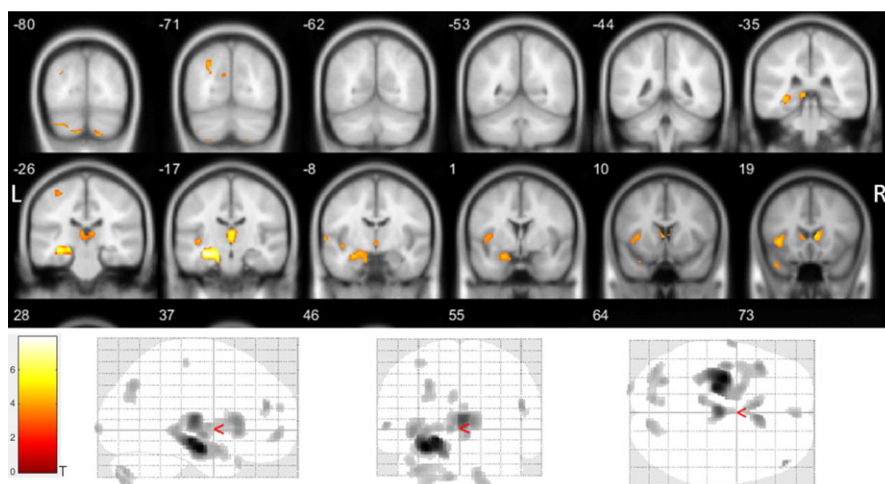


Figure 1.

Patients with hippocampal sclerosis (TLE-HS) compared with controls with VBM analysis. Figure showing areas of gray matter atrophy in patients with TLE-HS in comparison with the control group in the cross-sectional analysis (two-sample *t*-test, $p < 0.001$, minimum of 40 contiguous voxels). The hemisphere ipsilateral to the epileptogenic zone is shown in the left side. VBM, voxel based morphometry; L, left; R, right; T, *t*-score.

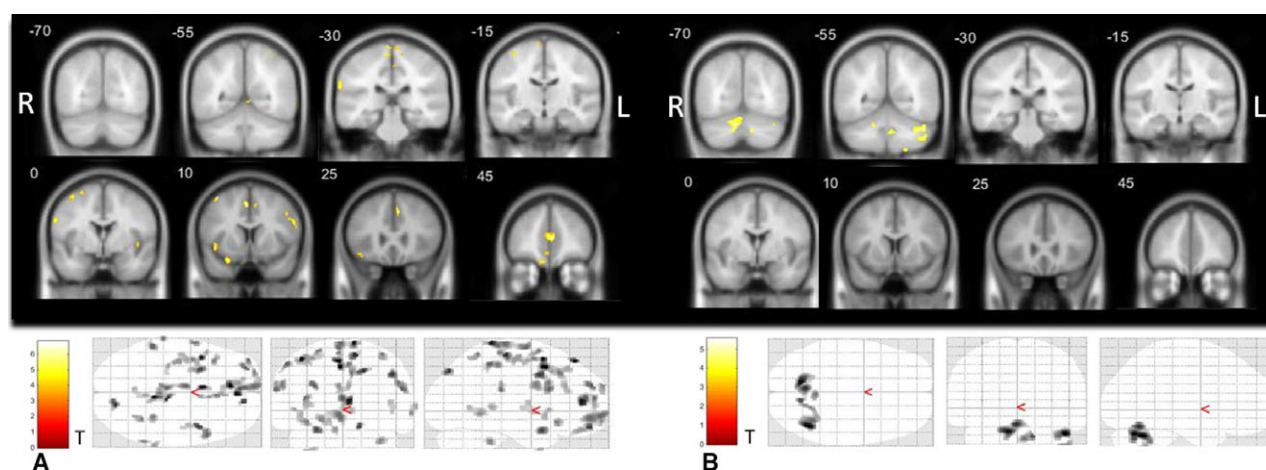
Epilepsia © ILAE

Table 2. Areas of gray matter atrophy in patients with TLE-HS compared with controls detected by VBM analysis

Group	Number of voxels	Area	T score ^a	Coordinates		
				x	y	z
TLE-HS	314	Ipsilateral cerebellum	4.274	-36	-78	-39
	47	Ipsilateral superior temporal gyrus				
	39	Ipsilateral middle temporal pole	3.783	-42	19.5	-33
	1,381	Ipsilateral parahippocampal gyrus				
	1,421	Ipsilateral hippocampus	7.915	-30	-15	-18
	236	Ipsilateral inferior frontal gyrus				
	144	Ipsilateral caudate				
	640	Ipsilateral insula	4.781	-40.5	18	-1.5
	342	Ipsilateral thalamus	6.197	0	19.5	7.5
	65	Ipsilateral cuneus	3.857	-7.5	-37.5	-28.5
	226	Ipsilateral middle occipital gyrus	4.372	-27	-72	37.5
	39	Ipsilateral frontal lobe				
	36	Ipsilateral precentral gyrus	3.778	-34.5	-25.5	58.5
	110	Contralateral orbitofrontal gyrus	4.324	3	52.5	-6
	292	Contralateral thalamus				
	215	Contralateral caudate	4.997	7.5	18	6

TLE-HS, patients with temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.

^aTwo sample t-test: uncorrected, minimum of 40 voxels.

**Figure 2.**

Areas of gray matter atrophy in patients with temporal lobe epilepsy with MRI signs of hippocampal sclerosis (A) and normal MRI (B) correlated with duration of epilepsy in VBM analysis (multiple regression, $p < 0.001$, minimum of 40 contiguous voxels). The hemisphere ipsilateral to the epileptogenic zone is shown in the left side. VBM, voxel-based morphometry; L, left; R, right.

Epilepsia © ILAE

t-test of both MRI studies in controls did not show changes of GM volume between the studies.

DISCUSSION

Our study demonstrated that there is diffuse extrahippocampal GM atrophy in patients with TLE and MRI signs of HS and prolonged periods of seizure freedom. In addition, we showed that patients with TLE with and without MRI signs of HS present progression of GM atrophy over time, even in the absence of seizures.

GM atrophy occurs in patients with TLE-HS and a prolonged seizure-free period

Recently we demonstrated that the extension of GM atrophy is subtler in TLE patients with a low seizure frequency.⁴ In the present study, different from the majority of previous reports of pharmacoresistant individuals, we extended this finding by demonstrating that even a group of patients with a prolonged period of seizure remission (and very low seizure frequency prior to seizure freedom) has diffuse GM atrophy. There are few studies with seizure-free TLE patients. Labate et al. observed decreased GM in thalami,

Table 3. Clinical aspects—longitudinal study				
	TLE-HS	TLE-NL	Controls	p-Value
Patients	10	11	11	
Age (mean/range)	51.8 years (36–61)	40 years (19–60)	41 years (27–54)	0.038 ^a
Epilepsy onset (mean/range)	17 years (3–37)	16 years (3–24)	–	0.51 ^b
Period of seizure freedom before first MRI (median/range)	3 years (2–11)	4 years (2–10)	–	0.61 ^c
Number of AED (median/range)	3 (1–5)	2 (2–4)	–	0.225 ^c
Number of AED at MRI (median/range)	2 (1–2)	1 (0–2)	–	0.013 ^c
Interval between MRIs (median/range)	31 months (20–71)	34 months (18–53)	34 months (25–49)	0.049 ^c

TLE-HS, patients with MRI signs of HS; TLE-NL, patients with normal MRI.
^aANOVA; Tukey pairwise post hoc test showed: TLE-HS versus TLE-NL: $p = 0.05$ /TLE-EH versus Controls: $p = 0.08$ /TLE-NL versus Controls: $p = 0.93$.
^bTwo-sample *t*-test.
^cWilcoxon-Mann-Whitney test.

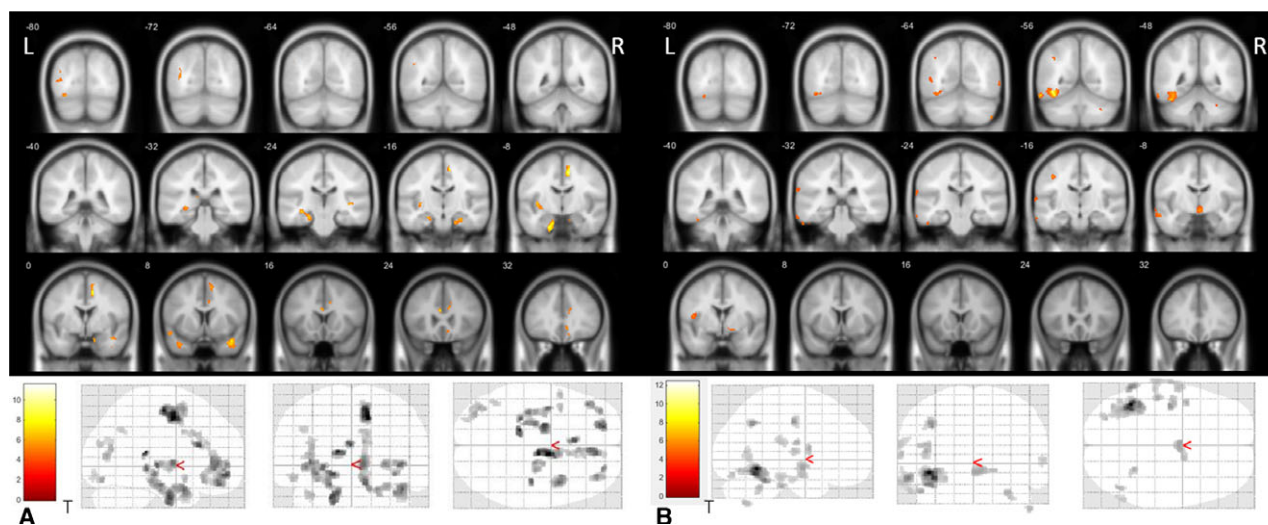


Figure 3.

Areas of progression of gray matter decreased volume in patients with temporal lobe epilepsy with or without hippocampal sclerosis with VBM analysis. Figure with the areas of progression of gray matter decreased volume in patients with temporal lobe epilepsy with MRI signs of hippocampal sclerosis (**A**) and normal MRI (**B**) in longitudinal VBM analysis (paired *t*-test, $p < 0.001$, minimum of 40 contiguous voxels). The hemisphere ipsilateral to the epileptogenic zone is shown in the left side. VBM, voxel based morphometry; L, left; R, right. *Epilepsia* © ILAE

hippocampus, and bilateral primary motor cortex in patients with HS^{1,5} and normal MRI⁵ with “mild” TLE. However, in these studies, the period of seizure freedom varied from 3 weeks to 2 months at the time of MRI or they were selected according to a low seizure frequency (no more than two partial or disabling seizures, for at least 2 years). Our study takes a step further with the unique opportunity to evaluate GM atrophy in a cohort of TLE patients in seizure remission for more than 2 years. Indeed, our patients had a prolonged period free of seizures, with a medium duration of almost 5 years and some patients achieving >10 years of seizure freedom (mean of 4.17 years, ranging from 2 to 11 years).

The GM volume reduction in patients with pharmacoresistant TLE and MRI signs of HS found in previous studies occurs beyond the mesiotemporal structures in areas such as the temporal neocortex and thalamus, as well as

areas in the frontal and occipital lobes and cerebellum.^{3,17–24} However, it is not clear if such abnormalities represent the consequence of repeated seizures or reflect other aspects of the epileptogenic process.^{6,17,24} Certainly, one possible mechanism to explain the widespread GM decrease in patients with TLE is seizure activity propagation. For example, ongoing seizure activity via the inter-hemispheric pathway could explain the contralateral thalamic atrophy.^{17,21,24} Some authors hypothesized that extra-temporal brain volume decrease could be secondary to seizure propagation based on the association between seizure frequency and duration of epilepsy with GM atrophy.⁵ However, our study demonstrates that even in TLE patients with a prolonged period of seizure freedom, GM atrophy occurs in a pattern similar to what is observed in pharmacoresistant TLE, although this atrophy is subtler. This finding is supported by other studies with

Table 4. Areas of gray matter progressive atrophy in TLE-HS and TLE-NL groups detected by VBM analysis, comparing the first and second MRI images

Group	Number of voxels	Area	T score ^a	Coordinates			
				x	y	z	
TLE-NL	40	Contralateral cerebellum	5.676	46.5	-66	-49.5	
	60	Contralateral middle temporal gyrus	5.166	60	-63	1.5	
	801	Ipsilateral fusiform gyrus	12.38	-42	-54	-12	
	265	Ipsilateral inferior temporal lobe					
	30	Ipsilateral hypothalamus					
	47	Ipsilateral rolandic operculum	6.224	-43.5	1.5	10.5	
	42	Ipsilateral insula					
	47	Ipsilateral supramarginal gyrus					
	75	Ipsilateral inferior parietal lobe					
	125	Ipsilateral precentral gyrus					
	111	Ipsilateral postcentral gyrus	6.801	-39	-15	40.5	
	TLE-HS	30	Ipsilateral superior temporal gyrus	5.728	-36	7.5	-31.5
		116	Ipsilateral parahippocampal gyrus	9.140	-19.5	-9	-34.5
188		Ipsilateral hippocampus	8.188	-27	-34.5	-3	
65		Ipsilateral insula	7.901	-37.5	-6	1.5	
81		Ipsilateral inferior orbitofrontal gyrus	7.536	-42	36	-3	
201		Ipsilateral middle occipital gyrus	6.224	-37.5	-75	9	
112		Ipsilateral middle temporal gyrus					
54		Ipsilateral cingulum	8.831	-3	22.5	19.5	
205		Contralateral superior temporal gyrus	8.345	42	6	-25.5	
145		Contralateral parahippocampal gyrus	6.859	19.5	-18	-25.5	
15		Contralateral hippocampus					
484		Contralateral superior motor area	11.537	12	-4.5	48	
280		Contralateral medial frontal gyrus					
106	Contralateral orbitofrontal gyrus						
350	Contralateral anterior cingulum						

TLE-HS, patients with temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis; TLE-NL, patients with temporal lobe epilepsy with normal MRI.
^aTwo sample t-paired test: uncorrected, minimum of 40 voxels.

seizure-free patients who have revealed decreased GM volume in thalamic and hippocampal networks in patients with HS.^{1,5,25} Certainly, we cannot conclude with the present data that the occurrence of seizures has no influence in the origin of this diffuse GM atrophy. In our data available for analysis (Table S1), we can observe that not all patients remained seizure-free during a period of 10 years, although all patients that presented seizures during this period had a low frequency of events.

In addition, in our study, duration of epilepsy was correlated with areas of GM atrophy that differed between TLE-HS and TLE-NL. TLE-HS patients had diffuse GM reduction correlated with the longer duration of epilepsy, including the temporal lobes, but also frontal and parietal areas. This is similar to what had been observed previously in patients with drug-resistant TLE-HS, although the GM reduction appears more intense in the temporal lobes of patients with TLE-HS and refractory seizures.² On the other hand, the correlation of GM atrophy in TLE-NL patients was observed only in the cerebellum. These results corroborate the idea that aspects other than seizures contribute to the GM reduction in TLE patients. The distinction of the correlation of GM atrophy in individuals with or without HS could indicate a progression of atrophy associated with the

intrinsic neurobiology of the TLE-HS. The cerebellum atrophy that was correlated with the duration of epilepsy in both groups could be associated with the cumulative use of AEDs.

Our findings suggest that extrahippocampal atrophy has multifactorial causes and cannot be defined as the origin of the pharmacoresistance. In addition, we cannot exclude the possibility that this neuronal loss could be a developmental abnormality that predisposes to epilepsy.

It is important to emphasize the necessity of separated analysis for patients with and without HS. There is evidence that these two groups present distinct neuronal network abnormalities in patients with refractory seizures,¹⁷ as well as in "milder" forms of TLE.⁵ In our group of TLE-NL, GM atrophy was not observed in the comparison with the control group. This result is in accordance with our previous study that also failed to observe GM atrophy in TLE-NL patients with a low seizure frequency.⁴ We can argue, therefore, that the presence of HS is strongly associated with a diffuse network of GM atrophy and that, probably, the mechanisms associated with the development of HS also lead to a diffuse brain volume loss.

The higher incidence of family history in patients with TLE-NL compared to TLE-HS could be related to a more

important genetic predisposition to the epilepsy in TLE-NL group. Previous studies have shown a tendency of patients with familial TLE to have better seizure control than patients with the sporadic forms of TLE.^{8,9}

Progressive GM atrophy occurs in seizure-free patients with TLE

The comparison between images of the same group of individuals in repeated MRI studies showed that there is progressive GM atrophy in TLE patients in seizure remission. The comparison between images of the same patient at different moments indicated GM atrophy more pronounced in extratemporal regions. The longitudinal analysis demonstrated that TLE-HS and TLE-NL presented similar patterns of progressive GM reduction; however, progressive mesial temporal atrophy was not detected, unlike in the previous studies with pharmacoresistant patients.⁵

The progression of GM atrophy was already demonstrated in longitudinal studies with pharmacoresistant TLE-HS patients, and the higher frequency of seizures and the longer duration of epilepsy were associated with this progression.⁴ It is known that regions secondarily involved in seizure spread can present neuronal loss,²⁶ but our patients had no seizure during the interval of the exams. One can argue that these patients may have had undetected or nonrecalled seizures, but this would be unlikely to occur in such a long period. In addition, even if these patients had subclinical, undetected seizures, these unlikely events would still make these patients different from those reporting ongoing seizures.

