

Astrócitos nas epilepsias: novas perspectivas para diagnóstico e tratamento da zona epileptogênica

Astrocytes in epilepsy: new perspectives for diagnosis and treatment of the epileptogenic zone

Astrocitos en epilepsia: nuevas perspectivas para el diagnóstico y tratamiento de la zona epileptogénica

Bianca Cruz Pachane¹, Marta Corrado²,
José Eduardo Peixoto-Santos³

1. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

2. Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

Resumo

Introdução. No mundo, estima-se que mais de 70 milhões de pessoas apresentem algum tipo de epilepsia, sendo a maioria destes casos residentes de países não desenvolvidos, e até um terço possuem mal controle das crises com as medicações existentes no mercado. **Objetivo.** Nesta breve revisão, exploraremos em maiores detalhes dois tópicos onde a importância das células da glia são marginalmente explorados: na detecção de patologias relacionadas à epilepsia através das vesículas extracelulares (VE) e no tratamento através da dieta cetogênica. **Método.** Foram selecionados, após buscas nas bases de dados MEDLINE e Scielo, artigos que investigaram o papel das células da glia na geração de vesículas extracelulares e na dieta cetogênica. **Resultados.** As vesículas extracelulares já se mostram cruciais para a identificação especialmente de gliomas, porém estudos demonstram que vesículas provenientes de astrócitos são encontradas no sangue de pacientes com epilepsia do lobo temporal, provando assim sua utilidade para várias patologias observadas nas epilepsias. Já no tratamento, os astrócitos são foco secundário apenas de medicamentos bloqueadores de transportadores de GABA, e nas dietas cetogênicas. Dentre os vários mecanismos propostos para os efeitos desta dieta, como alterações na distribuição celular de ATP, aumento da produção de GABA, e no sistema purinérgico via liberação de ATP pelas astrócitos e sua conversão em adenosina. **Conclusões.** Muitas evidências demonstram o impacto das células da glia no diagnóstico e tratamento das epilepsias.

Unitermos. glias, astrócitos, dieta cetogênica, vesículas extracelulares, epilepsia

Abstract

Introduction. Worldwide, it is estimated that more than 70 million people have some type of epilepsy, with most of these cases residing in undeveloped countries, and up to a third have poor crisis control with the medications available on the market. **Objective.** In this brief review, we will explore in greater detail two topics where the importance of glial cells is marginally explored: in the detection of pathologies related to epilepsy through extracellular vesicles (LV) and in treatment through the ketogenic diet. **Method.** After searching the MEDLINE and Scielo databases, articles that investigated the role of glial cells in the generation of extracellular vesicles and in the ketogenic diet were selected. **Results.** Extracellular vesicles are already crucial for the identification of gliomas, but studies show that vesicles from astrocytes are found in the blood of patients with temporal lobe epilepsy, thus proving their usefulness for various pathologies observed in epilepsies. In the treatment, astrocytes are a secondary focus only for drugs that block GABA transporters, and in ketogenic diets. Among the various mechanisms proposed for the effects of this diet, such as changes in the cellular distribution of ATP, increased production of GABA, and in the purinergic system via ATP release by astrocytes and its conversion into adenosine. **Conclusions.** Much evidence demonstrates the impact of glial cells on the diagnosis and treatment of epilepsies.

Keywords. glia, astrocytes, ketogenic diet, extracellular vesicles, epilepsy

Resumen

Introducción. A nivel mundial, se estima que más de 70 millones de personas padecen algún tipo de epilepsia, la mayoría de estos casos residen en países subdesarrollados, y hasta un tercio tiene un mal control de crisis con los medicamentos disponibles en el mercado.

Objetivo. En esta breve revisión exploraremos con mayor detalle dos temas donde se explora marginalmente la importancia de las células gliales: en la detección de patologías relacionadas con la epilepsia por vesículas extracelulares (VI) y en el tratamiento a través de la dieta cetogénica.

