



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXIII

Tesi di Dottorato di Ricerca

ICTOGENESI ED EPILETTOGENESI IN UN MODELLO DI EPILESSIA DEL
LOBO TEMPORALE

Dottorando: Dott. Giovanni Carriero

Matricola: R07939

Tutor: Prof. Marco de Curtis
Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta
Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2009-2010

INDICE:

1. INTRODUZIONE

1.1 Breve storia dell'epilessia

1.2 Epidemiologia

1.3 Classificazione

1.4 Epilessia ed epilettogenesi

1.5 Epilessia del lobo temporale

1.6 Chirurgia dell'epilessia

1.7 Le registrazioni intracraniche e l'ictogenesi

1.8 Modelli animali di ictogenesi

1.8.1 Il cervello isolato di cavia come modello di ictogenesi

1.9 Modelli animali di epilessia del lobo temporale

2. SCOPO DEL LAVORO

3. MATERIALI E METODI

3.1 Il cervello isolato di cavia in vitro

3.2 Registrazioni elettrofisiologiche in vitro

3.3 Valutazione della posizione e della dose di KA da iniettare in vivo

3.4 Risonanza magnetica

3.5 Impianto elettrodi e cannula di somministrazione

3.6 Iniezione intraippocampale

3.7 Video-EEG monitoring

3.8 Monitoraggio dell'animale in fase acuta e cronica

3.9 Preparazione dei tessuti per l'analisi morfologica

3.9.1 Controcolorazione con Tionina

3.9.2 Immunoistochimica

3.9.3 Colorazione TIMM

4. RISULTATI

4.1 Modello di ictogenesi acuta sul cervello isolato di cavia in vitro

4.1.1 Attività epilettiforme indotta dalla somministrazione acuta di 4 aminopiridina

4.1.2 Caratteristiche farmacologiche dell'attività epilettiforme acuta indotta dalla 4AP

4.2 Modello cronico di epilessia del lobo temporale

4.2.1 Localizzazione del punto di iniezione intra-ippocampale dell'acido cainico

4.2.2 Valutazione dose-risposta nella somministrazione di acido kainico

4.2.3 Risonanza magnetica ed immunoistochimica

4.2.4 Registrazione video-EEG durante l'iniezione intraippocampale di AK nell'animale

libero di muoversi

4.2.5 Video-EEG nella fase cronica

5. DISCUSSIONE

Bibliografia.

1. INTRODUZIONE

1.1 Breve storia dell'epilessia

Così dice colui che ode le parole di Dio, che vede la visione dell'Onnipotente, che cade a terra, e a cui gli occhi sono aperti. (*La sacra Bibbia (Numeri 24,4) tradotta da Giovanni Diodati, lucchese (1576-1649), Libreria Sacre Scritture, Roma, 1950*)

Etimologicamente il termine **epilessia** deriva dal verbo greco ἐπιλαμβάνειν (epilambano) che significa “essere colti di sorpresa”. Tale definizione sintetizza perfettamente i caratteri fondamentali della crisi epilettica, che si manifesta all'improvviso, cessa spontaneamente e tende solitamente a ripetersi, senza che colui il quale ne è affetto, possa opporvisi. Proprio per queste sue caratteristiche di imprevedibilità ed inspiegabilità l'epilessia anticamente veniva definita **morbo sacro**, ed era ritenuta essere causata dall'azione di forze maligne della natura o da divinità avverse. Anche le cure utilizzate per trattare i fenomeni epilettici erano quindi legate alla sfera divina o trascendente. Tra i più antichi rituali di guarigione utilizzati in Grecia va ricordata la “pratica dell'incubazione” in cui l'individuo affetto da epilessia veniva fatto dormire sopra una lastra di pietra nel tempio d'Esculapio, il dio dell'arte medica. Di fondamentale importanza era considerata l'influenza della luna piena sulla ricorrenza degli attacchi epilettici. Ulteriori trattamenti prevedevano l'utilizzo dei semi e delle radici della peonia, della polvere delle ossa di cranio e del sangue umano. Plinio il Vecchio nei suoi scritti ha riportato l'usanza di cospargere di sangue umano la bocca di un epilettico o di fargli succhiare il sangue che usciva dalla bocca di un gladiatore morente per trarne risultati terapeutici. Ippocrate di Kos, con il suo trattato sull'epilessia dal titolo “De Morbo Sacro”, fu il primo grande autore del passato a rifiutare il carattere soprannaturale dell'epilessia. Egli sottolinea come l'epilessia abbia origini di tipo ereditario ed embriologico, connesse con una malformazione del cervello, indicando, per la prima volta, il sistema nervoso come sede di tale malattia e di tutte le malattie mentali. Gli studi e le osservazioni sull'epilessia subirono un lungo periodo di stasi, per poi riabbracciare le tesi demoniaco - trascendentali durante tutto il Medio Evo, riportando di fatto la medicina in epoca pre-ippocratica. In questo periodo gli epilettici erano considerati “posseduti dal demonio” e contagiosi per i propri simili e questo fece sì che si diffondessero ovunque pratiche d'esorcismo molto violente (che spesso provocavano la morte dell'ammalato) e che il fanatismo religioso condizionasse completamente il trattamento di questi particolari pazienti. Non era

infrequente inoltre che donne epilettiche rimaste incinte venissero sepolte vive con la propria prole, e che gli uomini fossero castrati. Con queste credenze e “approcci terapeutici” si giunse al XIX secolo, quando Bravais prima e in seguito Jackson gettarono le basi per la moderna concezione dell'epilessia. Quest'ultimo in particolare nel 1861 intuì, grazie ad un'attenta osservazione clinica che la crisi epilettica dipende da “una scarica occasionale, improvvisa, eccessiva e rapida, localizzata nelle cellule nervose della materia grigia”. Bisognò, comunque, aspettare gli inizi del novecento per assistere all'introduzione di nuovi approcci terapeutici basati sulle teorie di Jackson. Difatti nel 1912 Hauptmann introdusse il fenobarbitale, un composto con un'attività anticonvulsivante intensa e poco tossico. Nei primi decenni del XX secolo anche le indagini diagnostiche compirono un eccezionale passo in avanti, difatti si deve al tedesco Berger la prima registrazione nel 1921 dell'attività elettrica celebrale nell'uomo. Ad oggi le tecniche diagnostiche e gli approcci terapeutici si sono enormemente raffinati, giungendo ad importanti risultati sia nella valutazione della causa responsabile di una particolare epilessia, sia sul controllo delle crisi epilettiche. Rimangono, comunque, aperti diversi interrogativi alla base della fisiopatologia delle crisi epilettiche sia dal punto di vista cellulare che di circuito.