In our TLE patients with a prolonged period of seizure remission, aspects other than epileptic seizures must be the cause of the progressive GM decrease. One possibility is that this extratemporal pattern could be due to medication, since all of our patients were receiving AED treatment. Pardoe et al.²⁷ demonstrated that patients with epilepsy who were taking sodium valproate present reduction of total brain volume and reduced parietal cortical thickness. Another possibility is that these morphologic progressive changes are inherent to the disease and may be precursors of cognitive and psychological impairment commonly associated with epilepsy. Either way, it is important to consider that seizure control is not sufficient to prevent the progression of GM volume reduction in TLE patients, although slower progression in those seizure-free or with a low seizure frequency has been proposed.¹²

Our finding of progressive GM atrophy in patients with TLE and a prolonged period of seizure freedom suggests that extrahippocampal atrophy has multifactorial causes and cannot be defined as the origin of the pharmacoresistance. Although seizures might be responsible to some extent for this atrophy,²³ this probably does not influence the AED response.

An important limitation in our study is the relative small number of patients. Seizure-free TLE patients are not very

well studied because they are not common in tertiary epilepsy centers, and in addition, it is not ethical to perform an extensive investigation trying to record seizures in these patients. Therefore, it was not possible to analyze right and left TLE separately, although previous studies suggest different patterns of atrophy according to the laterality.^{5,22,25} The small number of individuals could explain the fact that when comparing TLE-NL versus controls in the cross-sectional analysis, we did not find significant areas of atrophy, but we found a progression of atrophy when analyzing TLE-NL patients between the two time points. This can be explained by the variation between the different individuals included in the comparison of the cross-sectional study. Indeed, volumetric neuroimaging studies show that cross-sectional analysis to detect GM differences between different groups of subjects requires eight- to ninefold more subjects than longitudinal analysis.²⁸ Another problem is the fact that all of our patients are under AED treatment, which could play a role in brain atrophy.

In conclusion, our study demonstrates that diffuse extrahippocampal GM atrophy is present in seizure-free patients with TLE with evidence of HS in MRI scans. In addition, there is progressive GM atrophy in TLE patients who are seizure-free for a prolonged period. Although frequent seizures may produce additional damage in the brain (a concept that is supported by several lines of evidence, including that the atrophy is more intense in patients with refractory seizures than in the patients studied here), our findings taken together corroborate the hypothesis that GM atrophy in TLE is not just associated with seizures and, probably, there exists an underlying pathologic mechanism causing progressive brain atrophy and dysfunction, even in seizure-free periods. Whether this is related to the frequent cognitive and psychiatric comorbidities in patients with TLE remains to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

The study supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), grant 2013/07559-3. MKMA was funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESP, grant 2015/17066-0. ACC was funded by FAPESP, grant 2013/00099-7. FC received a government research grant from the Conselho Nacional de Pesquisa, Brazil.

DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

REFERENCES

1. Labate A, Cerasa A, Aguglia U, et al. Voxel-based morphometry of sporadic epileptic patients with mesiotemporal sclerosis. *Epilepsia* 2010;51:506–510.
2. Coan AC, Campos BM, Yasuda CL, et al. Frequent seizures are associated with a network of gray matter atrophy in temporal lobe epilepsy with or without hippocampal sclerosis. *PLoS ONE* 2014;9:e85843.

3. Bilevicius E, Yasuda CL, Silva MS, et al. Antiepileptic drug response in temporal lobe epilepsy: a clinical and MRI morphometry study. *Neurology* 2010;75:1695–1701.
4. Coan AC, Appenzeller S, Bonilha L, et al. Seizure frequency and lateralization affect progression of atrophy in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2009;73:834–842.
5. Labate A, Cerasa A, Gambardella A, et al. Hippocampal and thalamic atrophy in mild temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2008;71:1094–1101.
6. Pohlmann-Eden B, Crocker CE, Schmidt MH. A conceptual framework for the use of neuroimaging to study and predict pharmacoresistance in epilepsy. *Epilepsia* 2013;54:75–79.
7. French JA, Williamson PD, Thadani VM, et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 1993;34:774–780.
8. Labate A, Gambardella A, Andermann E, et al. Benign mesial temporal lobe epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011;7:237–240.
9. Kobayashi E, Sousa SC, Lopes-Cendes I, et al. Seizure outcome and hippocampal atrophy in familial mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2001;56:166–172.
10. Cendes F, Lopes-Cendes I, Andermann E, et al. Familial temporal lobe epilepsy: a clinical heterogeneous syndrome. *Neurology* 1998;50:554–557.
11. Labate A, Ventura P, Gambardella A, et al. MRI evidence of mesial temporal sclerosis in sporadic “benign” temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2006;66:562–565.
12. Conz L, Morita ME, Coan AC, et al. Longitudinal MRI volumetric evaluation in patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Front Neurol* 2011;2:5.
13. Fisher RS, van Emde BW, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005;46:470–472.
14. Mumoli L, Labate A, Vasta R, et al. Detection of hippocampal atrophy in patients with temporal lobe epilepsy: a 3-Tesla MRI shape. *Epilepsy Behav* 2013;28:489–493.
15. Coan AC, Kubota B, Bergo FP, et al. 3T MRI quantification of hippocampal volume and signal in mesial temporal lobe epilepsy improves detection of hippocampal sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2014;35:77–83.
16. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *NeuroImage* 2007;38:95–113.
17. Riederer F, Lanzenberger R, Kaya M, et al. Network atrophy in temporal lobe epilepsy – a voxel-based morphometry study. *Neurology* 2008;71:419–425.
18. Bonilha L, Rorden C, Castellano G, et al. Voxel-based morphometry reveals gray matter network atrophy in refractory medial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 2004;61:1379–1384.
19. Pail M, Brázdil M, Marecek R, et al. An optimized voxel-based morphometric study of gray matter changes in patients with left-sided and right-sided mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis (MTLE/HS). *Epilepsia* 2010;51:511–518.
20. Keller SS, Baker G, Downes JJ, et al. Quantitative MRI of the prefrontal cortex and executive function in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009;15:186–195.
21. Li J, Zhang Z, Shang H. A meta-analysis of voxel-based morphometry studies on unilateral refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2012;98:97–103.
22. Keller SS, Wiesmann UC, Mackay CE, et al. Voxel based morphometry of grey matter abnormalities in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy: effects of side of seizure onset and epilepsy duration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:648–655.
23. Bernasconi N, Duchesne S, Janke A, et al. Whole-brain voxel-based statistical analysis of gray matter and white matter in temporal lobe epilepsy. *NeuroImage* 2004;23:717–723.
24. Santana MT, Jackowski AP, da Silva HH, et al. Auras and clinical features in temporal lobe epilepsy: a new approach on the basis of voxel-based morphometry. *Epilepsy Res* 2010;89:327–338.
25. Labate A, Cerasa A, Aguglia U, et al. Neocortical thinning in “benign” mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2011;52:712–717.
26. Mueller S, Laxer KD, Cashdollar N, et al. Voxel-based optimized morphometry (VBM) of gray and white matter in temporal lobe epilepsy (TLE) with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia* 2006;47:900–907.
27. Pardoe HR, Berg AT, Jackson GD. Sodium valproate use is associated with reduced parietal lobe thickness and brain volume. *Neurology* 2013;80:1895–1900.
28. Steen RG, Hamer RM, Lieberman JA. Measuring brain volume by MR imaging: impact of measurement precision and natural variation on sample size requirements. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:1119–1125.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Seizure frequency 10 years before MRI image acquisition.


Table S2. Areas of gray matter atrophy correlated with duration of epilepsy in patients with TLE-HS and TLE-NL compared with controls detected by VBM analysis.

ANEXO 4

HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction.

Front Neurosci 2018;12:628.

Journal List > Front Neurosci > v.12; 2018 > PMC6142787



Front Neurosci. 2018; 12: 628. PMID: PMC6142787
Published online 2018 Sep 11. doi: [10.3389/fnins.2018.00628](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00628) PMID: [30271319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30271319/)

HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction

[Yam Nath Paudel](#)¹, [Mohd. Farooq Shaikh](#)^{1*}, [Ayanabha Chakraborti](#)², [Yatinesh Kumari](#)¹, [Ángel Aledo-Serrano](#)³, [Katina Aleksovska](#)⁴, [Marina Koutsodontis Machado Alvim](#)⁵ and [Iekhsan Othman](#)¹

[Author information](#) · [Article notes](#) · [Copyright and License information](#) · [Disclaimer](#)

[Copyright](#) © 2018 Paudel, Shaikh, Chakraborti, Kumari, Aledo-Serrano, Aleksovska, Alvim and Othman.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Abstract Go to:



HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction

Yam Nath Paudel¹, Mohd. Farooq Shaikh^{1*}, Ayanabha Chakraborti², Yatinesh Kumari¹, Ángel Aledo-Serrano³, Katina Aleksovska⁴, Marina Koutsodontis Machado Alvim⁵ and Iekhsan Othman¹

OPEN ACCESS

Edited by:

Wael M. Y. Mohamed,
International Islamic University
Malaysia, Malaysia

Reviewed by:

Mariagrazia Grilli,
Università degli Studi del Piemonte
Orientale, Italy
Jitendra Kumar Sinha,
Amity University, India
Syed Shadab Raza,
ERA's Lucknow Medical College, India

*Correspondence:

Mohd. Farooq Shaikh
farooq.shaikh@monash.edu

Specialty section:

This article was submitted to
Neurodegeneration,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 29 March 2018

Accepted: 21 August 2018

Published: 11 September 2018

Citation:

Paudel YN, Shaikh MF,
Chakraborti A, Kumari Y,
Aledo-Serrano Á, Aleksovska K,
Alvim MKM and Othman I (2018)
HMGB1: A Common Biomarker
and Potential Target for TBI,
Neuroinflammation, Epilepsy,
and Cognitive Dysfunction.
Front. Neurosci. 12:628.
doi: 10.3389/fnins.2018.00628

¹ Neuropharmacology Research Laboratory, Jeffrey Cheah School of Medicine and Health Sciences, Monash University Malaysia, Bandar Sunway, Malaysia, ² Department of Surgery, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, United States, ³ Department of Neurology, Epilepsy Program, Hospital Ruber Internacional, Madrid, Spain, ⁴ Medical Faculty, Department of Neurology, "Saints Cyril and Methodius" University, Skopje, Macedonia, ⁵ Department of Neurology, Neuroimaging Laboratory, State University of Campinas, Campinas, Brazil

High mobility group box protein 1 (HMGB1) is a ubiquitous nuclear protein released by glia and neurons upon inflammasome activation and activates receptor for advanced glycation end products (RAGE) and toll-like receptor (TLR) 4 on the target cells. HMGB1/TLR4 axis is a key initiator of neuroinflammation. In recent days, more attention has been paid to HMGB1 due to its contribution in traumatic brain injury (TBI), neuroinflammatory conditions, epileptogenesis, and cognitive impairments and has emerged as a novel target for those conditions. Nevertheless, HMGB1 has not been portrayed as a common prognostic biomarker for these HMGB1 mediated pathologies. The current review discusses the contribution of HMGB1/TLR4/RAGE signaling in several brain injury, neuroinflammation mediated disorders, epileptogenesis and cognitive dysfunctions and in the light of available evidence, argued the possibilities of HMGB1 as a common viable biomarker of the above mentioned neurological dysfunctions. Furthermore, the review also addresses the result of preclinical studies focused on HMGB1 targeted therapy by the HMGB1 antagonist in several ranges of HMGB1 mediated conditions and noted an encouraging result. These findings suggest HMGB1 as a potential candidate to be a common biomarker of TBI, neuroinflammation, epileptogenesis, and cognitive dysfunctions which can be used for early prediction and progression of those neurological diseases. Future study should explore toward the translational implication of HMGB1 which can open the windows of opportunities for the development of innovative therapeutics that could prevent several associated HMGB1 mediated pathologies discussed herein.

Keywords: HMGB1, RAGE, TLR4, TBI, epilepsy, neuroinflammation, cognitive dysfunction

HIGHLIGHTS

- The nuclear protein HMGB1 is a mediator for neurological conditions such as TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive dysfunction.
- HMGB1 could be a common functional biomarker of TBI, neuroinflammation, epileptogenesis and cognitive dysfunction.
- Inhibiting the HMGB1/RAGE/TLR4 signaling axis could be a novel therapeutic strategy against several HMGB1 mediated conditions like TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive dysfunction.

INTRODUCTION

Epilepsy is a serious neurological condition characterized by spontaneous and recurrent seizures (Liu et al., 2018) affecting people of all ages. Current anti-epileptic drugs (AEDs) only provides symptomatic relief rather than interfering with the disease mechanism, as well as one third of the patients are resistant to AEDs (Ravizza et al., 2017; Walker et al., 2017). Moreover, epilepsy imposes a burden by impacting several aspects of patients and family life. In addition, the burden is intensified due to the ranges of associated comorbidities such as cognitive dysfunctions, anxiety and depression. Hence, the development of novel biomarker which can predict and assess the disease condition as well as patient's outcome of the therapy against epilepsy is an unmet clinical need. As well as there is a pressing need of exploring new therapy against epilepsy which not only retard the seizure precipitation but also minimizes the associated comorbidities. In this regard, HMGB1 has emerged as a novel frontier and mounting number of preclinical studies targeting HMGB1 have been successful in diverse ranges of neurological conditions provoked by inflammatory responses (Wang et al., 2017; Zhao et al., 2017; Andersson et al., 2018).

High mobility group box 1 proteins are a family of DAMPs (Lotze and Tracey, 2005), which are highly conserved non-histone nuclear proteins and contributes to the architecture of chromatin DNA (Baxeavanis and Landsman, 1995). HMGB1 acts as an inflammatory cytokine in response to epileptogenic insults (Kaneko et al., 2017). HMGB1 acts as a pathogenic

inflammatory response to mediate ranges of conditions such as epilepsy (Maroso et al., 2010), septic shock (Wang et al., 1999), ischemia (Kim et al., 2006; Wang et al., 2015), TBI (Okuma et al., 2012), PD (Sasaki et al., 2016), AD (Fujita et al., 2016), and MS (Andersson et al., 2008). Structural evaluation of HMGB1 suggests that it exhibits two domains for DNA-binding, known as box A and box B, as well as C-terminal acidic tail comprised of repeating glutamic and aspartic acid residues (Venereau et al., 2016; Aucott et al., 2018b). DAMPs can influence synaptic function in the brain regions such as the hippocampus, which is involved in hyperexcitability and cognitive decline in epilepsy (Ravizza et al., 2017). It has been reported that immediately after neuronal injury, there is a passive release of significant amounts of HMGB1 from the nucleus into the extracellular space (Scaffidi et al., 2002).

High mobility group box 1 has several extracellular receptors such as RAGE, TLR9, TLR4, TLR2, integrin, α -synuclein filaments, proteoglycans, T-cell immunoglobulin and mucin domain (TIM-3), triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM1), cluster of differentiation 24 (CD24), C-X-C CXCR4, N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) (Kang et al., 2014). Among these receptors, RAGE and TLR4 are the only receptors that are extensively studied and reported without doubt (Andersson et al., 2018). HMGB1 initiates several cell responses including inflammation as well as mediate the activation of inflammatory process via binding with RAGE and TLR4 (Bianchi and Manfredi, 2007; Iori et al., 2013). During neuroinflammatory conditions, HMGB1 is actively released by neurons and glia cells upon inflammasome activation and in turn activates at least two PRRs, namely TLR4 and RAGE on target cells (Ravizza et al., 2017). Once released extracellularly, HMGB1 binds to the TLR4 and RAGE expressed by immune cells which leads to nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) mediated production of pro-inflammatory cytokines (Iori, 2017). Role of HMGB1 in the development and disease of central nervous system (CNS) has been well described (Fang et al., 2012) where contribution of HMGB1 to the neurogenesis in the early phase of brain development, in neurite extension as well as its dual role in neural development and neurodegeneration is well discussed. HMGB1 promoted neuronal differentiation of adult hippocampal neural progenitors via activation of RAGE/NF- κ B suggesting the role of HMGB1 in maintaining and sustaining hippocampal neurogenesis (Meneghini et al., 2013).