Método. Después de buscar en las bases de datos MEDLINE y Scielo, se seleccionaron artículos que investigaban el papel de las células gliales en la generación de vesículas extracelulares y en la dieta cetogénica. **Resultados.** Las vesículas extracelulares ya son cruciales para la identificación de gliomas, pero los estudios muestran que las vesículas de astrocitos se encuentran en la sangre de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, lo que demuestra su utilidad para diversas patologías observadas en las epilepsias. En el tratamiento, los astrocitos son un foco secundario solo para los medicamentos que bloquean los transportadores de GABA y en las dietas cetogénicas. Entre los diversos mecanismos propuestos para los efectos de esta dieta, como cambios en la distribución celular de ATP, aumento de producción de GABA, y en el sistema purinérgico vía liberación de ATP por astrocitos y su conversión en adenosina. **Conclusiones.** Mucha evidencia demuestra el impacto de las células gliales en el diagnóstico y tratamiento de las epilepsias.

Palabras clave. glía, astrocitos, dieta cetogénica, vesículas extracelulares, epilepsia

Trabalho desenvolvido para o curso "Neurociência em Pauta" ("Neuroscience at hand"), ministrado pelo Programa de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências da Escola Paulista de Medicina, Unifesp, São Paulo-SP, Brasil.

Conflito de interesse: não

Recebido em: 04/05/2021

Aceito em: 04/05/2021

Endereço de correspondência: Bianca Pachane, email: biancapachane@gmail.com. Marta Corrado, email: marta.corrado5@gmail.com

INTRODUÇÃO

Glias e as epilepsia

As epilepsias são um conjunto de condições caracterizadas pela ocorrência de crises espontâneas, recorrentes, e autolimitadas¹. Estas crises podem originar-se de regiões específicas e, a partir delas espalharem-se por regiões conectadas de maneira gradual, caracterizando as epilepsias focais, ou podem espalhar-se rapidamente por várias regiões, sendo assim consideradas epilepsias generalizadas². Adicionalmente, as crises podem, em alguns casos, serem provocadas por estímulos variados, como sons ou luzes¹. No mundo, estima-se que mais de 70 milhões de

pessoas apresentem algum tipo de epilepsia, sendo a maioria destes casos residentes de países não desenvolvidos, e até um terço dos indivíduos com epilepsia possuem mal controle das crises com as medicações existentes no mercado³.

Várias alterações estruturais, celulares, e moleculares contribuem para a ocorrência das crises recorrentes nos pacientes. Enquanto mutações em canais iônicos de sódio estão ligadas à epilepsias generalizadas⁴, a zona epileptogênica de pacientes com epilepsias focais fármaco-resistentes frequentemente apresenta alterações patológicas que variam de malformações corticais até injúrias adquiridas por trauma⁵. Nestas epilepsias focais, além de alterações na população neuronal, como presença de neurônios com morfologia anormal nos gangliogliomas e nas displasias tipo II, perda neuronal diferencial nas escleroses hipocampais, ou alterações na estrutura cortical nas malformações e displasias, várias alterações ocorrem nas células da glia. De fato, a gliose, caracterizada por hipertrofia e hiperplasia de astrócitos e, em menor intensidade, na ativação das micróglias, é um achado muito frequente na zona de início ictal^{5,6}. Além da reação astroglial, tumores compostos por astrócitos e oligodendrócitos neoplásticos, como os astrocitomas e oligodendrogliomas, estão entre os subtipos tumorais mais comuns entre as epilepsias fármaco-resistentes⁵.

A ativação destas células pode afetar vários processos importantes para a homeostase tecidual. Por exemplo, os processos inflamatórios interrompem as funções

astrocitárias, como a captação de neurotransmissores e a homeostase de íons, causando consequentemente danos neuronais⁷. A micróglia, que constitui o principal componente do sistema imunológico no cérebro, em condições normais monitora seu ambiente em busca de sinais de dano, através da formação contínua de processos finamente ramificados^{7,8}. Em um estado patológico, a microglia ativada começa a retrair seus processos e se torna um macrófago capaz de fagocitose^{7,8}.