1.2 Epidemiologia

L'epilessia, definita come una condizione caratterizzata da ricorrenti crisi epilettiche (due o più) non provocate da una causa immediatamente identificabile (Hauser and Kurland, 1975; ILAE, 1993), è fra le malattie neurologiche più frequenti. Secondo l'organizzazione mondiale della sanità, circa 43 milioni di persone al mondo ne sono affette e sebbene sia presente in tutti i paesi, l'85% dei pazienti epilettici vive nei paesi a basso e medio reddito. Infatti, l'incidenza media, 20-70 individui su 100.000 abitanti che si riscontra nei paesi industriali cresce a 100-190 pazienti con epilessia su 100.000 abitanti nei paesi in via di sviluppo (Fig.1). Questa forte differenza potrebbe anche essere

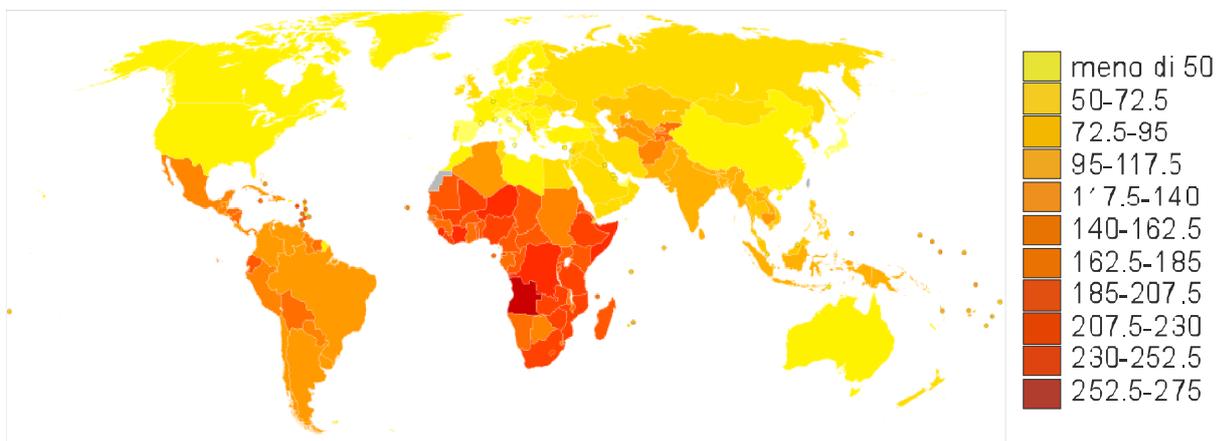


Fig.1 Rappresentazione dell'incidenza dell'epilessia (numero di casi ogni 100000 abitanti) nei diversi paesi del mondo

dovuta ad una minore accuratezza diagnostica. Un'ulteriore differenza tra i paesi industrializzati e quelli in via di sviluppo si riscontra nell'età di insorgenza dell'epilessia. Mentre nei primi l'età di esordio segue un tipico andamento a U, dove il picco di insorgenza si riscontra nella prima decade di vita o nei soggetti con età superiore ai 70 anni, nei paesi in via di sviluppo si evidenzia un singolo picco nei soggetti di età compresa tra i 20 e i 30 anni (Fig.2). Nella maggior parte dei casi (più del 70%), il pieno controllo degli attacchi epilettici è ottenibile con adeguati trattamenti

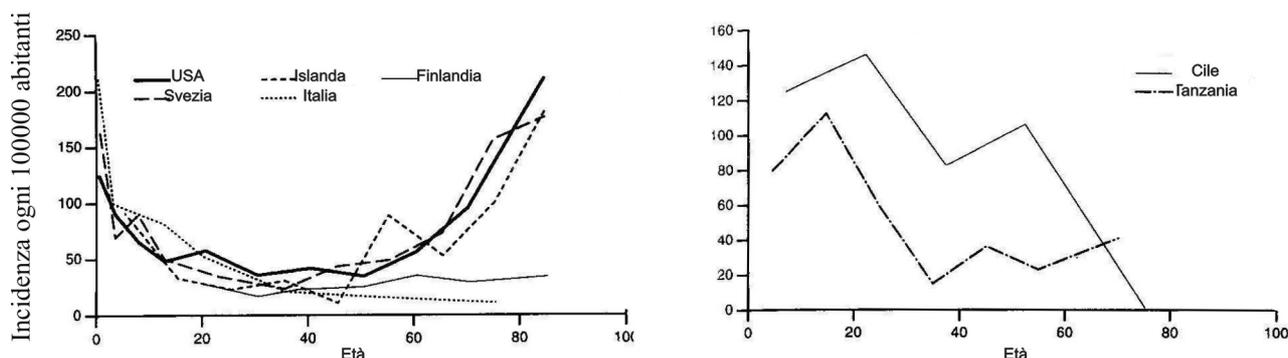


Fig.2 Incidenza dell'epilessia in base all'età nei paesi industrializzati (grafico a sinistra) e nei paesi in via di sviluppo (grafico a destra).

farmacologici (Sander JW 2003). Le principali cause di morte nei pazienti epilettici sono dovute ad uno stato di male epilettico prolungato (crisi ripetute subentranti senza recupero intercritico), suicidio associato a depressione, traumi in seguito alla perdita del controllo corporeo durante una crisi e la morte improvvisa e inaspettata in epilessia (SUDEP). Quindi, il mancato controllo farmacologico o l'implicazione di disfunzioni neurologiche rappresentano i veri fattori di rischio di morte nei pazienti con epilessia.