A previous study reported HMGB1 translocation as the main culprit for TBI (Li Y. et al., 2017). Recently, HMGB1 has received greater attention for its role in epilepsy (Zhao et al., 2017). It has been hypothesized that HMGB1 might be involved in epileptogenesis, especially through BBB disruption and induction of inflammatory processes though the precise mechanism remains still elusive. Several studies were previously conducted to determine the involvement of HMGB1 in the pathogenesis of epilepsy (Fu et al., 2017). HMGB1 plays a pivotal role in cognitive decline where HMGB1 is supposed to caused disruption of the BBB leading to cognitive deficits in aged rats (He et al., 2012). Interestingly, accumulating evidence suggests that neuroinflammation is highly associated with epilepsy and cognitive dysfunction after TBI and HMGB1 exhibits a key role

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; APOE- ϵ 4, Apo lipoprotein E- ϵ 4; BBB, blood-brain barrier; BDNF, brain derived neurotropic factor; BLA, basolateral amygdala; COX-2, cyclooxygenase-2; CREB, CAMP response element binding; CXCR4, chemokine receptor type 4; DAMPs, damage-associated molecular patterns; DNA, deoxyribonucleic acid; EEG, electroencephalogram; GABA, gamma amino butyric acid; GEPRS, genetically epilepsy prone rats; GLUR2, glutamate receptor 2; GRIA2, glutamate receptor ionotropic AMPA 2; HMGB1, high mobility group box 1; IHC, immunohistochemistry; KA, kainic acid; KIR4.1, inwardly rectifying potassium channel 4.1; LTP, long-term potentiation; MiR-129-5p, micro RNA-129-5p; MS, multiple sclerosis; MWM, Morris water maze; NORT, novel object recognition test; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PD, Parkinson's disease; POCD, post-operative cognitive dysfunction; PRNCs, primary rats neural cells; PRR, pattern recognition receptor; PTZ, pentylenetetrazol; RAGE, receptor for advanced glycation end Products; RAS, retrovirus-associated DNA sequences; ROS, reactive oxygen species; SE, status epilepticus; TBI, traumatic brain injury; TEM, transmission electron microscopy; TGF- β , transforming growth factor- β ; TLE, temporal lobe epilepsy; TLR4, toll-like receptor 4; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

as an initiator and amplifier of neuroinflammation as well as in neuronal excitation (Frank et al., 2015). Annegers and Coan (2000) suggested that there is a high risk of epilepsy after TBI and epilepsy is associated with neurological comorbidities such as cognitive dysfunction (Pascente et al., 2016; Ravizza et al., 2017).

Treatments based on HMGB1 antagonists via targeting extracellular HMGB1 have generated encouraging results in a wide number of experimental models though the clinical studies are yet to be reported. Anti-HMGB1 monoclonal antibodies (mAbs) have demonstrated beneficial effects on epilepsy and TBI. The therapeutic benefits of anti-HMGB1 mAb on epilepsy have been previously demonstrated in animal model of epilepsy (Fu et al., 2017). Potential neuroprotective effects of HMGB1 has been reported in few studies where anti-HMGB1 mAb prevented intracerebral hemorrhage (ICH)-induced brain injury (Wang et al., 2017).

Interestingly, HMGB1 has been associated with all of the neurological conditions previously outlined (Figure 1). Neuroinflammation is the mediator of damage in TBI, epileptogenesis and cognitive decline are the post-TBI events. This makes worth further exploring the HMGB1 and the rationale behind the current review is to explore the potential of HMGB1 as a common biomarker and potential target for several neurological phenotypes discussed in this review. In spite of its proven role in TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive

decline there has been little interest in exploring HMGB1 as a common target and biomarker for those conditions. The preclinical and clinical evidences discussed herein strengthens HMGB1 to stand as a promising candidate to be the common biomarker and treatment target for the neurological conditions where neuroinflammatory pathway plays a central role. Hence, this review summarizes recent advances and discuss these emerging findings to explore the potential of HMGB1 as a common biomarkers and treatment target which could pave the way in developing therapies with broad application modifying the disease progression.

NEUROINFLAMMATION AS A PRIME DRIVER OF TBI, EPILEPSY AND COGNITIVE DECLINE?

Neuroinflammation is the key component of neuropathology after TBI and contributes to the chronic neurodegeneration and neurological impairments associated with TBI (Kumar and Loane, 2012). This is supported by gene profiling studies which show that genes related to neuroinflammation are upregulated after brain injury (Kobori et al., 2002) and elevated levels of the inflammatory cytokines TNF- α , TGF- β , and IL-1 β are expressed after TBI (Morganti-Kossmann et al., 2002; DeKosky et al.,

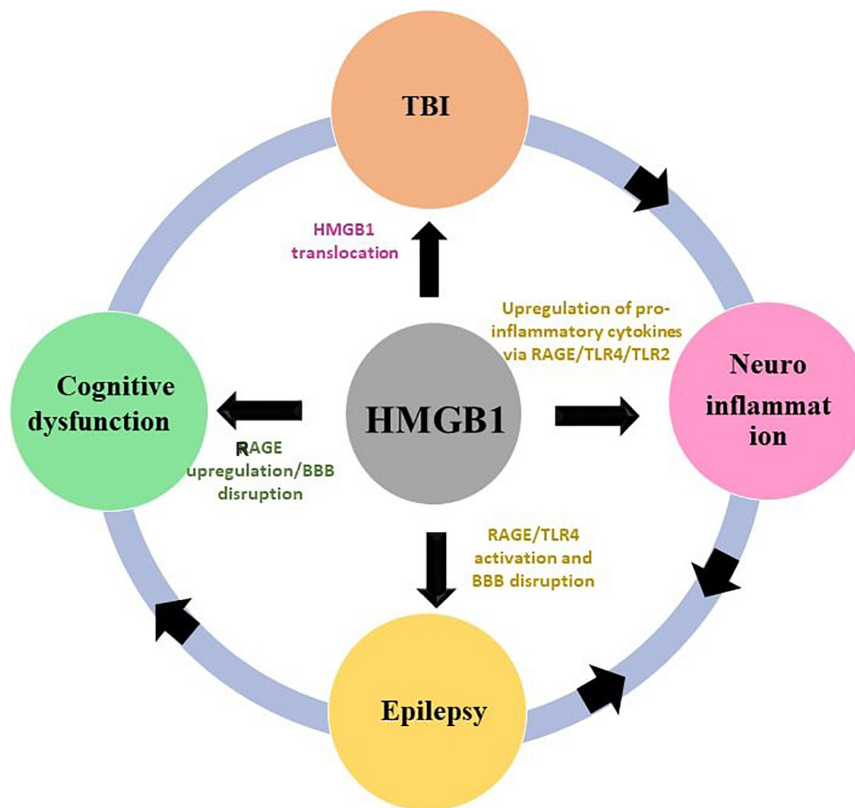
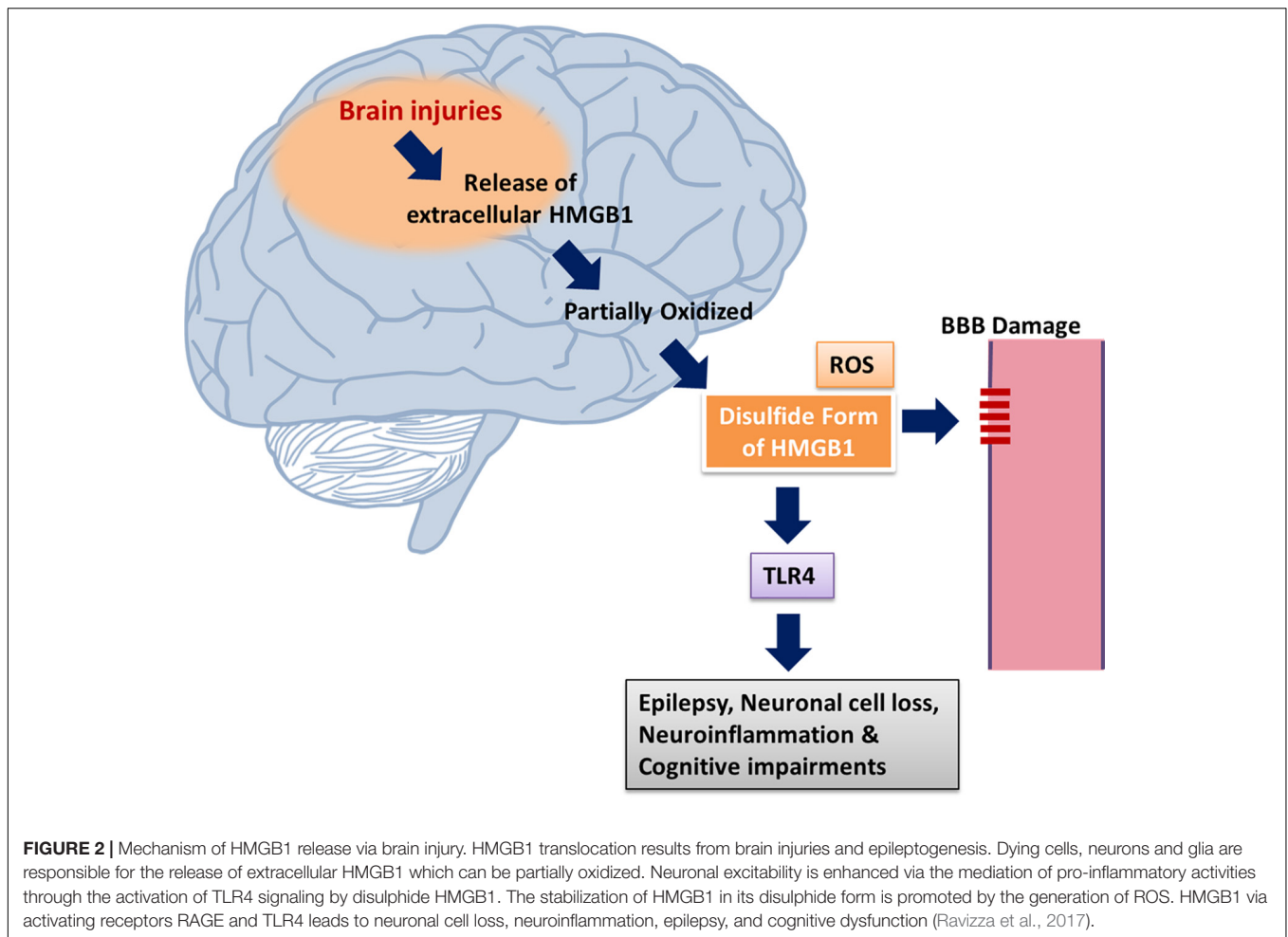


FIGURE 1 | Interlinkage of HMGB1 with TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive dysfunction. The HMGB1 contributes to the pathogenesis of TBI, neuroinflammation, epilepsy, and cognitive dysfunction through a putative mechanism outlined in this figure.



2013). Several experimental and clinical evidences support the role of inflammatory mediators as the origin of both seizures and epileptogenesis (Vezzani and Granata, 2005; Shimada et al., 2014). Brain inflammation contributes to the generation of individual seizures as well as cell death, which in turn contributes to the development of seizures via activation of inflammatory pathways (Vezzani et al., 2011). Moreover, there is evidence which highlights that inflammation can be a cause as well as consequences of epilepsy (Vezzani et al., 2011).

Traumatic brain injury incites a neuroinflammatory axis in the brain which perpetuates neurodegeneration and increases the chances of initiating epileptogenesis (Webster et al., 2017). However, the probability of developing epilepsy after TBI varies from 4.4% to 53% (Frey, 2003) and becomes more likely with a higher injury severity and a younger age at injury (Barlow et al., 2000). Neuroinflammation is a contributing factor to the pathophysiology of post-TBI epileptogenesis (Riazi et al., 2010). Neuroinflammation can alter the BBB permeability directly via cytokine aided activation of metalloproteinase or via disruption of tight junctions (Gloor et al., 2001; Utech et al., 2009), though the precise mechanism remains elusive. It is worthwhile to note that although neuroinflammation is typically provoked after a series of epileptogenic brain injuries, the proportion of patients

developing the disease is small (Vezzani, 2015). The pivotal role of neuroinflammation in cognitive dysfunction has been reported but the underlying molecular mechanism are not yet known. However, there are insights regarding certain inflammatory pathways underlying hyperexcitability and excitotoxicity that can promote cognitive decline (Vezzani, 2015).

In recent days, research using experimental and clinical models has focused on the pathogenesis of how HMGB1 proteins contributes to TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive decline. Such research has sought to pave the way to understand how these mechanisms can be interfered to develop therapies for the aforementioned neurological conditions. Moreover, accumulating evidence reported beneficial effects on evaluating anti-HMGB1 mAb and HMGB1 inhibitors against TBI, neuroinflammation, epilepsy, and cognitive decline. We will therefore discuss the outcomes of such experimental and clinical experiments in an individual pattern.

ROLE OF HMGB1 IN TBI

TBI is an insult to the brain through any external mechanical force (Webster et al., 2017), which makes TBI a devastating

and intractable cause of worldwide morbidity and mortality. Survivors live the rest of their lives with cognitive, motor, behavioral or speech and language disabilities (Richard et al., 2017). However, the pathophysiology of TBI is still elusive and a tremendous research must be made to explore the progression of neurodegeneration and the ensuing inflammatory processes (Parker et al., 2017). It is currently unavailable to attenuate the pathological process of TBI and improve neurological deficits (Jiang et al., 2018). TBI involves a primary insult known as structural damage due to any external mechanical force which is followed by a secondary injury including a multitude of neuroinflammatory phenomena such as excitotoxicity, oxidative stress and apoptosis (Webster et al., 2017). These processes begin within minute after TBI and can persist for months to years and is suspected to contribute to the expansion of tissue damage (Hinson et al., 2015).

During TBI, HMGB1 is released via the *N*-methyl *D*-aspartate receptor subtype 2B (NR2B)-mediated mechanism from necrotic neurons (Richard et al., 2017). HMGB1 mediates sterile inflammation and provokes macrophages and endothelial cells to release TNF- α , IL-1, and IL-6 by binding with RAGE and TLR4. This binding further activates the NF- κ B pathway and facilitates the upregulation of HMGB1 and the expression of pro-inflammatory mediators (Gao et al., 2012). In addition, neuroinflammatory processes mainly mediated by activated microglia and astrocytes are crucial for the initiation and progression of TBI (Li D. et al., 2017). TBI induces a series of events including BBB breakdown, brain edema, upregulation of tight junction proteins (TJPs), expression of inflammation related molecules (Yang et al., 2018). TLR4 has been linked with TBI where TLR4 mediates glial phagocytic activity and inflammatory cytokines production (Jiang et al., 2018) and plays an important role in inflammatory response and brain injury (Fang et al., 2013). Once HMGB1 is released into the extracellular settings following TBI, it binds to transmembrane major mediators of the inflammatory response, TLR2, TLR4, and RAGE (Yang et al., 2005). Excessive inflammation resulting from activation of the HMGB1/TLR4 pathway in the brain has been implicated in TBI and ischemia-reperfusion injury (Yang et al., 2011). However, the mechanistic interlinkage between intracellular danger signaling, which involves the nuclear chromatin-binding factor, HMGB1 and inflammatory pathways after TBI is not yet fully understood (Parker et al., 2017). There is an increased understanding that TBI may induce activation of HMGB1/TLR4/RAGE/NF- κ B signaling pathway and inflammatory cytokine expression, which would induce and/or aggravate the secondary brain injury where HMGB1 is supposed to implicate a critical role in promoting inflammation and aggravating damage after TBI (Xiangjin et al., 2014) (**Figure 2**). Several HMGB1 inhibitors have demonstrated protective effect against TBI via inhibiting HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway activation (Su et al., 2011), and by reducing HMGB1/RAGE interaction (Okuma et al., 2014).

Inhibition of HMGB1 expression and the TLR4/NF- κ B pathways exhibits protective effects in animal model of TBI. HMGB1 inhibitors (glycyrrhizic acid) attenuated TBI by inhibiting the classically activated microglia/macrophages

(M1) phenotype activation and promoting the alternatively activated microglia/macrophages (M2) phenotype activation of microglia/macrophages, via the inhibition of HMGB1 and suggest that targeting of HMGB1 to modulate the microglia/macrophage polarization might be a potential approach for TBI (Gao et al., 2018). Similar line of results has been reported where anti-HMGB1 mAb improved neurological deficits in ICH-induced brain injury. Anti-HMGB1 mAb inhibited the release of HMGB1 into the extracellular space in the peri-hematoma region, reduced serum HMGB1 levels and decreased brain edema by protecting BBB integrity, in association with decreased activated microglia and the expression of inflammation-related factors at 24 h after ICH (Wang et al., 2017). Neuroprotective effects of TLR4 knockdown has emerged as a promising approach for TBI. TLR4 knockdown ameliorated neuroinflammatory response and brain injury after TBI and suppressing autophagy induction and astrocyte activation is postulated the main mechanism behind the neuroprotective effects of TLR4 (Jiang et al., 2018). Data obtained from western blot analysis in an experimental study reported the release profile of HMGB1 and RAGE after TBI where HMGB1 was released as soon as 30 min after TBI and a decline in its expression was noted between 1 and 6 h after TBI. However, the expression level of RAGE was elevated at 6 h after TBI and reached its peak after 1 day (**Table 1**) (Gao et al., 2012). An immunostaining study reported that septic brain injury results in increased HMGB1 cytoplasmic translocation in neurons (**Table 1**) (Li Y. et al., 2017). A few studies have reported a noteworthy elevation of HMGB1, IL-1 β , and TNF- α levels in serum as estimated by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit in an experimentally induced TBI model in rabbits (Mohamed et al., 2017). However, ELISA analysis does not precisely differentiate between release pattern of HMGB1 either by necrosis, or from macrophages and monocytes, or a combination of both (Au et al., 2012).