Nesta breve revisão, exploraremos em maiores detalhes dois tópicos onde a importância das células da glia são marginalmente explorados: na detecção de patologias relacionadas à epilepsia através das vesículas extracelulares (VE) e no tratamento através da dieta cetogênica. Discutiremos o potencial das células da glia na geração de VEs, que apenas recentemente começaram a ser estudados como biomarcadores de alterações no sistema nervoso central. Discutiremos as possibilidades de como as VEs gliais pode impactar diretamente o diagnóstico de determinados tumores cerebrais em pacientes com epilepsias. Discutiremos ainda os potenciais das células da glia para o tratamento das epilepsias, focando em medicamentos em teste, bem como em seu potencial efeito sobre a dieta cetogênica.

Astrócitos e diagnóstico das epilepsias: potencial das vesículas extracelulares gliais

As VEs, também denominadas “microvesículas”, “ectosomos” ou “exosomos”, são pequenas estruturas (30-5000nm) sintetizadas pelas células que tem por objetivo primário a comunicação intercelular⁹. Estas carregam proteínas, lípidos e ácidos nucleicos que refletem diretamente sua célula de origem^{9,10}. Seu tamanho as torna capazes de transpor a barreira hemato-encefálica⁹, o que permite que VEs provenientes de células do parênquima nervoso sejam observados no líquor e sangue. VEs podem ser isoladas de forma fácil e rápida, por métodos de ultracentrifugação diferencial, gradientes de densidade, cromatografia por exclusão de tamanho, filtração e citometria de fluxo¹¹. Ainda pouco estudados, as VEs são consideradas novos caminhos na busca por biomarcadores de diversas doenças¹². Além de seu impacto diagnóstico menos invasivo do que biópsias cerebrais, as VEs nos permitem investigar várias alterações dinâmicas que ocorrem nos pacientes com epilepsia e em modelos animais destas, como alterações após crises, mecanismos relacionados à epileptogênese pós insulto, alterações ligadas ao desenvolvimento de fármaco-resistência, dentre outros.

Nas epilepsias, sabe-se que a doença provoca alterações nos níveis de proteínas e micro RNAs (miRs) circulantes nas VEs, secretadas por mecanismos ativos ou passivos após crises convulsivas¹³. Especialmente no caso dos miRs, as VEs contém entre 10 a 15% dos miRs em

circulação sistêmica, o que garante sua maior estabilidade e alcance¹⁴. A importância das VEs com miR gliais foi também demonstrada em pacientes com ELT. Nos casos com esclerose hipocampal, o miR-132 apresentam aumento de 3,4 vezes dos níveis observados no hipocampo de indivíduos saudáveis¹⁵. Este miR, que em situação controle é majoritariamente observado em neurônios, tem aumento de 2x nestes, mas de até 12x em células da glia dos pacientes com esclerose hipocampal, baseado em escores de expressão corrigidos por densidade celular. Dupla marcação confirmou a expressão de miR-132 em micróglias ativadas e astrócitos reativos¹⁵. Infere-se que miR-132 esteja envolvido na fisiopatologia da epilepsia, potencialmente ligado à regulação do metabolismo de glutamato, além de ser observado em epilepsias generalizadas genéticas^{16,17}. Ademais, estudos em cultura de astrócitos fetais humanos demonstraram que o miR-132 afetou a expressão de proteínas da via do TGF-β1, cuja sinalização é uma importante forma de limitação da neuroinflamação tecidual, e favoreceu a expressão de THBS1, MMP-2 e MMP-9, proteínas envolvidas na manutenção e remodelamento da matriz extracelular¹⁵.

A expressão diferencial de proteínas carreadas por VEs em pacientes recém-diagnosticados com epilepsia foi alvo de um estudo recente¹⁸. Nas VEs do sangue 70 proteínas apresentaram redução de expressão e 6 aumento, comparadas com VEs de controles¹⁸. Dentre estas, o aumento no fator de coagulação IX (F9) e a redução na

trombospondina 1 (TSP-1) foram propostas como biomarcadores de epilepsia, pelo menos baseadas em níveis séricos e em dados de dois modelos murinos de epilepsia crônica¹⁸. TSP-1 é uma glicoproteína adesiva secretada por astrócitos que promove crescimento do axônio, migração neuronal e desenvolvimento de sinapses¹⁸, reforçando a importância das células da glia no diagnóstico e alterações patológicas vistas na epilepsia.