1.3 Classificazione

La prima efficace classificazione dei disturbi epilettici fu proposta dal francese Gastaut nel 1970. In seguito, tale classificazione fu rivista e aggiornata dalla *Commissione sulla Classificazione e la Terminologia della Lega Internazionale Contro l'Epilessia* (ILAE: International League Against Epilepsy) nel 1981. Questa classificazione basata principalmente sulle caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche suddivide le crisi epilettiche in tre principali categorie: parziali, generalizzate e crisi non classificabili. Vengono definite crisi parziali quelle crisi che originano da una precisa e limitata area cerebrale e che inducono una fenomenologia coerente con le funzioni specifiche delle aree corticali interessate. In alcuni casi il focus epilettico può essere più di uno,

coinvolgendo differenti circuiti cerebrali che danno origine a caratteristiche cliniche più complesse. Le crisi generalizzate, invece, hanno origine da entrambi gli emisferi coinvolgendo fin dall'esordio ampie aree corticali. Dato che alcuni pazienti presentano più di una tipologia di crisi e poiché spesso queste si presentano contemporaneamente o in sequenza è stato necessario implementare la classificazione proposta dall'ILAE, che nel 1989 ha pubblicato la nuova "Classificazione delle Epilessie e delle Sindromi Epiletiche" (Tab.1). L'epilessia, quindi, è definita come una patologia sindromica e come tale caratterizzata da un insieme di segni e sintomi che identificano e definiscono un particolare disordine clinico. Con questa nuova classificazione le epilessie e le sindromi correlate sono suddivise in quattro principali categorie: i) epilessie e sindromi localizzate, ii) epilessie e sindromi generalizzate, iii) epilessie e sindromi con sito di origine non determinabile, iv) sindromi specifiche. I primi due gruppi a loro volta sono stati suddivisi in sottocategorie in base al grado di conoscenza dell'eziologia della sindrome epiletica stessa. Sono stati, quindi, introdotti i concetti di *idiopatico*, *sintomatico* e *criptogenico*. Con il termine idiopatico si indica che la sindrome epiletica non è stata associata da altra patologia che ne può essere la causa: non ci sono altre cause se non un'alterazione genetica ereditata o acquisita. Le epilessie idiopatiche sono definite in base all'età di esordio, da caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche. Le *epilessie sintomatiche* sono condizioni neuropatologiche in cui la causa è stata identificata in un'alterazione nota o sospetta del sistema nervoso centrale (SNC). Il termine criptogenico indica che la causa della patologia è nascosta o occulta. Si presume che le epilessie criptogeniche siano epilessie sintomatiche di cui non si conosce l'eziologia, spesso con un esordio età dipendente ma con un quadro elettroclinico non ben definito. Successivamente, un'ulteriore linea guida è stata pubblicata dall'ILAE nel 2006 dove sono state introdotte novità e specifiche soprattutto per quanto riguarda le crisi focali e le epilessie con esordio legato all'età (www.ilae-epilepsy.org).

<p>1. Localization-related (focal, local, partial) epilepsies and syndromes</p> <p>1.1 Idiopathic (with age-related onset) At present, the following syndromes are established, but more may be identified in the future: -Benign childhood epilepsy with centro-temporal spike -Childhood epilepsy with occipital paroxysms -Primary reading epilepsy</p> <p>1.2 Symptomatic (Appendix I) -Chronic progressive epilepsy partialis continua of childhood (Kojewnikow's syndrome) -Syndromes characterized by seizures with specific modes of precipitation (see Appendix 11)</p> <p>1.3 Cryptogenic -Cryptogenic epilepsies are presumed to be symptomatic and the etiology is unknown. This category thus differs from the previous one by the lack of etiologic evidence (See Definitions).</p>	<p>-Other generalized idiopathic epilepsies not defined above -Epilepsies with seizures precipitated by specific modes of activation (see Appendix 11)</p> <p>2.2 Cryptogenic or symptomatic (in order of Age) -West syndrome (infantile spasms, Blitz-Nick-Salaam Krjdmpe) -Lennox-Gastaut syndrome -Epilepsy with myoclonic-astatic seizures -Epilepsy with myoclonic absences</p> <p>2.3 Symptomatic 2.3.1 Non-specific etiology -Early myoclonic encephalopathy -Early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst -Other symptomatic generalized epilepsies not defined above 2.3.2 Specific syndromes -Epileptic seizures may complicate many disease states. Under this heading are included diseases in which seizures are a presenting or predominant feature</p>	<p>3.2 Without unequivocal generalized or focal features. All cases with generalized tonic-clonic seizures in which clinical and EEG findings do not permit classification as clearly generalized or localization related, such as in many cases of sleepgrand mal (GTCS) are considered not to have unequivocal generalized or focal features.</p> <p>4. Special syndromes 4.1 Situation-related seizures (Gelegenheitsan-Falle) -Febrile convulsions -Isolated seizures or isolated status epilepticus -Seizures occurring only when there is an acute metabolic or toxic event due to factors such as alcohol, drugs, eclampsia, nonketotic hyperglycemia</p>
<p>2. Generalized epilepsies and syndromes</p> <p>2.1 Idiopathic (with age-related onset-listed in order of age) -Benign neonatal familial convulsions -Benign neonatal convulsions -Benign myoclonic epilepsy in infancy -Childhood absence epilepsy (pyknolepsy) -Juvenile absence epilepsy -Juvenile myoclonic epilepsy (impulsive petit mal) -Epilepsy with grand mal (GTCS) seizures on awakening</p>	<p>3. Epilepsies and syndromes undetermined whether focal or generalized 3.1 With both generalized and focal seizures -Neonatal seizures -Severe myoclonic epilepsy in infancy -Epilepsy with continuous spike-waves during slow wave sleep -Acquired epileptic aphasia (Landau-Kleffner-syndrome) Other undetermined epilepsies not defined above</p>	

Tab.1 Classificazione delle epilessie e delle sindromi epilettiche (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy Epilepsia 1989;30:389-99).