High mobility group box 1 A-box fragment, an antagonist competing with HMGB1 for receptor binding, significantly ameliorated the BBB breakdown and brain edema induced by controlled cortical impact (CCI), and these effects were associated with the decrease in expressions of inflammation-related factors as well as improved neurological functions (Yang et al., 2018). Ethyl pyruvate (**Table 1**) (Su et al., 2011) and omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation (Chen et al., 2017b) has demonstrated its effectiveness against TBI via inhibition of the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway. Evaluation of anti-HMGB1 mAb therapy against TBI in rats reported that anti-HMGB1 mAb remarkably inhibited fluid percussion-induced brain edema in rats, which was associated with an inhibition of HMGB1 translocation, protection of BBB architecture, downregulation of inflammatory molecule expression, and improvement in motor function (**Table 1**) (Okuma et al., 2012). Increased inhibition of the expression of HMGB1 signaling axis, with RAGE and TLR4, NF- κ B DNA binding and downstream inflammatory cytokines were reported on glycyrrhizin treatment (Okuma et al., 2014).

The literature review ranging from human to animal studies suggests an important association between TBI and increased levels of HMGB1 in serum and cerebrospinal fluid (CSF) (Okuma et al., 2014). In addition, emerging data reported HMGB1

TABLE 1 | Summary of findings reporting HMGB1 in TBI.

S.N.	Intervention	Model	Mechanism	Observations	Reference
1.	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of HMGB1 expression and TLR4/NF-κB pathway 	<ul style="list-style-type: none"> • \downarrow Reduced expression of HMGB1 and TLR4 • Improved motor function and lessened brain oedema 	Su et al., 2011
2	Anti-HMGB1 mAb	Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Protection against BBB disruption • Inhibition of the inflammatory responses 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of translocation of HMGB1, protection of BBB permeability • Downregulation of inflammatory molecule expression • Improvement of motor function 	Okuma et al., 2012
3	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Interference with HMGB1 and RAGE interaction • Inhibition of the expressions of TNF-α, IL-1β, and IL-6 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibited the \uparrow in BBB permeability and impairment in motor functions • Inhibition of translocation of HMGB1 in neurons at the site of injury 	Okuma et al., 2014
4	Anti-HMGB1 mAb	Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Protecting BBB integrity • \downarrow Expression of inflammation-related factors 	<ul style="list-style-type: none"> • \downarrow Release of HMGB1 to the extracellular space in the peri-hematoma region • \downarrow Serum HMGB1 levels and brain edema through maintaining BBB integrity 	Wang et al., 2017
5	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Downregulation of sepsis-induced RAGE and NF-κBp65 expression 	<ul style="list-style-type: none"> • HMGB1 was \uparrow in the cytoplasm via translocation • RAGE and NF-κB p 65 were up regulated after brain injury • HMGB1 and its signaling transduction have a key role in the pathogenesis of septic brain injury 	Li Y. et al., 2017
6	HMGB1	Human	<ul style="list-style-type: none"> • Targeting HMGB1/RAGE signaling 	<ul style="list-style-type: none"> • HMGB1 disappeared or translocated from the nucleus to the cytoplasm at early stages after TBI • RAGE expression \uparrow after TBI 	Gao et al., 2012
7	HMGB1	Human	<ul style="list-style-type: none"> • Activation of microglial TLR4 and the subsequent expression of AQP4 	<ul style="list-style-type: none"> • Peak CSF HMGB1 level in human TBI was within 0–72 h. • HMGB1 released from necrotic neurons through a NR2B-mediated mechanism 	Laird et al., 2014

S.N., serial number; \uparrow , increased; \downarrow , decreased; HMGB1, high mobility group box 1; TLR4, Toll like receptor 4; RAGE, receptor for advanced glycation end products; NF- κ B p 65, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β cells p 65; IL-6, interleukin-6; IL-1 β , interleukin-1 β ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; BBB, blood-brain barrier; TBI, traumatic brain injury; CSF, cerebrospinal fluid; MRI, magnetic resonance imaging; ICP, intra-cranial pressure; NR2B, N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B; AQP4, astrocytic water channel aquaporin-4.

in the CSF of subarachnoid hemorrhage (SAH) (Nakahara et al., 2009) and in the serum of ICH (Zhou et al., 2010) highlighting as a potential biomarker of neurological outcome. Nevertheless, the clinical output of HMGB1 antagonist against several forms of brain injury is yet to be reported. Similar line of evidence were observed in which HMGB1 is associated with increased levels of intracranial pressure (ICP) in patients and promoted cerebral edema after TBI where the detrimental effects of HMGB1 are mediated through the microglial TLR4 activation and the expression of the astrocytic water channel aquaporin-4 (AQP4) (Richard et al., 2017). HMGB1 plasma levels were reported to increase within 30 min after severe trauma in humans and suggested a correlation between plasma levels

of HMGB1 with early post-traumatic coagulopathy and severe systemic inflammatory response (Cohen et al., 2009). There was a 30-fold increment of plasma HMGB1 levels after trauma, as compared to normal controls during a 1-h period of injury which provides insights regarding the post-injury elevation levels of HMGB1 in human (Peltz et al., 2009) However, the study did not report any correlation between HMGB1 levels and the patients' outcome. Furthermore, a compelling relationship between plasma HMGB1 absorption and the severity of acute TBI was unraveled and correlation between Glasgow Coma Scale score and HMGB1 levels were reported, which can serve as prognostic information in patients with severe TBI (Wang et al., 2012). Higher CSF HMGB1s level are considered as an important

biomarker to predict outcome after pediatric TBI (Au et al., 2012).

The pathophysiology behind the complex inflammation cascades secondary to TBI is not yet fully understood. However, resulting injuries and outcomes after TBI have been studied in the past and have suggested HMGB1 to be a major player in disease progression as well as a potential therapeutic target to reduce the injuries and improve outcome following TBI. As well as the current biomarkers of TBI such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B (Vos et al., 2010) are limited by low sensitivity, predictivity, and specificity (Metting et al., 2012). In this regard, due to its profound role in TBI pathology and inflammatory pathways post-TBI, HMGB1 appears to be a promising candidate which can be used as a prognostic marker of TBI. Moreover, downregulating HMGB1/RAGE/TLR4/NF- κ B axis might be a novel strategy against TBI which could attenuate the neurological functions as well.

ROLE OF HMGB1 IN NEUROINFLAMMATION AND RELATED PATHOLOGIES

Neuroinflammation is considered as an innate immune responses in the CNS, which is triggered in response to several inflammatory signals such as pathogen infection, injury or trauma, which might ultimately result in neurotoxicity (Streit et al., 2004). Microglia are known as the predominant innate immune cell in the CNS and are thus considered a pivotal mediator of neuroinflammatory processes (Gehrmann et al., 1995). Microglia express TLRs, in particular TLR4 (Ransohoff and Perry, 2009), and are reported to mediate the pro-inflammatory effects of HMGB1 in peripheral innate immune cells (Yang et al., 2010). Disulphide form of HMGB1 (ds-HMGB1) potentiates the microglia pro-inflammatory response to an immune challenge suggesting that acute increases or exposure to ds-HMGB1, as may occur during acute stress or trauma, might induce a primed immune phenotype in the CNS, which may lead to an exacerbated neuroinflammatory response if exposure to a subsequent pro-inflammatory stimulus occurs (Frank et al., 2016). There is an increased understanding that HMGB1 mediates inflammatory and immune reactions in CNS and emerging evidence reveals that HMGB1 plays an essential role in neuroinflammation through receptors such as TLR, RAGE, and NMDAR (Wan et al., 2016). Moreover, HMGB1 induces RAGE and TLR4 mediated neuroinflammation and necrosis after injuries such as lesions in the spinal cord and brain (Fang et al., 2012). HMGB1 mediates inflammation by activating the innate immune receptors during sterile injury, in a similar manner to activation by PAMPs (Yang and Tracey, 2010). The BBB is a special microvessel structure in the CNS, consisting of microvascular endothelial cells sealed by tight junctions. Its permeability is closely related with degeneration, injury and inflammation of the CNS (Huang et al., 2011). Similar line of study shows that damaged BBB correlates directly with neuroinflammation involving microglial activation and reactive astrogliosis, which is associated with increased expression and/or

release of HMGB1 (Festoff et al., 2016). In an experiment evaluating the contribution of extracellular, cerebral HMGB1 (in absence of other DAMPs) in its disulphide or fully redox form to neuroinflammation demonstrate that ds-HMGB1 and fully redox HMGB1 (fr-HMGB1) function as pro-inflammatory mediators in the CNS, promoting BBB disruption and cytokine production (Aucott et al., 2018a). Thus, anti-neuroinflammation and maintenance of BBB integrity may be potential targets for neuroprotection (Cheng et al., 2018). Increasing evidence suggests that selective targeting of CNS inflammation is a viable strategy for interfering disease onset or progression for a number of neurodegenerative disorders where neuroinflammation is the key player (Hong et al., 2016). Despite the deteriorating role of neuroinflammation in many neurological diseases, the number of existing anti-inflammatory drugs is quite limited because of insufficient efficacy or undesired side effect (Craft et al., 2005). HMGB1 has emerged as a novel frontier due to its plausible role in neuroinflammation (Lee et al., 2014) as well as in inflammatory diseases (Harris et al., 2012) where the causal role for HMGB1 in a range of non-degenerative neuroinflammatory conditions has been well reported. Moreover, HMGB1 blocking therapies have proven to be highly beneficial, demonstrating remarkable neuroprotection in several neuroinflammation models (Kim et al., 2006).

Inflachromene (ICM), a microglial inhibitor possessing anti-inflammatory effects via binding with HMGB1 blocks the sequential processes of cytoplasmic localization and extracellular release of HMGBs by perturbing its post-translational modification as well as downregulates pro-inflammatory functions of HMGB and reduces neuronal damage *in vivo* demonstrating its potential against neuroinflammatory diseases (Lee et al., 2014). HMGB1 binds with lipopolysaccharides (LPS) and IL-1 to initiate and synergize TLR4-mediated pro-inflammatory response and immediately after pro-inflammatory stimulation by LPS, TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-8, HMGB1 is released from activated monocytes and macrophages (Youn et al., 2008). The regulation of HMGB1 secretion is crucial for the regulation of HMGB1 mediated inflammation and is dependent on various processes such as phosphorylation by calcium-dependent protein kinase C (Oh et al., 2009). HMGB1 acts as a novel pro-inflammatory cytokine-like factor and regulates excitotoxicity-induced acute damage processes and delayed inflammatory mechanisms in the post-ischemic brain of Sprague Dawley (SD) rats (**Table 2**) (Kim et al., 2006). Elevation of HMGB1 in brain was measured in several non-degenerative neuroinflammatory condition such as ethanol exposure (Zou and Crews, 2014), and stress-induced neuroinflammatory priming (Weber et al., 2015). Neuroinflammation contributes to the progression of several neurodegenerative diseases including PD (Tansey and Goldberg, 2010) and AD (Heneka et al., 2015). Blocking the neuroinflammatory pathways in these neurodegenerative diseases will exert neuroprotection against these diseases. Anti-HMGB1 mAb has inhibited the activation of microglia, prevents BBB breakdown, and inhibit the expression of inflammation cytokines such as IL-1 β and IL-6 in an experimental model of PD demonstrating its neuroprotective effects possibly via suppressing neuroinflammation (Sasaki et al.,

TABLE 2 | Summary of findings reporting HMGB1 in neuroinflammation mediated conditions.

S.N.	Intervention	Model	Mechanism	Observation	Reference
1.	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> Delayed inflammatory processes by extracellular HMGB1 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 was released during the excitotoxicity-induced acute damaging process Extracellular HMGB1 provokes inflammatory processes and acts like a novel pro-inflammatory cytokine-like factor 	Kim et al., 2006
2	HMGB1	Mice	<ul style="list-style-type: none"> Activation of NF-κB and NADPH oxidase by HMGB1 via binding with Mac1 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1-Mac1-NADPH oxidase signaling cascades connects chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration 	Gao et al., 2011
3	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 acted as an early pro-inflammatory cytokine 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 released into the cytoplasm soon after ICH Mediate inflammation during the acute phase of ICH 	Lei et al., 2013
4	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> Inflammatory responses produced via HMGB1/TLR4/NF-κB signaling 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 \downarrow the release of IL-6 and TNF-α HMGB1 inhibited activation of NF-κB in the developing brain 	Tian et al., 2015
5	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> Regulation of age-related priming of the neuroinflammatory responses by HMGB1 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 was \uparrow in aged rodent brains and CSF Blocking HMGB1 "desensitized" microglia in the aged brain and prevent pathological infection-elicited neuroinflammatory responses 	Fonken et al., 2016

S.N., serial number; \uparrow , increased; \downarrow , decreased; HMGB1, high mobility group box 1; ICH, intracerebral hemorrhage; Mac1, macrophage antigen complex 1; CSF, cerebrospinal fluid; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TLR4, Toll like receptor 4; RAGE, receptor for advanced glycation end products; IL-6, interleukin-6; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen.

2016). Glycyrrhizin attenuated neuroinflammation, cognitive deficits, microglial activation related over-expression of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus induced by LPS showcasing its therapeutic potential against neurodegenerative diseases like AD (Song et al., 2013).

Multiple sclerosis is an autoimmune-mediated chronic, inflammatory, demyelinating disease of CNS characterized by axonal damage (Compston and Coles, 2008). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most reliable experimental model of MS (Miller et al., 2010). HMGB1 is receiving increasing attention in autoimmune disorders including MS. The very first study unraveling the role of HMGB1 in the pathophysiology of MS reported increased numbers of macrophages with cytoplasmic HMGB1 in active lesions (Andersson et al., 2008) and suggest HMGB1 as a novel biomarker of inflammatory demyelinating disease. Several researches has emerged on the base of earlier studies and suggest that the expression and release of HMGB1 are remarkably elevated in several stages of EAE where HMGB1 expression pattern is dynamically changed during the progression of EAE, as well as validated HMGB1 as a key mediator of EAE pathology (Sun et al., 2015). Targeting HMGB1 locally might exhibits therapeutic potential against EAE which can attenuate the disease severity and incidence as well as delayed disease onset time

(Robinson et al., 2013). Neutralization of HMGB1 appears to be a novel strategy against MS as evidenced by an experimental study of MS, where anti-HMGB1 mAb ameliorated clinical severity, reduced CNS pathology, and blocked the production of pro-inflammatory cytokine (Uzawa et al., 2013).

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a non-demyelinating neurodegenerative disease characterized by increased neuronal loss and enhanced neuroinflammation, with extensive activation of glial cells and microglia stimulation releasing pro-inflammatory molecules, ROS, and nitric oxide (Ray et al., 2016). Neuroinflammation is postulated as a pathological hallmark of ALS (Lewis et al., 2012), and HMGB1 has been extensively studied in ALS due to its putative involvement in the pathology of ALS which is elusive yet. However, the elevated level of HMGB1 in the spinal cord of transgenic mice (SOD1G93A transgenic mice) were observed and reported that HMGB1 may have a role in the progressive inflammatory and neurodegenerative processes in response to the neurotoxic environment present in the spinal cord of SOD1G93A mice rather than to be involved as a primary event in the motor neuron death (Coco et al., 2007).

Withaferin A in an animal model of HMGB1-induced inflammatory responses suppressed the production of

IL-6, TNF- α and the activation NF- κ B by HMGB1 (Lee et al., 2012). HMGB1 acts a pathogenic factor in many inflammatory conditions including experimental arthritis models (Schierbeck et al., 2011). HMGB1 has been observed to be a key mediator of intestinal inflammation in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) via RAGE and redox signaling (Chandrashekar et al., 2017). Another study reported that liver inflammation in diabetic mice was improved via regulation of the HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway (Yin et al., 2018). Taken together, these results clearly highlight HMGB1 as a key mediator in several inflammatory diseases and suggest that HMGB1 exhibits therapeutic potential against these HMGB1 mediated inflammatory disease. Evaluating the ameliorative effects of glycyrrhizin on SAH in a rat model significantly improved neurological scores, reduced HMGB1-positive cells, downregulated mRNA and protein levels of HMGB1, inhibited BBB permeability, and attenuated neuronal cell death and apoptosis after SAH, suggesting it as a promising candidate for brain inflammation (Leong et al., 2018).

The result obtained from human studies on MS patients corroborated with the experimental studies where HMGB1 and its receptors (RAGE, TLR2, and TLR4) were up-regulated in CSF of MS patients implicating that RAGE, TLR2, and TLR4 actively participate in an inflammatory, innate immune response driving and shaping the ensuing adaptive immune response during MS (Andersson et al., 2008). In clinical studies in patients with ALS, activation of TLR/RAGE signaling pathways were observed as evidenced by the elevated expression of HMGB1 and its receptors in reactive glia in human ALS spinal cord. The activation of these pathways might contribute to the progression of inflammation, resulting in motor neuron injury (Casula et al., 2011). In addition, serum HMGB1 auto antibody (Ab) has been suggested as a biomarker for the diagnosis of ALS and can be used to monitor disease progression (Hwang et al., 2013). High level of HMGB1, IL-6, and IL-17A has been detected in CSF of patients with an anti-NMDA receptor (NMDAR) encephalitis (neuroinflammatory disorder) (Ai et al., 2018), reflecting the underlying neuroinflammatory processes but does not report any precise role of HMGB1 in disease pathology. Clinical study performed on patients with AD and mild cognitive impairment (MCI) observed enhanced BBB permeability by HMGB1 and suggest HMGB1 as a clinical biomarker as well as validates HMGB1 as a non-invasive biomarker of BBB dysfunction and neuroinflammation which can assess the progression of neurodegeneration in AD and MCI patients (Festoff et al., 2016).