As VEs são especialmente promissoras na identificação de gliomas e tumores glioneuronais. Na avaliação dos tumores, por vezes as imagens de RM não são suficientes para definir o tipo de patologia ou, no caso das neoplasias, sua agressividade. Como alternativa recente a biópsias diretas do tecido cerebral, que são invasivas, alguns grupos têm investigado o uso de vesículas extracelulares (VEs) do sistema nervoso através de biópsias líquidas. Enquanto aumento de miR-21, miR210 e redução de miR-29 são propostos como biomarcadores séricos/plasmáticos de gliomas em geral, redução de miR-497 e miR-125b no soro e miR-181 em tecido são indicadores de glioblastomas multiformes, e o aumento nos níveis séricos dos miR-15b-5p, miR-16-5p, miR19a/b-3p, miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-130-3p, miR-181b-5p, e miR-208a-3p indicariam astrocitomas de vários graus⁹. Alguns microRNAs poderiam inclusive ser usados para identificar o grau de tumores. Nos gliomas de alto grau (WHO III-IV), foi observado aumento de miR-15, miR-221, e miR-222⁹. Assim, os miRs existentes nas VEs podem ser cruciais para o diagnóstico e graduação

dos tumores do SNC de forma menos invasiva que as biópsias cerebrais.

As VEs podem ser úteis na detecção de mutações e proteínas associadas à resposta quimioterápica dos tumores, bem como proteínas indicativas de agressividade tumoral. Por exemplo, variantes do receptor de EGF como o EGFRvIII, promovem resistência à apoptose e ao tratamento quimioterápico¹⁹. Outro exemplo é a proteína IDH1, cuja mutação serve para distinguir glioblastomas primários dos secundários, estes últimos com maior expectativa de vida após o diagnóstico²⁰. Mutações nesta proteína foram fortemente ligados à ocorrência de crises em pacientes com glioma, pois o IDH1 mutado produz altos níveis de 2-hidroxiglutarato, um análogo do glutamato²¹. Tanto o EGFRvIII como o IDH1 foram detectados em VEs séricos de pacientes com gliomas, entretanto o primeiro apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia superiores ao IDH1^{22,23}. Outro estudo reforçou a menor sensibilidade de IDH1 circulante, identificando IDH1 mutado, na forma de DNA circulante livre, apenas no líquor de pacientes com glioblastoma²⁴. Apesar da maioria dos dados focarem em tumores agressivos, que são os menos frequentes tipos de tumores encontrados em casos de epilepsias fármaco-resistentes, é importante lembrar que estes dados servem também para o monitoramento de tumores em regiões eloquentes/não operáveis ou com ressecção parcial, visto que tumores de baixo grau, como os gangliogliomas, podem sofrer transformação em glioblastomas²⁵.

Astrócitos no tratamento das epilepsias: dieta cetogênica

No tratamento das epilepsias, a maioria dos fármacos apresenta mecanismos de ação direto nos neurônios, como bloqueio de receptores AMPA e NMDA, modulação e ativação de receptores ou bloqueio de transportadores GABAérgicos²⁶. Dentre todos estes efeitos, o bloqueio de transportadores de GABA é o único efeito dos principais medicamentos anti-crise sobre os astrócitos²⁶. Nos casos fármaco-resistentes, a remoção cirúrgica da zona de início ictal é o tratamento para as epilepsias focais. Para as epilepsias generalizadas, quando ocorre falha no controle farmacológico, a dieta cetogênica pode ajudar, se não no controle total, ao menos em reduzir a frequência das crises. De fato, esta dieta foi uma das primeiras indicações para tratamento da epilepsia, sendo reforçada por dados de vários centros²⁷. Para além do controle de crises, estudos indicam que o metabolismo da cetona pode trazer benefícios como melhoria da memória em pacientes com comprometimento cognitivo leve²⁸. Este efeito positivo ocorre pela maior proteção contra insultos neuronais, aumento da eficiência metabólica em relação ao metabolismo da glicose, e atenuação de mecanismos neurodegenerativos envolvendo moléculas pró-inflamatórias^{28,29}. Este efeito neuroprotetor torna a dieta cetogênica importante também para o tratamento de outras patologias do SNC como doença de

Alzheimer, esclerose múltipla, doença de Parkinson, e mesmo tumores³⁰.