1.4 Epilessia ed epilettogenesi

L'epilessia è una condizione patologica caratterizzata da crisi che si verificano spontaneamente e che mostrano la tendenza a ripetersi nel tempo. Convulsioni e crisi epilettiche sono fenomeni clinici che derivano da una ipereccitabilità neuronale. In termini fisiologici tali manifestazioni possono essere definite come scariche improvvise, eccessive e rapide nella sostanza grigia corticale. Infatti, le crisi epilettiche originano sempre dalla corteccia cerebrale e sono determinate dalla scarica sincrona di una popolazione neuronale ipereccitabile. Le manifestazioni epilettiche presumono perciò l'esistenza di anomalie costitutive o acquisite dell'eccitabilità neuronale. L'ipereccitabilità neuronale dipende da alterazioni degli scambi ionici transmembranari. In genere si pensa che uno dei più frequenti meccanismi dell'epilessia sia lo sbilanciamento tra azione inibitoria (mediata prevalentemente dal GABA) ed azione eccitatoria (mediata da neurotrasmettitori come il glutammato). Questa alterazione del bilancio della trasmissione sinaptica può indurre uno stato di ipereccitabilità neuronale ed in fine scariche epilettiche. L'insieme dei meccanismi che agiscono nel SNC e che portano allo squilibrio tra componente inibitoria ed eccitatoria e quindi ad epilessia

vengono definiti con il termine di meccanismi di *epilettogenesi* (Sutula e Pitkanen, 2002). Perché il processo di epilettogenesi abbia inizio è necessario che ci sia un insulto iniziale. Questo sarà, probabilmente, il fattore causativo della prima crisi epilettica. Dopo la manifestazione del primo evento critico si avrà un periodo silente (*periodo latente*), durante il quale il processo dell'epilettogenesi indurrà alterazioni progressive che porteranno allo sviluppo conclamato della sindrome epilettica caratterizzato dalla presenza di crisi epilettiche spontanee. L'insulto iniziale può essere di diversa natura: può essere un insulto acquisito esterno, come un trauma cerebrale meccanico o ischemico, un'infezione a carico del SNC. L'insulto può derivare anche da fattori congeniti, come malformazioni corticali, displasie cerebrali o determinati aberranti del background genetico, responsabili per esempio di canalopatie in grado di alterare l'equilibrio cellulare e di sistema (Fig.3).

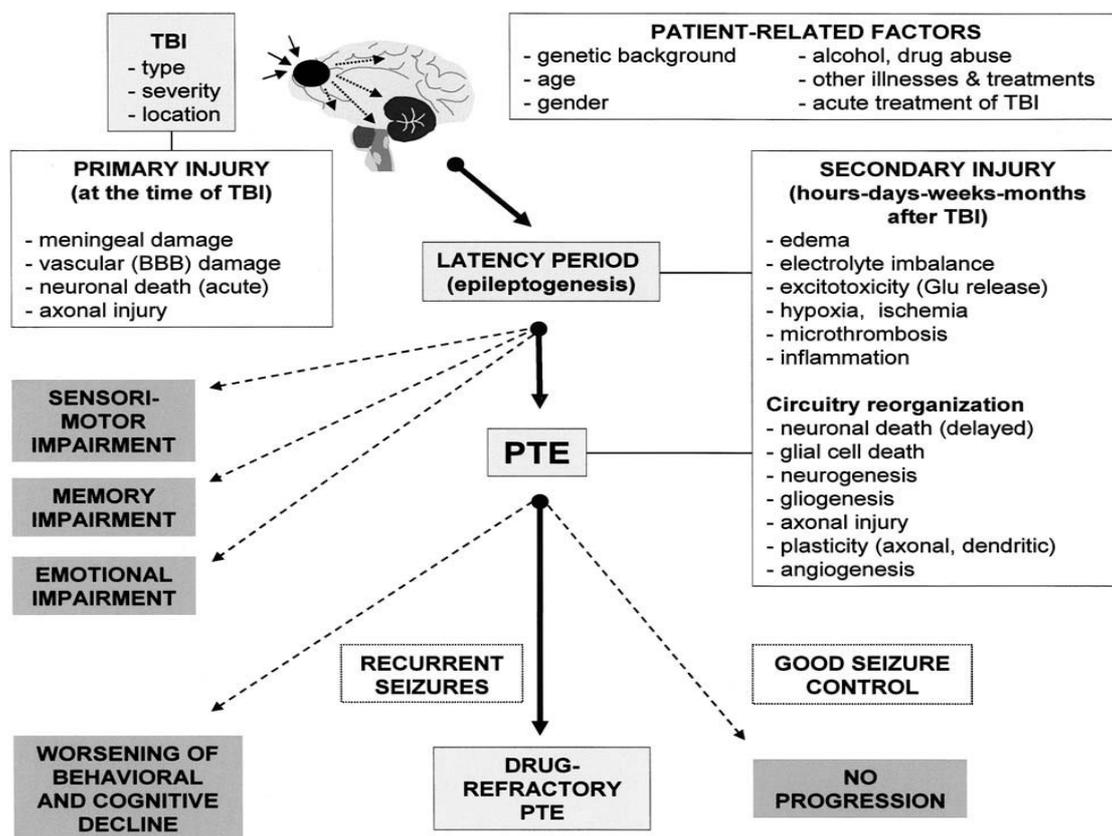


Fig.3 Rappresentazione schematica dei fattori implicati nel processo di epilettogenesi (Pitkanen A., 2006)

Il controllo delle crisi epilettiche è spesso garantito dall'assunzione di farmaci antiepilettici (AEDs). Sebbene la maggior parte delle epilessie sia ben controllata mediante la somministrazione

di farmaci antiepilettici, nel 30% dei pazienti circa, l'approccio farmacologico non è in grado di curare le crisi, che vengono definite farmacoresistenti. Tra queste, l'epilessia del lobo temporale è sicuramente quella con la maggiore incidenza. Studi clinici e neurofisiologici sempre più approfonditi e l'utilizzo di adeguati modelli animali di TLE possono essere di fondamentale importanza per ottenere nuovi dati sui meccanismi alla base dell'ictogenesi e della farmaco resistenza in queste forme di epilessia. Il lavoro di questa tesi è rivolto proprio allo studio dei meccanismi alla base dell'ictogenesi in un modello in vitro di crisi del lobo temporale ed in un modello animale in vivo di TLE.