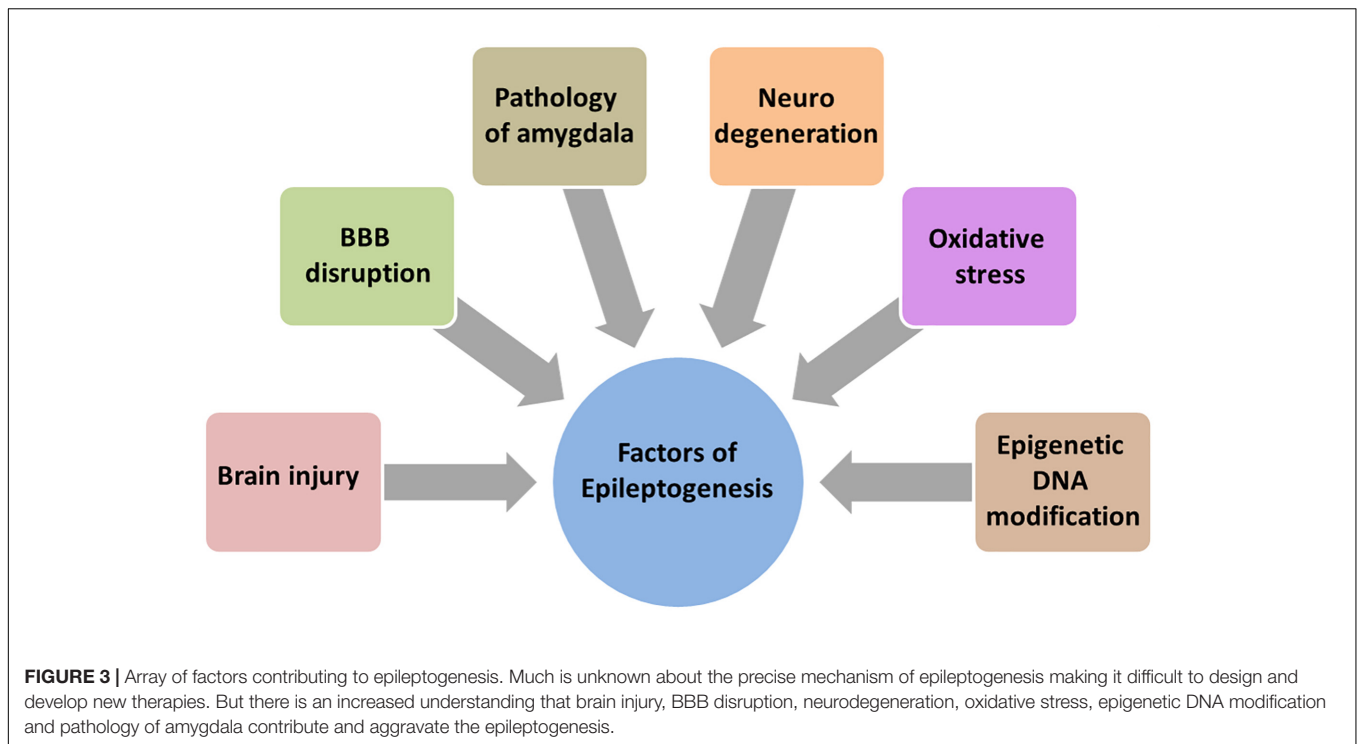
On the ground of evidences highlighted above, HMGB1 has been implicated in ranges of neuroinflammatory diseases as well as inflammation mediated disorders and HMGB1 exhibits huge potential to be a reliable biomarker for neuroinflammation related pathologies. On the positive note, beneficial effects of targeting HMGB1 in brain inflammation related pathologies is well documented. Extensive exploration to innovate therapeutic strategy to attenuate uncontrolled neuroinflammation triggered by HMGB1 is a pressing need.

ROLE OF HMGB1 IN EPILEPSY

Epileptogenesis is described as complex structural changes in the brain that convert a normal brain into a brain debilitated by recurrent seizure activity (Sloviter and Bumanglag, 2013). Neurodegeneration (Pitkanen and Lukasiuk, 2009; Reddy, 2013), disruption of BBB (Bar-Klein et al., 2017), the amygdala (Aroniadou-Anderjaska et al., 2008), the glutamatergic system (Aroniadou-Anderjaska et al., 2008), oxidative stress (Ashrafi et al., 2007), and epigenetic modification of DNA (Hauser et al., 1993) are all involved in epileptogenesis and aggravates the process (Figure 3).

Due to the lack of disease modifying effect in mainstream AEDs, precise understanding of diseases pathology and developing novel therapeutic approach for epilepsy-related hyperexcitability is a current need. Searching for molecular mediators of epileptogenesis in animal models, much attention has been paid to the potential pathogenic role of HMGB1 in the generation and recurrence of seizures (Kaneko et al., 2017; Yang et al., 2017). In spite of tremendous advancement in research, the pathogenesis of epilepsy is still complex, however, brain inflammation is supposed to play the role (Riazi et al., 2010). There is mounting evidence which report that neuroinflammatory processes in the pathophysiology of seizures/epilepsy and HMGB1 were found to behave like an inflammatory cytokine in response to epileptogenic insults (Kaneko et al., 2017). Glial cells activation has been reported to serve an important role in the development of epilepsy and HMGB1 may mediate microglial activation via the TLR4/NF- κ B signaling pathway during seizures (Shi et al., 2018). HMGB1 activates IL-1R/TLR signaling in neurons and has a key role in seizure generation and recurrence via rapid sarcoma family kinases catalyzed phosphorylation of NMDA-NR2B receptors (Vezzani et al., 2012). As well as, HMGB1 serves a key role in epileptogenesis via microglial activation, via TLR4-NF- κ B signaling pathway activation (Shi et al., 2018). An array of investigation has reported the role of HMGB1 in seizure but the precise mechanism on how HMGB1 leads to seizure generation is not documented well. HMGB1 released from glia and neurons and its signaling with TLR4 are suggested in generating and perpetuating seizures, the suggestion was based on the anti-convulsant activity of TLR4 inhibitors and Box A, a competitor of endogenous HMGB1 but the study lacks detailed mechanism how HMGB1/TLR4 axis leads to seizure generation (Maroso et al., 2010). Although HMGB1 activates both TLR4 and RAGE, the role of RAGE in seizures is less prominent than that of TLR4 (Iori et al., 2013).

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is a most common refractory focal epilepsy syndromes (Palleria et al., 2015) and role of HMGB1 in the pathogenesis of MTLE remains unknown. Experimental MTLE study reported significant upregulation of HMGB1 and TLR4 gene expression in the hippocampi of a rat and correlated this overexpression of HMGB1 and TLR4 to the pathogenesis of MTLE in immature rats (Yang et al., 2017). In addition, the role of HMGB1 and its receptors (RAGE and TLR4), including the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , in generating and perpetuating seizures is well documented



(Zaben et al., 2017). Pharmacological and genetic studies on animal and clinical brain specimens showed that translocation and release of HMGB1 occurs in the pathological epileptogenic focus of different type of epilepsy (Maroso et al., 2010; Iori et al., 2013). It is worth noting that HMGB1/TLR4 axis not only reduced seizure frequency and duration, but also accelerated seizure onset, which usually occurs within minutes in kainite and bicuculline-induced seizure models implicating the important role of HMGB1 in the precipitation of the first seizure after a pro-convulsant administration (Maroso et al., 2010). Abnormal extracellular HMGB1 might contribute to the pathophysiology of epilepsy-related hyperexcitability as evidenced by study on PRNCs demonstrate a surge in extracellular HMGB1 approximated seizure initiation, establishing HMGB1 as a key pathophysiological contributor to the onset of epilepsy-related hyperexcitability (Table 3) (Kaneko et al., 2017).

TLR4 activation in neurons and astrocytes by HMGB1 proteins is a key mechanism of seizure generation and blocking TLR4 signaling using an antagonist could also reduce the severity of epilepsy (Iori et al., 2013). Investigation on post-surgery patients with intractable epilepsy revealed increased levels of HMGB1, TLR4, RAGE, NF- κ B, p65 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the brain of the epilepsy group as well as increased levels of IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , and IL-10 in epilepsy patients (Shi et al., 2018).

Targeting HMGB1/TLR4/RAGE signaling for epilepsy has gained more attention in recent years. MicroRNA-129-5p inhibited the development of autoimmune encephalomyelitis (AE)-related epilepsy by HMGB1 expression and inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway (Liu et al., 2017). HMGB1 and TLR4 antagonists slowed seizure precipitation, prevented

acute and chronic seizure recurrence in C57BL/6 mice as well as reported increased expression of HMGB1 and TLR4 in human epileptogenic tissue, which is similar to a mouse model of chronic seizures and suggest a role for the HMGB1-TLR4 axis in human epilepsy (Maroso et al., 2010). Thus, HMGB1/RAGE/TLR4 signaling might contribute toward the generation and perpetuation of seizures (Figure 4) in humans and can be successfully targeted to attain anti-convulsant effects in epilepsies which are resistant to drugs. The expression level of HMGB1 was significantly elevated in the hippocampus and cortex after 24-h in a KA-induced model of SE, which suggests that the HMGB1 protein has a key role in epilepsy (Walker et al., 2014). HMGB1 enhances hypothermia induced seizures and contributes to the pathogenesis of febrile seizure. However, the precise mechanism of HMGB1 in febrile seizures remains unclear (Ito et al., 2017).

Limited data is available regarding evaluation of therapeutic benefits of HMGB1 inhibitors in animal models of epilepsy. However, glycyrrhizin demonstrates neuroprotection against lithium/pilocarpine-induced SE in rats, as well as ameliorates pilocarpine-induced oxidative injury and inflammatory responses via suppressing IL-1 β and TNF- α , (González-Reyes et al., 2016) but did not demonstrate anti-epileptic activity. Dynamic changes in HMGB1 expression in the hippocampus of the mouse brain was reported after KA administration and glycyrrhizin exerts neuroprotective but not anti-epileptic effects via suppressing both acute and delayed HMGB1 inductions in the hippocampal cornu ammonis (CA)1 and CA3 region as well as its accumulation in serum (Luo et al., 2014).

Anti-HMGB1 mAb demonstrated an anti-seizure effect as evident by the lack of a disruption on the physical EEG

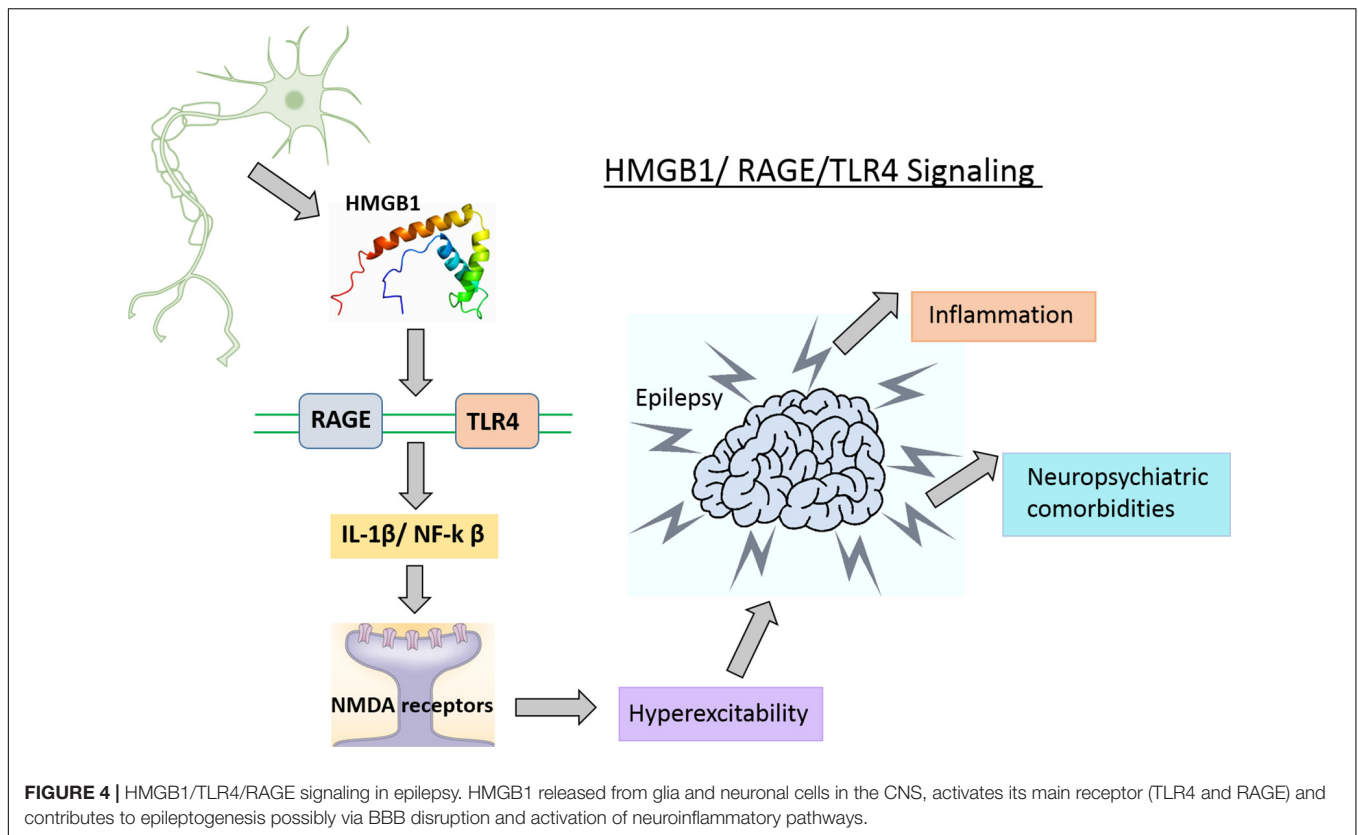
TABLE 3 | Summary of findings reporting HMGB1 in epilepsy.

S.N.	Intervention	Model	Mechanism	Observations	Reference
1	HMGB1	KA-induced seizure in mice	<ul style="list-style-type: none"> Targeting HMGB1/TLR4 axis 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Frequency of seizure and total duration Seizure can be ↓ by TLR4 and HMGB1 antagonists 	Maroso et al., 2010
2	Anti-HMGB1 mAb	Acute seizure (MES and PTZ); Chronic seizure by KA in mice	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition of HMGB1 translocation 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Seizure threshold; ↓ time in tonic-clonic seizures and ↓ death Delayed onset of generalized seizures; ↓ seizure stage; ↓ incidence of tonic seizures 	Zhao et al., 2017
3	Molecular isoforms of HMGB1	Electrically induced Se in rats	<ul style="list-style-type: none"> Activation of HMGB1/TLR4 axis 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ level of HMGB1 and its acetylated and disulphide isoforms in blood 	Walker et al., 2017
4	HMGB1	Pilocarpine-induced SE in rats	<ul style="list-style-type: none"> Regulation of P-gp expression via RAGE/NF-κB inflammatory signaling pathways 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ The expression levels of MDR1A/B mRNA and P-gp protein 	Xie et al., 2017
5	HMGB1	KA-induced epilepsy in rats	<ul style="list-style-type: none"> Modulation of glutamate metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Extracellular HMGB1 suggesting contribution of HMGB1 in epilepsy related hyperexcitability Translocation of HMGB1 from nucleus to cytosol after KA administration 	Kaneko et al., 2017
6	HMGB1	Pilocarpine-induced epilepsy in rats	<ul style="list-style-type: none"> Targeting HMGB1 via TLR4/NF-κB signaling pathway 	<ul style="list-style-type: none"> Inhibit the development of AE-related epilepsy Suppression of HMGB1 expression MiR-129-5p mediated TLR4/NF-κB signaling pathway ameliorated AE-related epilepsy 	Liu et al., 2017
7	Anti-HMGB1 mAb	Pilocarpine-induced SE in mice	<ul style="list-style-type: none"> Inhibition of HMGB1 release and inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> Protection of BBB permeability; ↓ HMGB1 translocation ↓ Latency and frequency of stage 5 seizures 	Fu et al., 2017
8	Molecular isoforms of HMGB1	Human	<ul style="list-style-type: none"> Evaluation of HMGB1 isoforms as mechanistic biomarkers of epileptogenesis in sera obtained from epileptic patients 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 isoforms in the brain and blood were changed Expression of disulphide HMGB1 in newly diagnosed epilepsy patients 	Walker et al., 2017

S.N., serial number; ↑, increased; ↓, decreased; BBB, blood-brain barrier; Pgp, P-glycoprotein; MES, maximal electroshock seizures; KA, kainic acid; PTZ, pentylenetetrazol; HMGB1, high mobility group box 1; EEG, electroencephalogram; MDR1A/B, multidrug resistance protein 1A/B; RAGE, receptor for advanced glycation end products; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; miR-129-5p, micro RNA-129-5p; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; AE, autoimmune encephalitis; mAb, monoclonal antibody; PRNCs, primary rats neural cells.

rhythm and basic physical functions as it prevents the translocation of HMGB1 from nuclei following a seizure. This anti-seizure effect was not observed in TLR4 knockout mice (Table 3) (Zhao et al., 2017). Moreover, anti-HMGB1 mAb also demonstrated a disease-modifying anti-epileptogenic effect on epileptogenesis after SE, as evidenced by a reduced seizure frequency and improved cognitive function (Zhao et al., 2017). The minimization of seizure frequency and duration can be achieved by inhibitors of HMGB1 which is supposed

to act via targeting the HMGB1/RAGE/TLR4 axis and retard seizure precipitation via inhibition of HMGB1 translocation, protection of BBB integrity. In a similar line, anti-HMGB1 mAb exhibited inhibitory effects on the BBB leakage and pilocarpine-induced HMGB1 translocation. As well as prevented the BBB permeability and reduced HMGB1 translocation (Table 3) (Fu et al., 2017). Zhao et al. (2017) evaluated the anti-epileptic effect of anti-HMGB1 mAb on human brain slices from clinical drug-resistant epilepsy patients (Table 3)



where anti-HMGB1 mAb binds to HMGB1 and demonstrate long-lasting anti-epileptic properties, which is consistent with the previously estimated long half-time elimination in the brain (Zhang et al., 2011).