A dieta cetogênica, rica em gorduras e pobre em carboidratos (abaixo de 20g/dia) é um modelo bioquímico de jejum que estimula os órgãos a utilizarem os corpos cetônicos como substitutos da glicose na geração de energia³¹. Após dois a três dias de redução drástica de carboidratos, os hepatócitos começam a produzir grande quantidade de corpos cetônicos como acetoacetato e β-hidroxibutirato³². De fato, estes corpos tornam-se apenas significativos como fonte de energia para o SNC quando atingem 4 mmol/L, mais de 10 vezes sua concentração fisiológica em uma alimentação tradicional³². Estes corpos cetônicos são convertidos em acetil-CoA, que então entra no ciclo de Krebs para a produção de energia na mitocôndria³³. No sistema nervoso, as células da glia são cruciais para o metabolismo neuronal. A partir da glicose, os astrócitos produzem lactato e o fornecem como substrato para o metabolismo oxidativo neuronal, especialmente durante a atividade neuronal aumentada³⁴. Além do lactato, pelo menos dois estudos identificaram os astrócitos como fonte de corpos cetônicos de ácidos graxos e leucina^{35,36}. De fato, segundo dados experimentais, a habilidade cetogênica dos astrócitos em cultura é semelhante à dos hepatócitos, que são a principal fonte corporal de corpos cetônicos³⁴. Os astrócitos podem, portanto, ser considerados células versáteis para metabolizar lipídios³⁴, sendo assim

fundamentais para a produção de corpos cetônicos durante a dieta cetogênica.

Nas epilepsias, vários mecanismos foram propostos para os efeitos da dieta cetogênica, como alterações na distribuição celular de ATP, aumento da produção de GABA, e no sistema purinérgico via liberação de ATP pelas glias e sua conversão em adenosina³³. De fato, uma das hipóteses sobre as alterações teciduais relacionadas aos efeitos da dieta cetogênica seria pela produção de adenosina, uma molécula de importante efeito protetor e anticonvulsivante³⁷. A elevada atividade neuronal das crises leva a níveis extracelulares elevados de adenosina, um neuromodulador que consegue inibir a atividade pré e pós-sináptica através do receptor A1 da adenosina (A1R)³⁸. Estudos demonstraram este efeito protetor da adenosina, uma vez que o tratamento com antagonista da A1R agrava as crises e reduz a eficácia dos medicamentos anticrise, contrariamente com o que acontece no administrar um agonista da A1R, que limita crises em vários modelos³⁸. Outra evidência da importância da adenosina para os efeitos da dieta cetogênica é a redução nas crises de animais com sobre-expressão de adenosina quinase, enzima expressa pelos astrócitos que metaboliza a adenosina, diminuindo sua concentração no espaço extracelular^{38,39}. Além da importância das glias para a geração de corpos cetônicos pela dieta cetogênica, um estudo de 2019⁷ demonstrou que a dieta cetogênica influencia a morfologia das células gliais, em particular dos astrócitos e, portanto, pode atuar através de alterações metabólicas e

funcionais nas células da glia para proteger os neurônios, especialmente durante condições patológicas.