1,5 Epilessia del lobo temporale

Una delle epilessie parziali farmacoresistenti più comuni nell'uomo è quindi l'epilessia del lobo temporale con sclerosi ippocampale. Nell'epilessia del lobo temporale, l'insulto iniziale responsabile dell'epilettogenesi può essere ricondotto alla sclerosi ippocampale (Fig.4). Se questa condizione che caratterizza soprattutto l'epilessia temporale mesiale sia congenita o secondaria ad una sofferenza perinatale o ad una prolungata condizione di crisi febbrile è ancora materia di discussione. In questi pazienti il normale approccio terapeutico tramite la somministrazione di farmaci antiepilettici non porta a nessun risultato dal punto di vista del controllo delle crisi. In alcuni di questi pazienti è indicata la risoluzione chirurgica, finalizzata a rimuovere la porzione di tessuto che è ritenuta essere il focus di origine delle crisi epilettiche.

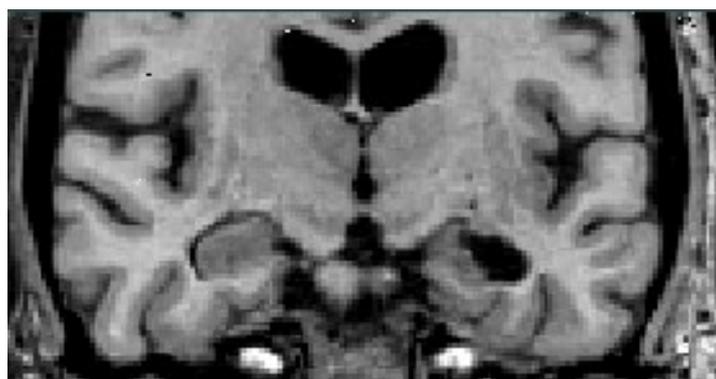


Fig.4 Immagine di risonanza magnetica di un paziente affetto da TLE. Si osserva un'evidente sclerosi a carico dell'ippocampo sinistro.

Dall'esame dei tessuti postchirurgici ottenuti da questi interventi, si riscontra una forte depauperazione dei neuroni a carico dell'ippocampo nelle regioni CA1, dell'ilo del giro dentato e

del giro dentato stesso. In queste strutture, inoltre, è evidenziabile un'intensa gliosi. I tessuti autoptici postoperatori hanno evidenziato modifiche aberranti dei network neuronali e connessioni alterate dovute ad una riorganizzazione ed alla definizione di inusuali bersagli degli assoni

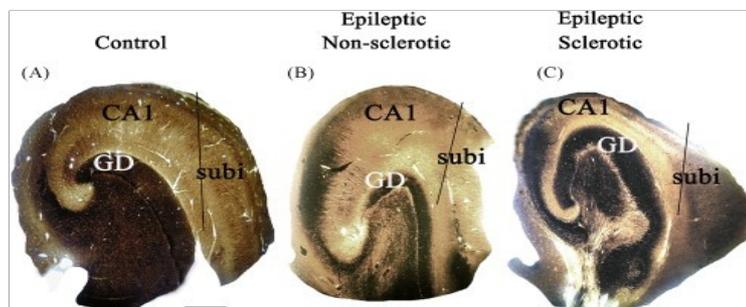


Fig 5. Arborizzazione neuronale in fette ippocampali di uomo. Nel tessuto prelevato da un paziente controllo (A) ed da un paziente epilettico senza sclerosi ippocampale (B) si osserva una normale arborizzazione. Nella fetta prelevata da un paziente epilettico con sclerosi ippocampale (C) è presente un'anomala arborizzazione in tutto il giro dentato (Maglóczy Z., 2010.)

dalle cellule dei granuli dell'ilo del giro dentato (Gabriel S., 2004; Maglóczy Z., 2010).

Questa ridefinizione dei network intraippocampali è in grado di diminuire la soglia di eccitabilità e quindi di aumentare l'epilettogenicità del lobo temporale (Nedler VJ., 2003). Anche strutture funzionalmente correlate con l'ippocampo, come l'amigdala o la stessa neocorteccia del lobo temporale, presentano un diminuito numero di neuroni ed un'intensa gliosi (Thom M., 2009). Queste alterazioni strutturali sono accompagnate da alterazioni a livello cellulare. Infatti, il ripetersi delle crisi attiva cascate biochimiche che hanno come risultato finale alterazioni nell'espressione di geni che determinano un'alterata sintesi di recettori, fattori di crescita, proteine del citoscheletro, enzimi, proteine della matrice extracellulare e di fosforilazione di macromolecole che nel loro insieme rimodellano l'attività sinaptica portando il sistema verso una permanente ipereccitabilità (Sutula and Pitkanen 2002).

1.6 Chirurgia dell'epilessia

Nelle epilessie focali resistenti alla terapia farmacologica, come nella maggioranza delle epilessie del lobo temporale con sclerosi ippocampale, è possibile pianificare la rimozione del tessuto patologico mediante chirurgia selettiva per curare il paziente dalle crisi (Kwan & Brodie, 2010). Di tutti i pazienti potenzialmente selezionabili per una risoluzione chirurgica dell'epilessia la maggior parte hanno un'epilessia con insorgenza dal lobo temporale ed una minor parte, circa il 30-40%, appartiene ad un gruppo eterogeneo di pazienti con epilessia extratemporali (Williamson et al.,

1993). La chirurgia dell'epilessia del lobo temporale, così come per le altre tipologie di epilessia focali, ha come obiettivo quello di rimuovere esclusivamente la porzione di tessuto epilettogena. E' quindi necessario definire in modo accurato l'area cerebrale da eliminare. Un importante contributo nella definizione dell'area responsabile dell'epilessia è stato dato dagli studi condotti dalla scuola francese di Tallairach e Bancaud (Bancaud et al., 1970) e dal gruppo di Jerome Engel Jr. (Engel J Jr, 1993). In questi lavori si definiscono tre principali aree anatomo funzionali: la regione epilettogena, cioè l'area minima sufficiente per generare una crisi epilettica; l'area irritativa epilettica, dove è massimamente espressa l'attività interictale e che generalmente è più estesa dell'area epilettogena; la lesione epilettogena, strutturalmente alterata ed in grado di generare crisi epilettiche.