Extensive research highlights the putative role of HMGB1 in seizure generation, increased expression level of HMGB1 in epileptic brain (Chen et al., 2015) retardation of seizure precipitation by HMGB1 inhibitors (Zhao et al., 2017) implicating that HMGB1 is involved in all aspect from seizure generation to seizure retardation making HMGB1 as a strong candidate to be a reliable biomarkers for epileptogenesis. Moreover, the prevailing prognostic markers for seizure recurrence and seizure remission in patients diagnosed with epilepsy are solely based on supplementary factors including age, seizure type, EEG, and MRI, but are limited in their accuracy (Ravizza et al., 2017). Earlier study recommended HMGB1 isoforms as a mechanistic biomarkers for epileptogenesis where they investigate the value of blood HMGB1 in predicting epilepsy development as well as differentiating epileptogenic from non-epileptogenic rats after SE (Walker et al., 2017). HMGB1 as a biomarker of epileptogenesis will eventually provide a deeper insight on the normal biologic processes, pathogenic processes, or responses to an exposure or intervention, including therapeutic interventions with broad applications that are clinically able to arrest disease progression or to improve its clinical course. Moreover, precise understanding of mechanistic pathway on how HMGB1 induce seizure via inflammatory signaling will play a vital role in designing new therapies targeting inflammatory

pathways to minimize seizures. However, the association between HMGB1 and seizure needs further exploration. Overall findings suggest that blocking the HMGB1/TLR4/RAGE regulatory axis may represent a novel method for treating epilepsy.

ROLE OF HMGB1 IN COGNITIVE DYSFUNCTION

Cognition refers to a collection of cognitive phenomenon such as learning and memory, attention, executive function, consciousness, and language (McAfoose and Baune, 2009). Cognitive dysfunction is among the most prevalent and debilitating features highly associated with epilepsy (de Krom, 2006), PD (Kalia, 2018), AD (Elgh et al., 2006). The precise mechanism of cognitive dysfunction is not well understood, though there is an increased understanding about chronic activation of cytokine-dependent inflammatory signaling contributing to neuronal dysfunctions manifesting as cognitive deficits (Cunningham and Sanderson, 2008). In addition, increased brain cytokine signaling impairs learning and memory (Dantzer et al., 2008). Moreover, neuroinflammation has been reported to cause memory impairments as evidenced by an experimental study where LPS administration cause memory impairment via inducing neuroinflammation (Lee et al., 2008). Several study has been reported where cognitive impairment has been ameliorated via alleviating neuroinflammation (Ganai and Husain, 2018).

The main focus of the topic is HMGB1, which is an initiator and amplifier of neuroinflammatory process. HMGB1 has been implicated in impairing memory via mediating RAGE and TLR4 (Mazarati et al., 2011) however, the exact mechanism of HMGB1 in cognitive decline is limited. HMGB1 exhibits pro-excitatory effects in the hippocampus by elevating the phosphorylation of NR2B-NMDA receptors (Maroso et al., 2010), and thus increasing the receptor calcium channel conductance (Viviani et al., 2003). NR2B-containing NMDA receptors prevent cell surface expression of the GluR1 subunit of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptor (Kim et al., 2005), which has a key role in both synaptic plasticity and memory (Sanderson et al., 2008), including the NORT (Schiapparelli et al., 2006). In the adult brain, NR2B decreases the span of retrovirus-associated DNA sequences (Ras)/extracellular signal-regulated kinases (ERK) activation pathway (Kim et al., 2005), which might also contribute to memory impairment (Weeber and Sweatt, 2002). Remarkably, the same mechanism that modulates the seizure-facilitating effect of HMGB1 (i.e., the activation of NR2B-containing NMDA receptor) might be simultaneously involved in facilitating learning deficits. Recombinant HMGB1 impaired memory encoding in wild type (WT), TLR4 knockout and RAGE knockout animals, but no effect was observed either on memory consolidation, nor retrieval. Moreover, memory deficits was not exhibited on TLR4 knockout nor RAGE knockout mice *per se*. Blockade of TLR4 in RAGE knockout mice using *Rhodobacter sphaeroides* LPS attenuated the memory function impaired by HMGB1 (Mazarati et al., 2011). The upregulation of microglia and systemic HMGB1 levels were correlated with cognitive dysfunction (Terrando et al., 2010). IL-1 modulation has been implicated to ameliorate LPS-induced cognitive dysfunction, however, IL-1 blockade ameliorated cognitive decline by reducing microglia without affecting HMGB1 (Terrando et al., 2010).

Plausible detrimental effects of HMGB1 on memory may have broad clinical implications. In an experimental model of chronic cerebral hypoperfusion (CCH), HMGB1 neutralization attenuates hippocampal neuronal death and cognitive impairment where anti-HMGB1 neutralizing Ab exerts long-time positive effects on hippocampal CA1 neuronal survival and cognitive abilities in the chronic phase of CCH as well as preserves BBB integrity, and suppresses hippocampal glial activation, pro-inflammatory cytokine production (Hei et al., 2018). Anti-HMGB1 mAb has ameliorated the symptoms and phenotype of AD in an experimental model where mAb against HMGB1 completely rescued cognitive impairment in a mouse model via inhibiting neurite degeneration even in the presence of amyloid beta ($A\beta$) plaques. The recovery in the memory impairment was evidenced by Y-maze test (Fujita et al., 2016).

Post-operative cognitive dysfunction is probably the most frequent type of postoperative cognitive impairment and the pathophysiology of POCD remains incompletely understood (Grape et al., 2012). HMGB1 has been extensively studied against POCD. Possible role of neuroinflammation mediated by HMGB1, RAGE, and S100B (a class of DAMPs) was hypothesized in the pathophysiology of POCD, however, the relationship between HMGB1 or S100B or RAGE signaling

and cognitive dysfunction was not completely confirmed (Li et al., 2013). HMGB1 and RAGE levels were remarkably upregulated after surgery and HMGB1 is supposed to cause cognitive decline via breaking BBB permeability, however, study did not conclude either BBB is disrupted after surgery and relationship between HMGB1 and cognitive decline cannot be ascertained as the study did not selectively block HMGB1 using mAb (He et al., 2012). Administration of endogenous HMGB1 proteins produced cognitive decline in mice and neutralized HMGB1 mAb ameliorated cognitive decline and inhibited the inflammatory response after tibial surgery, suggesting a initiating role for this mediator in POCD (Table 4) (Vacas et al., 2014). As well as clinical data obtained from patients undergoing gastrointestinal surgery showed that serum HMGB1 and IL-6 levels was elevated post-surgery, and the increased post-operative HMGB1 and IL-6 levels were associated with the cognitive decline that occurs 1-week post-surgery (Table 4) (Lin et al., 2014). Oral pretreatment of glycyrrhizin inhibited HMGB1 cytosolic expression, alleviates the surgery-induced HMGB1 upregulation in the hippocampus of the mice and attenuated the severity of post-operative memory impairment, as evidenced by the shorter swimming latency and distance in MWM trials (Chen et al., 2017a). The therapeutic benefits of HMGB1 have been explored in sepsis survivors where HMGB1 mediates cognitive dysfunction in a murine model of severe sepsis survivors (Chavan et al., 2012). Administration of neutralizing anti-HMGB mAb to survivors, beginning 1 week after the onset of peritonitis, significantly ameliorate memory impairments and brain pathology.

Cognitive decline induced by epilepsy is supported by number of previous studies (Kundap et al., 2017). Earlier studies documented selective deficits in memory encoding in TLE (Schwarze et al., 2009). The plausible role of HMGB1 in epilepsy induced cognitive dysfunction has not yet been reported, though administration of anti-HMGB1 mAb in mice delayed epilepsy onset as well as ameliorated cognitive functions (Zhao et al., 2017). However, the precise role of HMGB1 protein in epilepsy induced cognitive dysfunction has not yet been reported. In order to obtain a precise understanding, it is necessary to perform a longitudinal studies to investigate the levels of HMGB1 in epileptic animal models and concurrently undertake behavioral studies to assess the cognitive function of the animals and evaluate the expression pattern of HMGB1 throughout the study.

There are very few clinical studies that have been conducted till date regarding the effectiveness of anti-HMGB1 mAb on ameliorating cognitive dysfunction in patients. Foo et al. (2017) earlier reported that an interaction between HMGB1 and APOE- ϵ 4 is associated with cortical thinning in MCI. This interaction was observed by studying genomic DNA extracted from peripheral blood and the plasma HMGB1 was measured with an ELISA kit (Table 4) (Foo et al., 2017). In human brain slice studies obtained from surgical resection of clinical drug-resistant epilepsy patients, anti-HMGB1 mAb demonstrated an attenuation of cognitive function as well as a disease-modifying anti-epileptogenesis effect, which is indicated by reduction in seizure frequency (Zhao et al., 2017).

TABLE 4 | Summary of findings reporting HMGB1 in cognitive dysfunction.

S.N.	Intervention	Model	Mechanism	Observation	Reference
1	HMGB1	Mice	<ul style="list-style-type: none"> Activation of inflammatory pathways by stimulating RAGE and TLR4 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Brain levels of HMGB1 induce cognitive abnormalities and are mediated by either TLR4 or RAGE. 	Mazarati et al., 2011
2	HMGB1	Mice	<ul style="list-style-type: none"> Activation and trafficking of circulating bone marrow-derived macrophages to the brain 	<ul style="list-style-type: none"> POCD can be prevented by minimizing the effects of HMGB1 A neutralizing antibody to HMGB1 protein reduced memory dysfunction 	Vacas et al., 2014
3	HMGB1	Mice	<ul style="list-style-type: none"> Neuroinflammation mediated by HMGB1 and RAGE 	<ul style="list-style-type: none"> Expression of HMGB1, RAGE and NF-κB p6 ↑ after surgery. HMGB1 and RAGE signaling modulate the hippocampal inflammatory response 	Koeth et al., 2013
4	HMGB1	Rat	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 and RAGE signaling 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 and RAGE ↑ in the hippocampus of operated animals HMGB1 interrupt and regulate the inflammatory response associated with the pathogenesis of POCD 	He et al., 2012
5	HMGB1	Human	<ul style="list-style-type: none"> Interaction between APOE-ε4 and HMGB1 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 showed an association with ↓ cortical thickness APOE-ε4 and HMGB1 are responsible for extensive cortical thinning in MCI. 	Foo et al., 2017
6	HMGB1	Human	<ul style="list-style-type: none"> POCD induced via inflammatory response 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1, IL-6 levels ↑ in patients after surgery Elevated levels of HMGB1, IL-6 might be associated with cognitive dysfunctions after surgery 	Lin et al., 2014

S.N., serial number; ↑, increased; ↓, decreased; HMGB1, high mobility group box 1; TLR4, toll like receptor 4; RAGE, receptor for advanced glycation end products; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TEM, transmission electron microscopy; IHC, immunohistochemistry; MCI, mild cognitive impairments; APOE-ε4, Apo lipoprotein E ε4; IL-6, interleukin-6; POCD, post-operative cognitive dysfunctions.

HMGB1: TRANSLATIONAL IMPLICATION

Recent investigation shed more light on multiple roles of HMGB1 in a diverse range of pathologies such as brain injury, epilepsy, and neuroinflammation and cognitive decline. Treatments based on HMGB1 antagonists via targeting extracellular HMGB1 have generated encouraging results in a wide number of experimental models of aforementioned HMGB1 mediated pathologies, though the clinical studies are yet to be reported. However, complex biology of HMGB1 has not been fully understood yet and there is a notion that association between HMGB1 and brain injury, epilepsy, neuroinflammation mediated pathologies and cognitive decline requires deeper exploration, as the precise mechanism of on how HMGB1 mediates these neurological conditions are yet to be well documented. Despite of that, the identification of HMGB1 inhibitors results in significant experimental and clinical interest. Moreover, HMGB1 as a common biomarker of TBI, neuroinflammation, epileptogenesis and cognitive decline might be instrumental in assessing the disease progression, early prediction of disease as well

as evaluating patient's response to therapy. Translational implication of HMGB1 will be a paradigm shift, which will not only overcome the limitation of currently available AEDs, improve the cognitive decline as well. Moreover, via inhibiting the neuroinflammatory pathways HMGB1 can ameliorate several brain injuries and neuroinflammation mediated pathologies. More precisely, inhibiting HMGB1/RAGE/TLR4 pathway represents a promising approach which can interfere with disease progression in epileptogenesis, neuroinflammatory disease, several forms of brain injury as well as memory impairment. The focus of the topic is TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive decline, however, blocking HMGB1 might achieves significant neuroprotection in several forms of neurodegenerative disorders where neuroinflammation plays a crucial role. Future strategy should be focused on exploring several HMGB1 antagonist which can efficiently interact with the main HMGB1-receptor, RAGE, acting as competitive antagonists of HMGB1, such as recombinant box A (the truncated N-terminal domain of HMGB1) or S100P-derived RAGE peptide (Musumeci et al., 2014).

SUMMARY OF FINDINGS AND CONCLUSION

Neuroinflammation has been implicated in ranges of neurological disorders such as TBI, epilepsy and memory impairment. HMGB1 being the mediator of neuroinflammation has been reported to play crucial role in TBI, neuroinflammatory diseases and epileptogenesis via an unknown mechanism. As well as elevated level of HMGB1 in serum and CSF has been observed in these neuroinflammation mediated pathologies. These strengthens the rationale of our study in suggesting HMGB1 as a common biomarker in TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive decline. Biomarker discovery together with investigations into novel therapeutic candidates would give a noteworthy headway in the treatment of TBI, epilepsy, memory impairment and neuroinflammation via acting on its mechanistic pathway rather than symptomatic control. In current review, an attempt was made to connect the dots between HMGB1 and its putative role in several forms of brain injury, neuroinflammation mediated conditions, epilepsy and cognitive decline using preclinical and clinical evidence.

Several important limitations regarding the topic should not be ruled out, such as feasibility and viability issues in making HMGB1 a common functional biomarker for neuroinflammation mediated pathologies discussed herein. Can inhibiting HMGB1/RAGE/TLR4 axis be a common target for these neurological conditions? Can therapeutic outcomes obtained from experimental evidence regarding the role of HMGB1 in all these neurological conditions be easily translated into clinical settings? These are the concerns that remains unsolved as more experimental data are yet to come.

Despite accumulating scientific evidence of HMGB1 in the neuroinflammation mediated conditions discussed in current review, no attempt has been made in portraying HMGB1 as common biomarker and target for these HMGB1 mediated

neurological conditions. We suggest, HMGB1 proteins can be considered as a promising non-invasive, common biomarker of TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive dysfunction as it meets many criteria to stand as a common biomarker. It is relatively stable in blood and can be rapidly and inexpensively measured in blood. Moreover, changes in the total HMGB1 levels in the brain during neurological conditions discussed herein, can be mirrored in the blood.

As a concluding remark, drawing evidence from earlier preclinical and clinical studies, the current review advances the concept of positioning HMGB1 as common functional biomarker that can significantly improve risk assessment, diagnosis and monitoring of the neurological diseases discussed in this review. As well as HMGB1 can emerge as a novel avenues against TBI, neuroinflammation, epilepsy and cognitive deficits which acts by blocking the neuroinflammatory pathway.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YP and MS carried out literature review, conceptualized, designed and drafted the manuscript. AC, YK, ÁA-S, KA, MA and IO provided critical revisions and contributed to the final manuscript. YK also designed the figures. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Mr. Vineet Mehta, Ph.D., Jaypee University of Information Technology, India for his contribution in assessing manuscript. In addition, we are also thankful to Brandon Choo Kar Meng, Charlotte Squier, and Uday Praful Kundap, Monash University Malaysia for their effort in proof reading the manuscript.