CONCLUSÕES

Dados de modelos animais demonstram que as VEs provenientes de astrócitos apresentam um grande potencial não apenas no diagnóstico, mas uma vez validados em estudos humanos, podem servir como biomarcadores de epileptogênese após uma injúria precipitante. Até o momento, não há dados que nos permitam indicar quais pessoas desenvolverão epilepsia após uma injúria. Do mesmo modo, estas células parecem cruciais para a dieta cetogênica, participando não apenas na formação de corpos cetônicos e metabolização dos lipídios, mas também através da produção de adenosina, estimulado por esta dieta. Ademais, estas células são cruciais para a produção de adenosina, um neuromodulador importante para controle da excitabilidade neuronal. Assim, as células da glia, e os astrócitos mais especificamente, apresentam um grande potencial a ser explorado para o diagnóstico e tratamento das epilepsias.

REFERÊNCIAS

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55:475-82. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
2. Guilhoto LMFF. Revisão terminológica e conceitual para organização de crises e epilepsias: relato da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia, 2005-2009. Novos Paradigmas? *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2011;17:100-5. <https://doi.org/10.1590/S1676-26492011000300005>
3. Espinosa-Jovel C, Toledano R, Aledo-Serrano Á, García-Morales I,

- Gil-Nagel A. Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. *Seizure* 2018;56:67-72.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.02.0>
- 4.Kaplan DI, Isom LL, Petrou S. Role of Sodium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a022814.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022814>
- 5.Blümcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, et al. Histopathological findings in brain tissue obtained during epilepsy surgery. *N Engl J Med* 2017;377:1648-56.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703784>
- 6.Leite JP, Peixoto-Santos JE. Glia and extracellular matrix molecules: What are their importance for the electrographic and MRI changes in the epileptogenic zone? *Epilepsy Behav* 2019;121:106542.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106542>
- 7.Gzielo K, Soltys Z, Rajfur Z, Setkowicz ZK. The Impact of the Ketogenic Diet on Glial Cells Morphology. A Quantitative Morphological Analysis. *Neuroscience* 2019;413:239-51.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.009>
- 8.Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 2013;77:10-8.
<http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- 9.Romano E, Netti PA, Torino E. Exosomes in Gliomas: Biogenesis, Isolation, and Preliminary Applications in Nanomedicine. *Pharmaceuticals* 2020;13:319. <http://doi.org/10.3390/ph13100319>
- 10.Gourlay J, Morokoff AP, Luwor RB, Zhu H-J, Kaye AH, Stylli SS. The emergent role of exosomes in glioma. *J Clin Neurosci* 2017;35:13-23.
<http://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.09.021>
- 11.Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7:1535750.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- 12.Figueroa JM, Carter BS. Detection of glioblastoma in biofluids. *J Neurosurg* 2018;129:334-40.
<https://doi.org/10.3171/2017.3.JNS162280>
- 13.Raoof R, Bauer S, El Naggar H, Connolly NMC, Brennan GP, Brindley E, et al. Dual-center, dual-platform microRNA profiling identifies potential plasma biomarkers of adult temporal lobe epilepsy. *EBioMedicine* 2018;38:127-41.
<http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.068>
- 14.Gitaí DLG, dos Santos YDR, Upadhyia R, Kodali M, Madhu LN, Shetty AK. Extracellular Vesicles in the Forebrain Display Reduced miR-346 and miR-331-3p in a Rat Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Neurobiol* 2020;57:1674-87. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01797-1>
- 15.Korotkov A, Broekaart DWM, Banchaewa L, Pustjens B, Scheppingen J, Anink JJ, et al. microRNA-132 is overexpressed in glia in temporal lobe epilepsy and reduces the expression of pro-