In ambito clinico la definizione dell'area epilettogena avviene grazie ad un attento studio di ogni singolo caso. La storia, la semiologia clinica, l'elettroencefalogramma (EEG) e gli studi di risonanza magnetica nucleare sono importanti strumenti, utili per caratterizzare i singoli casi di epilessia, per permettere dal punto di vista clinico di attribuire al paziente una particolare forma di epilessia. L'individuazione dell'esatta area epilettogena viene eseguita grazie all'utilizzo convergente di differenti tecniche. Le immagini di risonanza magnetica (MRI) sono particolarmente utili per individuare anomalie strutturali anche di piccola entità che possono rappresentare la regione di sofferenza cerebrale. Di particolare importanza per un buon outcome postoperatorio è l'identificazione mediante risonanza magnetica di un'area displastica o comunque strutturalmente alterata che possa essere considerato la zona di esordio delle crisi (Luders and Schuele, 2006; Thom et al., 2010). L'analisi dell'attività elettrica interictale ed ictale mediante l'elettroencefalogramma è fondamentale per confermare le informazioni ottenute con la MRI. In alcuni casi, anche dopo le analisi di MRI e di EEG di superficie, non è possibile stabilire quale sia l'esatta posizione del focus epilettico, è quindi necessario utilizzare tecniche diagnostiche più invasive. Particolarmente utili, in questi casi, sono le registrazioni con gli elettrodi intracranici che comporta l'intervento di impianto in sede per registrare le crisi direttamente dalla superficie o dalla profondità del cervello. Gli elettrodi subdurali in forma di strisce o griglie da adagiare direttamente sulla corteccia, oppure gli elettrodi di profondità che vengono posizionati direttamente nelle strutture ritenute essere le aree epilettogene (Rodi et al., 2009; Baghdadi et al., 2010) Gli elettrodi intracranici di profondità sono inseriti utilizzando coordinate stereotassiche secondo la metodica sviluppata da Talairac (Talairac & Szilá, 1980). Entrambe queste metodiche (elettrodi a griglia e di profondità) permettono di registrare in prossimità dei generatori delle crisi epilettiche e quindi permettono di identificare con precisione la zona epilettogena. Dopo avere registrato alcune crisi con questa metodica, gli elettrodi vengono rimossi e si può procedere all'intervento chirurgico di rimozione della zona epilettogena.

1.7 Le registrazioni intracraniche e l'ictogenesi

L'utilizzo di elettrodi intracranici per identificare l'area epilettogena da rimuovere, in pazienti affetti da epilessie focali farmaco-resistenti (Bancaud et al., 1970; Spencer et al., 1990; Engel, 1993; Munari et al., 1994), ha dato la possibilità di valutare per lunghi periodi l'attività neurofisiologica durante il periodo interictale, ictale e preictale. L'inizio dell'attività critica registrata in neocorteccia o nelle strutture temporali mesiali mediante elettrodi di profondità evidenzia la comparsa di un'attività di basso voltaggio ad alta frequenza, compresa tra 15 e 40Hz, associata ad una diminuzione dell'attività lenta di base (Fig.6; Allen et al., 1992; Spencer et al., 1992; Alarcon et al., 1995; Wendling et al., 2003; Hogan, 2006). Questo pattern corrisponde all'appiattimento ictale registrato negli EEG di superficie, anch'esso caratterizzato da un'attività a basso voltaggio di alta frequenza e dalla scomparsa dell'attività lenta di fondo (Gloor, 1975; Fariello et al., 1979; Blume et al., 1984; Fisher et al., 1992). Questo tipo di attività si riscontra in diverse tipologie di epilessie focali, come le epilessie neocorticali o limbiche o nelle epilessie focali criptogeniche e nelle displasie corticali. Può quindi essere considerata il segno principale e distintivo dell'insorgenza delle crisi. Per di più, nella chirurgia delle epilessie la rimozione della zona in cui si genera l'attività ad alta frequenza è fondamentale per ottenere la scomparsa delle crisi epilettiche (Alarcon et al., 1995; Gotman 1991).

Lo studio dell'attività interictale ha mostrato dati discordanti. Infatti, se in alcuni casi gli eventi interictali sembrano rinforzarsi prima della crisi, in altri sembrano diminuire la loro frequenza di ricorrenza. In pazienti affetti da epilessia del lobo temporale o da epilessia dovuta a disgenesie corticali è stato possibile evidenziare la presenza di particolari eventi preictali prima della comparsa dell'attività a basso voltaggio. Questi differiscono dai normali eventi intercritici sia per la maggiore ampiezza sia per la comparsa in punte brevi sequenze ripetitive di punte (Bartolomei F., 2004). Non si è ancora certi se l'attività preictale debba essere considerata come parte integrante della crisi o se è solo un evento che ne annuncia l'inizio. Un'ulteriore attività elettrica che caratterizza il periodo interictale, registrabile nell'ippocampo o nella corteccia paraippocampale nelle epilessie del lobo temporale, è rappresentata da eventi brevi ad altissima frequenza con uno spettro compreso tra 200 e 600 Hz (Bragin et al., 2002a, 2002b, 2004; Staba et al., 2004; Clemens et al., 2007; Jacobs et al., 2008; Worrell et al., 2008). L'attività ad altissima frequenza è maggiormente espressa nell'area d'insorgenza delle crisi, e quindi può essere utilizzata come un ulteriore strumento diagnostico per isolare la zona epilettogena. D'altra parte non è stato possibile attribuire nessuna chiara associazione tra questi eventi rapidi e l'inizio temporale delle crisi.