REFERENCES

- Ai, P., Zhang, X., Xie, Z., Liu, G., Liu, X., Pan, S., et al. (2018). The HMGB1 is increased in CSF of patients with an Anti-NMDAR encephalitis. *Acta Neurol. Scand.* 137, 277–282. doi: 10.1111/ane.12850
- Andersson, Å., Covacu, R., Sunnemark, D., Danilov, A. I., Bianco, A., Khademi, M., et al. (2008). Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1248–1255. doi: 10.1189/jlb.1207844
- Andersson, U., Yang, H., and Harris, H. (2018). Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 22, 263–277. doi: 10.1080/14728222.2018.1439924
- Annegers, J. F., and Coan, S. P. (2000). The risks of epilepsy after traumatic brain injury. *Seizure* 9, 453–457. doi: 10.1053/seiz.2000.0458
- Aroniadou-Anderjaska, V., Fritsch, B., Qashu, F., and Braga, M. F. (2008). Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res.* 78, 102–116. doi: 10.1016/j.eplesyres.2007.11.011
- Ashrafi, M. R., Shams, S., Nouri, M., Mohseni, M., Shabani, R., Yekaninejad, M. S., et al. (2007). A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia* 48, 1750–1755. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01143.x
- Au, A. K., Aneja, R. K., Bell, M. J., Bayir, H., Feldman, K., Adelson, P. D., et al. (2012). Cerebrospinal fluid levels of high-mobility group box 1 and cytochrome C predict outcome after pediatric traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 29, 2013–2021. doi: 10.1089/neu.2011.2171
- Aucott, H., Lundberg, J., Salo, H., Klevenvall, L., Damberg, P., Ottosson, L., et al. (2018a). Neuroinflammation in response to intracerebral injections of different HMGB1 redox isoforms. *J. Innate Immun.* 10, 215–227. doi: 10.1159/000487056
- Aucott, H., Sowinska, A., Harris, H. E., and Lundback, P. (2018b). Ligation of free HMGB1 to TLR2 in the absence of ligand is negatively regulated by the C-terminal tail domain. *Mol. Med.* 24:19. doi: 10.1186/s10020-018-0021-x
- Bar-Klein, G., Lublinsky, S., Kamintsky, L., Noyman, I., Veksler, R., Dalipaj, H., et al. (2017). Imaging blood–brain barrier dysfunction as a biomarker for epileptogenesis. *Brain* 140, 1692–1705. doi: 10.1093/brain/awx073
- Barlow, K. M., Spowart, J. J., and Minns, R. A. (2000). Early posttraumatic seizures in non-accidental head injury: relation to outcome. *Dev. Med. Child Neurol.* 42, 591–594. doi: 10.1017/S0012162200001110
- Baxevas, A. D., and Landsman, D. (1995). The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. *Nucleic Acids Res.* 23, 1604–1613. doi: 10.1093/nar/23.9.1604
- Bianchi, M. E., and Manfredi, A. A. (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 220, 35–46. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00574.x
- Casula, M., Iyer, A., Spliet, W., Anink, J., Steentjes, K., Sta, M., et al. (2011). Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience* 179, 233–243. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.001

- Chandrashekar, V., Seth, R. K., Dattaroy, D., Alhasson, F., Ziolenka, J., Carson, J., et al. (2017). HMGB1-RAGE pathway drives peroxynitrite signaling-induced IBD-like inflammation in murine nonalcoholic fatty liver disease. *rDX bIO* 13, 8–19. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.005
- Chavan, S. S., Huerta, P. T., Robbiati, S., Valdes-Ferrer, S. I., Ochani, M., Dancho, M., et al. (2012). HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors. *Mol. Med.* 18, 930–937. doi: 10.2119/molmed.2012.00195
- Chen, X., Hua, H.-P., Liang, L., and Liu, L.-J. (2017a). The oral pretreatment of glycyrrhizin prevents surgery-induced cognitive impairment in aged mice by reducing neuroinflammation and alzheimer's-related pathology via HMGB1 inhibition. *J. Mol. Neurosci.* 63, 385–395. doi: 10.1007/s12031-017-0989-7
- Chen, X., Wu, S., Chen, C., Xie, B., Fang, Z., Hu, W., et al. (2017b). Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.* 14:143. doi: 10.1186/s12974-017-0917-3
- Chen, Y., Huang, X.-J., Yu, N., Xie, Y., Zhang, K., Wen, F., et al. (2015). HMGB1 contributes to the expression of P-glycoprotein in mouse epileptic brain through toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products. *PLoS One* 10:e0140918. doi: 10.1371/journal.pone.0140918
- Cheng, X., Yang, Y.-L., Yang, H., Wang, Y.-H., and Du, G.-H. (2018). Kaempferol alleviates LPS-induced neuroinflammation and BBB dysfunction in mice via inhibiting HMGB1 release and down-regulating TLR4/MyD88 pathway. *Int. Immunopharmacol.* 56, 29–35. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.002
- Coco, D. L., Veglianesi, P., Allievi, E., and Bendotti, C. (2007). Distribution and cellular localization of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in the spinal cord of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Lett.* 412, 73–77. doi: 10.1016/j.neulet.2006.10.063
- Cohen, M. J., Brohi, K., Calfee, C. S., Rahn, P., Chesebro, B. B., Christiaans, S. C., et al. (2009). Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit. Care* 13:R174. doi: 10.1186/cc8152
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
- Craft, J. M., Watterson, D. M., and Van Eldik, L. J. (2005). Neuroinflammation: a potential therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* 9, 887–900. doi: 10.1517/14728222.9.5.887
- Cunningham, C., and Sanderson, D. J. (2008). Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL- β on learning and memory. *Brain Behav. Immun.* 22, 1117–1127. doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.007
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., and Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9:46. doi: 10.1038/nrn2297
- de Krom, M. (2006). Cognitive dysfunction in epilepsy. *Seizure-Eur. J. Epilepsy* 15, 264–266. doi: 10.1016/j.seizure.2006.02.020
- DeKosky, S. T., Blennow, K., Ikonovic, M. D., and Gandy, S. (2013). Acute and chronic traumatic encephalopathies: pathogenesis and biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 192–200. doi: 10.1038/nrnneurol.2013.36
- Elgh, E., Åstot, A. L., Fagerlund, M., Eriksson, S., Olsson, T., and Näsman, B. (2006). Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 59, 155–161. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.06.017
- Fang, H., Wang, P.-F., Zhou, Y., Wang, Y.-C., and Yang, Q.-W. (2013). Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury. *J. Neuroinflamm.* 10:794. doi: 10.1186/1742-2094-10-27
- Fang, P., Schachner, M., and Shen, Y. Q. (2012). HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 45, 499–506. doi: 10.1007/s12035-012-8264-y
- Festoff, B. W., Sajja, R. K., van Dreden, P., and Cucullo, L. (2016). HMGB1 and thrombin mediate the blood-brain barrier dysfunction acting as biomarkers of neuroinflammation and progression to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflamm.* 13:194. doi: 10.1186/s12974-016-0670-z
- Fonken, L. K., Frank, M. G., Kitt, M. M., D'Angelo, H. M., Norden, D. M., Weber, M. D., et al. (2016). The alarmin HMGB1 mediates age-induced neuroinflammatory priming. *J. Neurosci.* 36, 7946–7956. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1161-16.2016
- Foo, H., Ng, K. P., Tan, J., Lim, L., Chander, R. J., Yong, T. T., et al. (2017). Interaction between APOE- ϵ 4 and HMGB1 is associated with widespread cortical thinning in mild cognitive impairment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2017:315869.
- Frank, M. G., Weber, M. D., Fonken, L. K., Hershman, S. A., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2016). The redox state of the alarmin HMGB1 is a pivotal factor in neuroinflammatory and microglial priming: a role for the NLRP3 inflammasome. *Brain Behav. Immun.* 55, 215–224. doi: 10.1016/j.bbi.2015.10.009
- Frank, M. G., Weber, M. D., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2015). Stress sounds the alarmin: the role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav. Immun.* 48, 1–7. doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.010
- Frey, L. C. (2003). Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 44 (Suppl 10), 11–17. doi: 10.1046/j.1528-1157.44.s10.4.x
- Fu, L., Liu, K., Wake, H., Teshigawara, K., Yoshino, T., Takahashi, H., et al. (2017). Therapeutic effects of anti-HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Sci. Rep.* 7:1179. doi: 10.1038/s41598-017-01325-y
- Fujita, K., Motoki, K., Tagawa, K., Chen, X., Hama, H., Nakajima, K., et al. (2016). HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 6:31895. doi: 10.1038/srep31895
- Ganai, A. A., and Husain, M. (2018). Genistein alleviates neuroinflammation and restores cognitive function in rat model of hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Mol. Neurobiol.* 55, 1762–1772. doi: 10.1007/s12035-017-0454-1
- Gao, H.-M., Zhou, H., Zhang, F., Wilson, B. C., Kam, W., and Hong, J.-S. (2011). HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J. Neurosci.* 31, 1081–1092. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3732-10.2011
- Gao, T., Chen, Z., Chen, H., Yuan, H., Wang, Y., Peng, X., et al. (2018). Inhibition of HMGB1 mediates neuroprotection of traumatic brain injury by modulating the microglia/macrophage polarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497, 430–436. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.102
- Gao, T. L., Yuan, X. T., Yang, D., Dai, H. L., Wang, W. J., Peng, X., et al. (2012). Expression of HMGB1 and RAGE in rat and human brains after traumatic brain injury. *J. Trauma Acute Care Surg.* 72, 643–649. doi: 10.1097/TA.0b013e31823c54a6
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G. W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* 20, 269–287. doi: 10.1016/0165-0173(94)00015-H
- Gloor, S. M., Wachtel, M., Bolliger, M. F., Ishihara, H., Landmann, R., and Frei, K. (2001). Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Res. Rev.* 36, 258–264. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00102-3
- González-Reyes, S., Santillán-Cigales, J. J., Jiménez-Osorio, A. S., Pedraza-Chaverri, J., and Guevara-Guzmán, R. (2016). Glycyrrhizin ameliorates oxidative stress and inflammation in hippocampus and olfactory bulb in lithium/pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsy Res.* 126, 126–133. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.07.007
- Grape, S., Ravussin, P., Rossi, A., Kern, C., and Steiner, L. (2012). Postoperative cognitive dysfunction. *Trends Anaesth. Crit. Care* 2, 98–103. doi: 10.1016/j.tacc.2012.02.002
- Harris, H. E., Andersson, U., and Pisetsky, D. S. (2012). HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8:195. doi: 10.1038/nrrheum.2011.222
- Hauser, W. A., Annegers, J. F., and Kurland, L. T. (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984. *Epilepsia* 34, 453–458. doi: 10.1111/j.1528-1157.1993.tb02586.x
- He, H. J., Wang, Y., Le, Y., Duan, K. M., Yan, X. B., Liao, Q., et al. (2012). Surgery upregulates high mobility group box-1 and disrupts the blood-brain barrier causing cognitive dysfunction in aged rats. *CNS Neurosci. Therap.* 18, 994–1002. doi: 10.1111/cns.12018
- Hei, Y., Chen, R., Yi, X., Long, Q., Gao, D., and Liu, W. (2018). HMGB1 neutralization attenuates hippocampal neuronal death and cognitive impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion via suppressing inflammatory responses and oxidative stress. *Neuroscience* 383, 150–159. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.010

- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405. doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5
- Hinson, H. E., Rowell, S., and Schreiber, M. (2015). Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: a systematic review. *J. Trauma Acute Care Surg.* 78, 184–191. doi: 10.1097/TA.0000000000000468
- Hong, H., Kim, B. S., and Im, H.-I. (2016). Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Int. Neurol.* 20(Suppl. 1), S2. doi: 10.5213/inj.1632604.302
- Huang, W., András, I. E., Rha, G. B., Hennig, B., and Toborek, M. (2011). PPAR α and PPAR γ protect against HIV-1-induced MMP-9 overexpression via caveolae-associated ERK and Akt signaling. *FASEB J.* 25, 3979–3988. doi: 10.1096/fj.11-188607
- Hwang, C.-S., Liu, G.-T., Chang, M. D.-T., Liao, I.-L., and Chang, H.-T. (2013). Elevated serum autoantibody against high mobility group box 1 as a potent surrogate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 58, 13–18. doi: 10.1016/j.nbd.2013.04.013
- Ieong, C., Sun, H., Wang, Q., and Ma, J. (2018). Glycyrrhizin suppresses the expressions of HMGB1 and ameliorates inflammatory effect after acute subarachnoid hemorrhage in rat model. *J. Clin. Neurosci.* 47, 278–284. doi: 10.1016/j.jocn.2017.10.034
- Iori, V. (2017). *Epigenetic and Pharmacological Targeting of Neuroinflammation as Novel Therapeutic Interventions for epilepsy*. Ph.D. thesis, Faculty of Medicine (AMC-UvA), Amsterdam.
- Iori, V., Maroso, M., Rizzi, M., Iyer, A. M., Vertemara, R., Carli, M., et al. (2013). Receptor for advanced glycation endproducts is upregulated in temporal lobe epilepsy and contributes to experimental seizures. *Neurobiol. Dis.* 58, 102–114. doi: 10.1016/j.nbd.2013.03.006
- Ito, M., Takahashi, H., Yano, H., Shimizu, Y. I., Yano, Y., Ishizaki, Y., et al. (2017). High mobility group box 1 enhances hyperthermia-induced seizures and secondary epilepsy associated with prolonged hyperthermia-induced seizures in developing rats. *Metab. Brain Dis.* 32, 2095–2104. doi: 10.1007/s11011-017-0103-4
- Jiang, H., Wang, Y., Liang, X., Xing, X., Xu, X., and Zhou, C. (2018). Toll-like receptor 4 knockdown attenuates brain damage and neuroinflammation after traumatic brain injury via inhibiting neuronal autophagy and astrocyte activation. *Cell Mol. Neurobiol.* 38, 1009–1019. doi: 10.1007/s10571-017-0570-5
- Kalia, L. V. (2018). Biomarkers for cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 46, S19–S23. doi: 10.1016/j.parkrel.2017.07.023
- Kaneko, Y., Pappas, C., Malapira, T., Vale, F. L., Tajiri, N., and Borlongan, C. V. (2017). Extracellular HMGB1 modulates glutamate metabolism associated with kainic acid-induced epilepsy-like hyperactivity in primary rat neural cells. *Cell Physiol. Biochem.* 41, 947–959. doi: 10.1159/000460513
- Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., et al. (2014). HMGB1 in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 40, 1–116. doi: 10.1016/j.mam.2014.05.001
- Kim, J. B., Choi, J. S., Yu, Y. M., Nam, K., Piao, C. S., Kim, S. W., et al. (2006). HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J. Neurosci.* 26, 6413–6421. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3815-05.2006
- Kim, M. J., Dunah, A. W., Wang, Y. T., and Sheng, M. (2005). Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46, 745–760. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.031
- Kobori, N., Clifton, G. L., and Dash, P. (2002). Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 104, 148–158. doi: 10.1016/S0169-328X(02)00331-5
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., et al. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* 19:576. doi: 10.1038/nm.3145
- Kumar, A., and Loane, D. J. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav. Immun.* 26, 1191–1201. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.008
- Kundap, U. P., Kumari, Y., Othman, I., and Shaikh, M. (2017). Zebrafish as a model for epilepsy-induced cognitive dysfunction: a pharmacological, biochemical and behavioral approach. *Front. Pharmacol.* 8:515. doi: 10.3389/fphar.2017.00515
- Laird, M. D., Shields, J. S., Sukumari-Ramesh, S., Kimbler, D. E., Fessler, R. D., Shakir, B., et al. (2014). High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia* 62, 26–38. doi: 10.1002/glia.22581
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W., et al. (2008). Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J. Neuroinflamm.* 5:37. doi: 10.1186/1742-2094-5-37
- Lee, S., Nam, Y., Koo, J. Y., Lim, D., Park, J., Ock, J., et al. (2014). A small molecule binding HMGB1 and HMGB2 inhibits microglia-mediated neuroinflammation. *Nat. Chem. Biol.* 10:1055. doi: 10.1038/nchembio.1669
- Lee, W., Kim, T. H., Ku, S.-K., Min, K.-J., Lee, H.-S., Kwon, T. K., et al. (2012). Barrier protective effects of withaferin A in HMGB1-induced inflammatory responses in both cellular and animal models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 91–98. doi: 10.1016/j.taap.2012.04.025
- Lei, C., Lin, S., Zhang, C., Tao, W., Dong, W., Hao, Z., et al. (2013). High-mobility group box1 protein promotes neuroinflammation after intracerebral hemorrhage in rats. *Neuroscience* 228, 190–199. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.023
- Lewis, C.-A., Manning, J., Rossi, F., and Krieger, C. (2012). The neuroinflammatory response in ALS: the roles of microglia and T cells. *Neurol. Res. Int.* 2012:803701. doi: 10.1155/2012/803701
- Li, D., Liu, N., Zhao, H.-H., Zhang, X., Kawano, H., Liu, L., et al. (2017). Interactions between Sirt1 and MAPKs regulate astrocyte activation induced by brain injury in vitro and in vivo. *J. Neuroinflamm.* 14:67. doi: 10.1186/s12974-017-0841-6
- Li, Y., Li, X., Qu, Y., Huang, J., Zhu, T., Zhao, F., et al. (2017). Role of HMGB1 translocation to neuronal nucleus in rat model with septic brain injury. *Neurosci. Lett.* 645, 90–96. doi: 10.1016/j.neulet.2016.11.047
- Li, R. L., Zhang, Z. Z., Peng, M., Wu, Y., Zhang, J. J., Wang, C. Y., et al. (2013). Postoperative impairment of cognitive function in old mice: a possible role for neuroinflammation mediated by HMGB1, S100B, and RAGE. *J. Surg. Res.* 185, 815–824. doi: 10.1016/j.jss.2013.06.043
- Lin, G. X., Wang, T., Chen, M. H., Hu, Z. H., and Ouyang, W. (2014). Serum high-mobility group box 1 protein correlates with cognitive decline after gastrointestinal surgery. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 58, 668–674. doi: 10.1111/aas.12320
- Liu, A.-H., Wu, Y.-T., and Wang, Y.-P. (2017). MicroRNA-129-5p inhibits the development of autoimmune encephalomyelitis-related epilepsy by targeting HMGB1 through the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Brain Res. Bull.* 132, 139–149. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.004
- Liu, Z., Yang, C., Meng, X., Li, Z., Lv, C., and Cao, P. (2018). Neuroprotection of edaravone on the hippocampus of kainate-induced epilepsy rats through Nrf2/HO-1 pathway. *Neurochem. Int.* 112, 159–165. doi: 10.1016/j.neuint.2017.07.001
- Lotze, M. T., and Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 331–342. doi: 10.1038/nri1594
- Luo, L., Jin, Y., Kim, I.-D., and Lee, J.-K. (2014). Glycyrrhizin suppresses HMGB1 inductions in the hippocampus and subsequent accumulation in serum of a kainic acid-induced seizure mouse model. *Cell. Mol. Neurobiol.* 34, 987–997. doi: 10.1007/s10571-014-0075-4
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A. M., et al. (2010). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat. Med.* 16:413. doi: 10.1038/nm.2127
- Mazarati, A., Maroso, M., Iori, V., Vezzani, A., and Carli, M. (2011). High-mobility group box-1 impairs memory in mice through both toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products. *Exp. Neurol.* 232, 143–148. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.012
- McAfoose, J., and Baune, B. (2009). Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 355–366. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.10.005
- Meneghini, V., Bortolotto, V., Francese, M. T., Dellarole, A., Carraro, L., Terziava, S., et al. (2013). High-mobility group box-1 protein and β -amyloid oligomers promote neuronal differentiation of adult hippocampal neural