- epileptogenic factors in human cultured astrocytes. *Glia* 2020;68:60-75. <http://doi.org/10.1002/glia.23700>
16. Wei N, Zhang H, Wang J, Wang S, Lv W, Luo L, et al. The Progress in Diagnosis and Treatment of Exosomes and MicroRNAs on Epileptic Comorbidity Depression. *Front Psychiatry* 2020;11:1-8. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00405>
17. Martins-Ferreira R, Chaves J, Carvalho C, Bettencourt A, Chorão R, Freitas J, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for genetic generalized epilepsies: a three microRNA panel. *Eur J Neurol* 2020;27:660-6. <http://doi.org/10.1111/ene.14129>
18. Lin Z, Gu Y, Zhou R, Wang M, Guo Y, Chen Y, et al. Serum Exosomal Proteins F9 and TSP-1 as Potential Diagnostic Biomarkers for Newly Diagnosed Epilepsy. *Front Neurosci* 2020;14:1-12. <http://doi.org/10.3389/fnins.2020.00737>
19. Bălașa A, Șerban G, Chinezu R, Hurghis C, Tămaș F, Manu D. The Involvement of Exosomes in Glioblastoma Development, Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Brain Sci* 2020;10:553. <http://doi.org/10.3390/brainsci10080553>
20. Louis DN, Deimling A von, Cavenee WK (eds). WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Geneva: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2016; 407 p.
21. Chen H, Judkins J, Thomas C, Wu M, Khouri L, Benjamin CG, et al. Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. *Neurology* 2017;88:1805-13. <http://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003911>
22. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10:1470-6. <http://doi.org/10.1038/ncb1800>
23. Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 2012;18:1835-40. <http://doi.org/10.1038/nm.2994>
24. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun* 2015;6:1-6. <http://doi.org/10.1038/ncomms9839>
25. Hayashi Y, Iwato M, Hasegawa M, Tachibana O, Von Deimling A, Yamashita J. Malignant transformation of a gangliocytoma/ganglioglioma into a glioblastoma multiforme: A molecular genetic analysis: Case report. *J Neurosurg* 2001;95:138-42. <http://doi.org/10.3171/jns.2001.95.1.0138>
26. Rogawski MA, Löscher W, Rho JM. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a022780. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a022780>
27. Vining EP, Freeman JM, Ballaban-Gil K, Camfield CS, Camfield PR, Holmes GL, et al. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol* 1998;55:1433-7.

- <http://doi.org/10.1001/archneur.55.11.1433>
- 28.Krikorian R, Shidler MD, Dangelo K, Couch SC, Benoit SC, Clegg DJ. Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. Neurobiol Aging 2012;33:425.e19-27.
- <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.006>
- 29.Forsythe CE, Phinney SD, Fernandez ML, Quann EE, Wood RJ, Bibus DM, et al. Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation. Lipids 2008;43:65-77. <http://doi.org/10.1007/s11745-007-3132-7>
- 30.Masino SA, Rho JM. Metabolism and epilepsy: Ketogenic diets as a homeostatic link. Brain Res 2019;1703:26-30. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.05.049>
- 31.McNally MA, Hartman AL. Ketone bodies in epilepsy. J Neurochem 2012;121:28-35. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07670.x>
- 32.Włodarek D. Role of Ketogenic Diets in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). Nutrients 2019;11:169. <http://doi.org/10.3390/nu11010169>
- 33.Liśkiewicz A, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J. Characteristics of ketogenic diet and its therapeutic properties in central nervous system disorders. Ann Acad Medicae Silesiensis 2012;66:66-7. <https://annales.sum.edu.pl/Characteristics-of-ketogenic-diet-and-its-therapeutic-properties-in-central-nervous,131416,0,2.html>
- 34.Guzmán M, Blázquez C. Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? Trends Endocrinol Metab 2001;12:169-73. [http://doi.org/10.1016/s1043-2760\(00\)00370-2](http://doi.org/10.1016/s1043-2760(00)00370-2)
- 35.Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, Edmond J. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. J Neurochem 1991;56:1376-86. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb11435.x>
- 36.Bixel MG, Hamprecht B. Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells. J Neurochem 1995;65:2450-61. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65062450.x>
- 37.Masino SA, Geiger JD. Are purines mediators of the anticonvulsant/neuroprotective effects of ketogenic diets? Trends Neurosci 2008;31:273-8. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.009>
- 38.Masino SA, Kawamura M, Ruskin DN. Adenosine receptors and epilepsy: current evidence and future potential. Int Rev Neurobiol 2014;119:233-55. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00011-8>
- 39.Ruskin DN, Kawamura M, Masino SA. Adenosine and Ketogenic Treatments. J Caffeine Adenosine Res 2020;10:104-9. <http://doi.org/10.1089/caff.2020.0011>