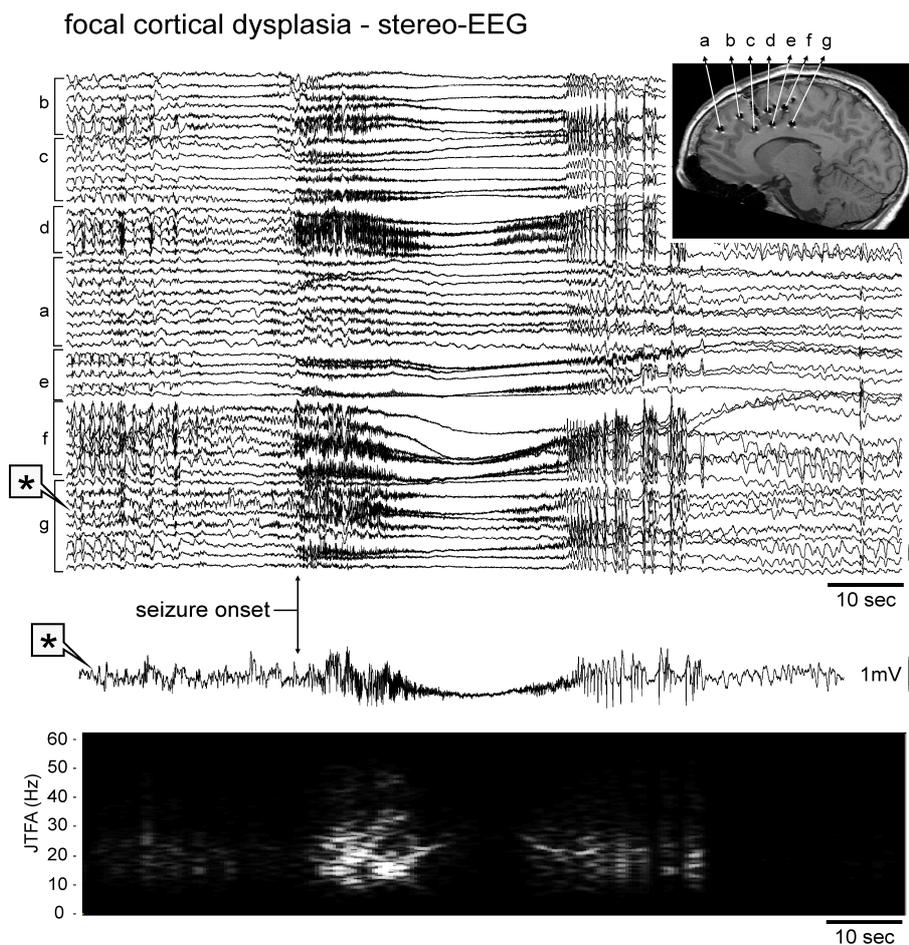


Fig.6 Registrazione stereo-eeG in un paziente con displasia corticale. La posizione degli elettrodi intracranici è osservabile nell'immagine di risonanza magnetica. In basso, lo spettrogramma dell'attività registrata mostra la tipica attività ad alta frequenza all'esordio della crisi (de Curtis & Gnatkovsky, 2009.)

1.8 Modelli animali di ictogenesi

Lo sviluppo di modelli animali di ictogenesi offre un'ottima opportunità per lo studio dei meccanismi che supportano la generazione di una crisi epilettica. Sebbene esistano diversi modelli animali, sia in vivo, acuti e cronici, sia ex vivo, pochi studi sono stati compiuti per descrivere in modo sistematico le caratteristiche di circuito che generano l'attività elettrofisiologica indotta dai diversi trattamenti. Paradossalmente si hanno più dati da studi clinici neurofisiologici (vedi de Curtis e Gnatkovsky, 2009), forse perché gli epilettologi clinici sono abituati ad una attenta osservazione degli EEG per poter inquadrare la diagnosi di diversi tipi di epilessia che richiedono trattamenti specifici ed hanno prognosi diverse.

In letteratura è possibile ritrovare prevalentemente studi in cui l'attività epilettica indotta sperimentalmente viene paragonata a quella osservata in pazienti con epilessia del lobo temporale

(Risinger et al., 1989; Engel, 2001; Bragin et al., 2005). In questi studi sono state identificate due tipologie di attività spontanea. La prima caratterizzata da ampie punte seguite da attività ad alta frequenza, detta attività ipersincrona; la seconda contraddistinta da un'oscillazione di basso voltaggio con frequenza comprese tra i 20 e 40Hz (Bragin et al., 2007).

Uno dei modelli in vivo di attività critica più utilizzati prevede la stimolazione elettrica dell'intero cervello o di particolari aree cerebrali (modello del *kindling*). L'attività indotta con questo tipo di esperimenti è caratterizzata da intense scariche neuronali dette *afterdischarges*. Gli *afterdischarges* sono attività che compaiono all'improvviso ed in modo sincrono in un numero elevato di neuroni principali. Nell'uomo questo tipo di attività si osserva solo alla fine delle crisi epilettiche. Questo modello è quindi uno strumento utile per indagare le dinamiche cellulari e di sistema che si sviluppano durante gli eventi ictali, ma non può essere utilizzato per studiare i meccanismi alla base dell'ictogenesi (Lothman et al., 1991; Bertram, 1997; McIntyre & Gilby, 2008).

Anche gli studi condotti su modelli in vitro costituiti da fettine di tessuto cerebrale (porzioni di neocorteccia o fettine di ippocampo isolato) l'azione di composti farmacologici proconvulsivanti (Tab.2) e la stimolazione elettrica hanno come conseguenza lo sviluppo non tanto di crisi epilettiche complete ma solo della componente di *afterdischarge* (Schwartzkroin & Prince, 1978; Rafiq et al., 1993).

Tipologia	Sostanze	Dose in vitro	Referenza
GABA _A receptor antagonists	bicuculline picrotoxin penicillin	10-50 µM 50-200 µM 2 mM	Schwartzkroin and Prince (1980) Hablitz (1984) Schwartzkroin and Prince (1977)
Glutamate receptor agonists	kainic acid(KA) low-Mg ²⁺⁺	0.1-1 µM	Fisher and Alger (1984) Lothman et al. (1981) Avoli et al. (1991)
Muscarine receptor agonists	Carbachol Pilocarpine	50-100 µM 1-10 mM	Dickson and Alonso (1997) Nagao et al. (1996)
K ⁺ channel blockers	4-aminopyridine Tetraethylammonium	<100 µM 5-10 mM	Avoli et al. (2002) Fueta and Avoli (1993)

Tab.2 Principali sostanze e relative concentrazioni utilizzate in vitro per indurre attività epilettiforme.