- progenitors via receptor for advanced glycation end products/nuclear factor- κ B axis: relevance for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 33, 6047–6059. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2052-12.2013
- Metting, Z., Wilczak, N., Rodiger, L., Schaaf, J., and Van Der Naalt, J. (2012). GFAP and S100B in the acute phase of mild traumatic brain injury. *Neurology* 78, 1428–1433. doi: 10.1212/WNL.0b013e318253d5c7
- Miller, S. D., Karpus, W. J., and Davidson, T. S. (2010). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr. Protoc. Immunol.* 88, 15.11.11–15.11.20. doi: 10.1002/0471142735.im1501s88
- Mohamed, A., Elbohi, K., Sharkawy, N., and Hassan, M. (2017). Biochemical and apoptotic biomarkers as indicators of time elapsed since death in experimentally induced traumatic brain injury. *SM J. Forensic Res. Criminol.* 1:1010.
- Morganti-Kossmann, M. C., Rancan, M., Stahel, P. F., and Kossmann, T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr. Opin. Crit. Care* 8, 101–105. doi: 10.1097/00075198-200204000-00002
- Musumeci, D., Roviello, G. N., and Montesarchio, D. (2014). An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacol. Therap.* 141, 347–357. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.11.001
- Nakahara, T., Tsuruta, R., Kaneko, T., Yamashita, S., Fujita, M., Kasaoka, S., et al. (2009). High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit. Care* 11:362. doi: 10.1007/s12028-009-9276-y
- Oh, Y. J., Youn, J. H., Ji, Y., Lee, S. E., Lim, K. J., Choi, J. E., et al. (2009). HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J. Immunol.* 182, 5800–5809. doi: 10.4049/jimmunol.0801873
- Okuma, Y., Liu, K., Wake, H., Liu, R., Nishimura, Y., Hui, Z., et al. (2014). Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1–RAGE interaction. *Neuropharmacology* 85, 18–26. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.007
- Okuma, Y., Liu, K., Wake, H., Zhang, J., Maruo, T., Yoshino, T., et al. (2012). Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 72, 373–384. doi: 10.1002/ana.23602
- Palleria, C., Coppola, A., Citraro, R., Del Gaudio, L., Striano, S., De Sarro, G., et al. (2015). Perspectives on treatment options for mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Exp. Opin. Pharmacother.* 16, 2355–2371. doi: 10.1517/14656566.2015.1084504
- Parker, T. M., Nguyen, A. H., Rabang, J. R., Patil, A. A., and Agrawal, D. K. (2017). The danger zone: systematic review of the role of HMGB1 danger signalling in traumatic brain injury. *Brain Inj.* 31, 2–8. doi: 10.1080/02699052.2016.1217045
- Pascente, R., Frigerio, F., Rizzi, M., Porcu, L., Boido, M., Davids, J., et al. (2016). Cognitive deficits and brain myo-Inositol are early biomarkers of epileptogenesis in a rat model of epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 93, 146–155. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.001
- Peltz, E. D., Moore, E. E., Eckels, P. C., Damle, S. S., Tsuruta, Y., Johnson, J. L., et al. (2009). HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock (Augusta, GA)* 32, 17. doi: 10.1097/SHK.0b013e318199717a
- Pitkanen, A., and Lukasiuk, K. (2009). Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 14(Suppl. 1), 16–25. doi: 10.1016/j.yebeh.2008.09.023
- Ransohoff, R. M., and Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528
- Ravizza, T., Terrone, G., Salamone, A., Frigerio, F., Balosso, S., Antoine, D. J., et al. (2017). High mobility group box 1 is a novel pathogenic factor and a mechanistic biomarker for epilepsy. *Brain Behav. Immun.* 72, 14–21. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.008
- Ray, R., Juranek, J. K., and Rai, V. (2016). RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 62, 48–55. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.12.006
- Reddy, D. S. (2013). Neuroendocrine aspects of catamenial epilepsy. *Horm. Behav.* 63, 254–266. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.04.016
- Riaz, K., Galic, M. A., and Pittman, Q. J. (2010). Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy Res.* 89, 34–42. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.09.004
- Richard, S. A., Min, W., Su, Z., and Xu, H. (2017). High mobility group box 1 and traumatic brain injury. *J. Behav. Brain Sci.* 7:50. doi: 10.4236/jbbs.2017.72006
- Robinson, A. P., Caldis, M. W., Harp, C. T., Goings, G. E., and Miller, S. D. (2013). High-mobility group box 1 protein (HMGB1) neutralization ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* 43, 32–43. doi: 10.1016/j.jaut.2013.02.005
- Sanderson, D. J., Good, M. A., Seeburg, P. H., Sprengel, R., Rawlins, J. N., and Bannerman, D. M. (2008). The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog. Brain Res.* 169, 159–178. doi: 10.1016/S0079-6123(07)00009-X
- Sasaki, T., Liu, K., Agari, T., Yasuhara, T., Morimoto, J., Okazaki, M., et al. (2016). Anti-high mobility group box 1 antibody exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 275(Pt 1), 220–231. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.11.003
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195. doi: 10.1038/nature00858
- Schiapparelli, L., Simon, A., Del Rio, J., and Frechilla, D. (2006). Opposing effects of AMPA and 5-HT 1A receptor blockade on passive avoidance and object recognition performance: correlation with AMPA receptor subunit expression in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 50, 897–907. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.02.005
- Schierbeck, H., Lundback, P., Palmblad, K., Klevenvall, L., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., et al. (2011). Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Mol. Med.* 17, 1039–1044. doi: 10.2119/molmed.2010.00264
- Schwarze, U., Hahn, C., Bengner, T., Stodieck, S., Buchel, C., and Sommer, T. (2009). Enhanced activity during associative encoding in the affected hippocampus in right temporal lobe epilepsy patients. *Brain Res.* 1297, 112–117. doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.036
- Shi, Y., Zhang, L., Teng, J., and Miao, W. (2018). HMGB1 mediates microglia activation via the TLR4/NF- κ B pathway in coriaria lactone induced epilepsy. *Mol. Med. Rep.* 17, 5125–5131. doi: 10.3892/mmr.2018.8485
- Shimada, T., Takemiya, T., Sugiura, H., and Yamagata, K. (2014). Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediat. Inflamm.* 2014:901902. doi: 10.1155/2014/901902
- Sloviter, R. S., and Bumanglag, A. V. (2013). Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69, 3–15. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.01.022
- Song, J.-H., Lee, J.-W., Shim, B., Lee, C.-Y., Choi, S., Kang, C., et al. (2013). Glycyrrhizin alleviates neuroinflammation and memory deficit induced by systemic lipopolysaccharide treatment in mice. *Molecules* 18, 15788–15803. doi: 10.3390/molecules181215788
- Streit, W. J., Mrak, R. E., and Griffin, W. S. T. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J. Neuroinflamm.* 1:14.
- Su, X., Wang, H., Zhao, J., Pan, H., and Mao, L. (2011). Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF-B pathway after traumatic brain injury in the rat. *Mediat. Inflamm.* 2011:807142. doi: 10.1155/2011/807142
- Sun, Y., Chen, H., Dai, J., Zou, H., Gao, M., Wu, H., et al. (2015). HMGB1 expression patterns during the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 280, 29–35. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.02.005
- Tansey, M. G., and Goldberg, M. S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* 37, 510–518. doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.004
- Terrando, N., Rei Fidalgo, A., Vizcaychipi, M., Cibelli, M., Ma, D., Monaco, C., et al. (2010). The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit. Care* 14:R88. doi: 10.1186/cc9019
- Tian, J., Dai, H., Deng, Y., Zhang, J., Li, Y., Zhou, J., et al. (2015). The effect of HMGB1 on sub-toxic chlorpyrifos exposure-induced neuroinflammation in amygdala of neonatal rats. *Toxicology* 338, 95–103. doi: 10.1016/j.tox.2015.10.010
- Utech, M., Mennigen, R., and Bruewer, M. (2009). Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *BioMed. Res. Int.* 2010:484987.
- Uzawa, A., Mori, M., Taniguchi, J., Masuda, S., Muto, M., and Kuwabara, S. (2013). Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates experimental

- autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* 172, 37–43. doi: 10.1111/cei.12036
- Vacas, S., Degos, V., Tracey, K. J., and Maze, M. (2014). High-mobility group box 1 protein initiates postoperative cognitive decline by engaging bone marrow-derived macrophages. *Anesthesiology* 120, 1160–1167. doi: 10.1097/ALN.0000000000000045
- Venereau, E., De Leo, F., Mezzapelle, R., Careccia, G., Musco, G., and Bianchi, M. E. (2016). HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol. Res.* 111, 534–544. doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.031
- Vezzani, A. (2015). Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? *Exp. Opin. Drug Saf.* 14, 583–592. doi: 10.1517/14740338.2015.1010508
- Vezzani, A., Auvin, S., Ravizza, T., and Aronica, E. (2012). “Glia-neuronal interactions in ictogenesis and epileptogenesis: role of inflammatory mediators,” in *SourceJasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]*, 4th Edn, eds J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen, and A. V. Delgado-Escueta (Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information).
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., and Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 31–40. doi: 10.1038/nrneuro.2010.178
- Vezzani, A., and Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, 1724–1743. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M., Bartfai, T., et al. (2003). Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* 23, 8692–8700. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003
- Vos, P., Jacobs, B., Andriessen, T., Lamers, K., Borm, G., Beems, T., et al. (2010). GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury An observational cohort study. *Neurology* 75, 1786–1793. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181fd62d2
- Walker, L., Tse, K., Ricci, E., Thippeswamy, T., Sills, G. J., White, S. H., et al. (2014). High mobility group box 1 in the inflammatory pathogenesis of epilepsy: profiling circulating levels after experimental and clinical seizures. *Lancet* 383:S105. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60368-8
- Walker, L. E., Frigerio, F., Ravizza, T., Ricci, E., Tse, K., Jenkins, R. E., et al. (2017). Molecular isoforms of high-mobility group box 1 are mechanistic biomarkers for epilepsy. *J. Clin. Invest.* 127, 2118–2132. doi: 10.1172/JCI92001
- Wan, W., Cao, L., Khanabdali, R., Kalionis, B., Tai, X., and Xia, S. (2016). The emerging role of HMGB1 in neuropathic pain: a potential therapeutic target for neuroinflammation. *J. Immunol. Res.* 2016, 1–9. doi: 10.1155/2016/6430423
- Wang, D., Liu, K., Wake, H., Teshigawara, K., Mori, S., and Nishibori, M. (2017). Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody inhibits hemorrhage-induced brain injury and improved neurological deficits in rats. *Sci. Rep.* 7:46243. doi: 10.1038/srep46243
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., et al. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248–251. doi: 10.1126/science.285.5425.248
- Wang, J., Hu, X., Xie, J., Xu, W., and Jiang, H. (2015). Beta-1-adrenergic receptors mediate Nrf2-HO-1-HMGB1 axis regulation to attenuate hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes injury in vitro. *Cell Physiol. Biochem.* 35, 767–777. doi: 10.1159/000369736
- Wang, K. Y., Yu, G. F., Zhang, Z. Y., Huang, Q., and Dong, X. Q. (2012). Plasma high-mobility group box 1 levels and prediction of outcome in patients with traumatic brain injury. *Clin. Chim. Acta* 413, 1737–1741. doi: 10.1016/j.cca.2012.07.002
- Weber, M. D., Frank, M. G., Tracey, K. J., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2015). Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. *J. Neurosci.* 35, 316–324. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3561-14.2015
- Webster, K. M., Sun, M., Crack, P., O’Brien, T. J., Shultz, S. R., and Semple, B. D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *J. Neuroinflamm.* 14:10. doi: 10.1186/s12974-016-0786-1
- Weeber, E. J., and Sweatt, J. D. (2002). Molecular neurobiology of human cognition. *Neuron* 33, 845–848. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00634-7
- Xiangjin, G., Jin, X., Banyou, M., Gong, C., Peiyuan, G., Dong, W., et al. (2014). Effect of glycyrrhizin on traumatic brain injury in rats and its mechanism. *Chin. J. Traumatol* 17, 1–7.
- Xie, Y., Yu, N., Chen, Y., Zhang, K., Ma, H. Y., and Di, Q. (2017). HMGB1 regulates P-glycoprotein expression in status epilepticus rat brains via the RAGE/NF- κ B signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 16, 1691–1700. doi: 10.3892/mmr.2017.6772
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H. S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., et al. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11942–11947. doi: 10.1073/pnas.1003893107
- Yang, H., and Tracey, K. J. (2010). Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 149–156. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.11.019
- Yang, H., Wang, H., Czura, C. J., and Tracey, K. J. (2005). The cytokine activity of HMGB1. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1–8. doi: 10.1189/jlb.1104648
- Yang, L., Wang, F., Yang, L., Yuan, Y., Chen, Y., Zhang, G., et al. (2018). HMGB1 a-box reverses brain edema and deterioration of neurological function in a traumatic brain injury mouse model. *Cell. Physiol. Biochem.* 46, 2532–2542. doi: 10.1159/000489659
- Yang, Q.-W., Lu, F.-L., Zhou, Y., Wang, L., Zhong, Q., Lin, S., et al. (2011). HMGB1 mediates ischemia–Reperfusion injury by TRIF-adaptor independent toll-like receptor 4 signaling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 593–605. doi: 10.1038/jcbfm.2010.129
- Yang, W., Li, J., Shang, Y., Zhao, L., Wang, M., Shi, J., et al. (2017). HMGB1-TLR4 axis plays a regulatory role in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy in immature rat model and children via the p38MAPK signaling pathway. *Neurochem. Res.* 42, 1179–1190. doi: 10.1007/s11064-016-2153-0
- Yin, H., Huang, L., Ouyang, T., and Chen, L. (2018). Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* 55, 55–62. doi: 10.1016/j.intimp.2017.12.002
- Youn, J. H., Oh, Y. J., Kim, E. S., Choi, J. E., and Shin, J. S. (2008). High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J. Immunol.* 180, 5067–5074. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.5067
- Zaben, M., Haan, N., Asharouf, F., Di Pietro, V., Khan, D., Ahmed, A., et al. (2017). Role of proinflammatory cytokines in the inhibition of hippocampal neurogenesis in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 389:S105. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30501-9
- Zhang, J., Takahashi, H. K., Liu, K., Wake, H., Liu, R., Maruo, T., et al. (2011). Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* 42, 1420–1428. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.598334
- Zhao, J., Wang, Y., Xu, C., Liu, K., Wang, Y., Chen, L., et al. (2017). Therapeutic potential of an anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody in epilepsy. *Brain Behav. Immun.* 64, 308–319. doi: 10.1016/j.bbi.2017.02.002
- Zhou, Y., Xiong, K.-L., Lin, S., Zhong, Q., Lu, F.-L., Liang, H., et al. (2010). Elevation of high-mobility group protein box-1 in serum correlates with severity of acute intracerebral hemorrhage. *Mediat. Inflamm.* 2010:142458. doi: 10.1155/2010/142458
- Zou, J. Y., and Crews, F. T. (2014). Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One* 9:e87915. doi: 10.1371/journal.pone.0087915

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Paudel, Shaikh, Chakraborti, Kumari, Aledo-Serrano, Aleksovska, Alvim and Othman. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.