Probabilmente la gamma di attività che si registra in una crisi epilettica nel suo complesso necessita della presenza di interconnessioni ad ampio raggio tra neuroni e tra neuroni ed altri componenti del tessuto cerebrale, quali la glia e l'endotelio, che sono difficilmente preservate nelle preparazioni di fettine semplici. Questa ipotesi trova riscontro negli esperimenti condotti su fettine complesse, dove nelle quali viene preservata l'integrità dell'ippocampo e della corteccia entorinale e delle loro interconnessioni. In questo contesto, infatti, la somministrazione di sostanze proepilettogene, come la 4-aminopiridina, la pilocarpina o la bicucullina, induce un pattern critico complesso paragonabile con quello osservato nell'uomo (Barbarosie & Avoli, 1997; Avoli et al., 2002; Wozny et al., 2005)

1.8.1 Il cervello isolato di cavia come modello di ictogenesi

L'integrità del parenchima cerebrale è preservata nel cervello isolato di cavia mantenuto in vitro tramite perfusione arteriosa (de Curtis et al., 1991; 1998; Muhlethaler et al., 1993). In questa preparazione il cervello in toto della cavia viene rimosso dal cranio e mantenuto funzionalmente vitale mediante la somministrazione di una soluzione salina complessa in grado di mimare le

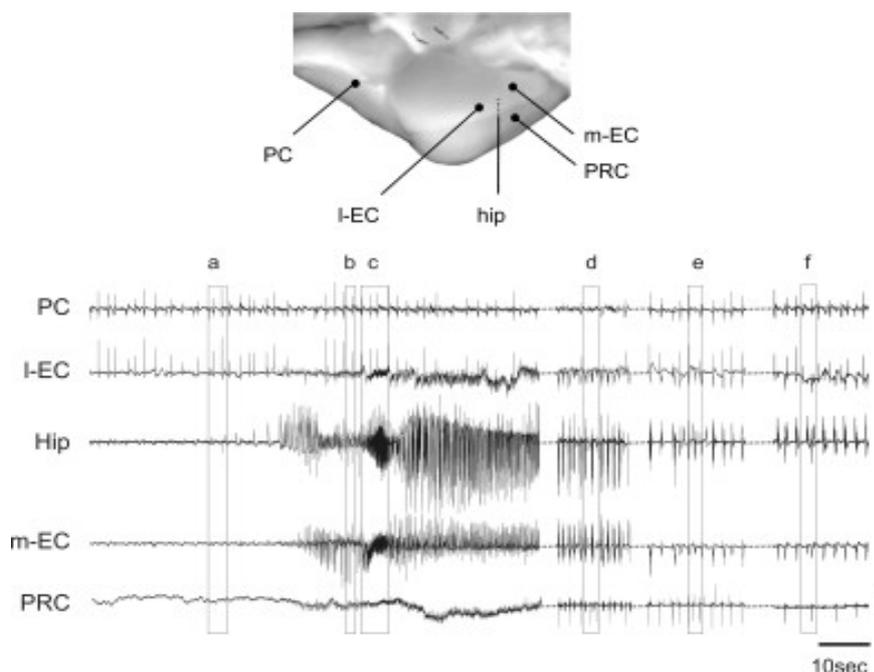


Fig.7 Tipici pattern elettrografici indotti dalla somministrazione di bicucullina. In alto sono visibili i punti di registrazione: corteccia piriforme (PC), corteccia entorinale laterale (I-EC), ippocampo (hip) corteccia peririnale (PRC) e corteccia entorinale mediale(m-EC). Per primi compaiono delle spike interictali in PC e I-EC in seguito compaiono le preictal spike in hip e nella m-EC (b). L'inizio della crisi è caratterizzato da un'attività ad alta frequenza in hip e m-EC (c). L'attività critica propaga in PRC solo nella sua fase finale (d ed e). Terminata la scarica epilettica in PC e nella I-EC ricompaiono le attività interictali (Uva L., 2009).

caratteristiche di nutrimento, pH e toniche del plasma, perfusa attraverso una cannula inserita nell'arteria basilare. L'aggiunta sostanze convulsivanti induce la comparsa di attività intercritica,

precritica ed ictale (Uva L., 2005; 2008; 2009) caratterizzata da punte che originano nella corteccia piriforme (PC), propagano alla corteccia entorinale laterale (l-EC), alla corteccia entorinale mediale (m-EC) e all'ippocampo (Hippo). L'attività ictale che ha inizio proprio nelle strutture ippocampali e paraippocampali del lobo temporale (Fig.7).

Questo tipo di attività è stata studiata in particolare dettaglio dopo somministrazione della bicucullina (Uva et al., 2005; Gnatkovsky et al., 2008).

Sorprendentemente, pur essendo la bicucullina un antagonista GABAergico, la sua somministrazione sistemica per un breve periodo (3 minuti) aumenta l'inibizione all'interno del sistema limbico (Gnatkovsky et al., 2008). Registrazioni intracellulari di neuroni piramidali degli strati superficiali e profondi all'interno della m-EC hanno mostrato che l'attività di basso voltaggio ad alta frequenza all'inizio della crisi correla con un blocco della scarica neuronale e con la comparsa di potenziali post sinaptici inibitori (IPSPs) rapidi che ricorrono a 20-30Hz. Quando le registrazioni intracellulari vengono effettuate da interneuroni si registra una intensa attività di scarica (Gnatkovsky et al., 2008). Pochi secondi dopo l'insorgenza dell'attività ad alta frequenza i neuroni principali riprendono la loro attività con scariche irregolari che diventano sempre più sincrone e ritmiche, per poi esaurirsi progressivamente fino ad una condizione di depressione post-ictale. In definitiva, in un modello in cui vengono mantenute tutte le caratteristiche dell'ictogenesi presenti nell'uomo, sembra che l'attività di basso voltaggio ad alta frequenza, che rappresenta l'evento iniziale delle crisi epilettiche, sia mediata da un aumento dell'attività inibitoria sostenuta dall'intensa attività di scarica degli interneuroni.

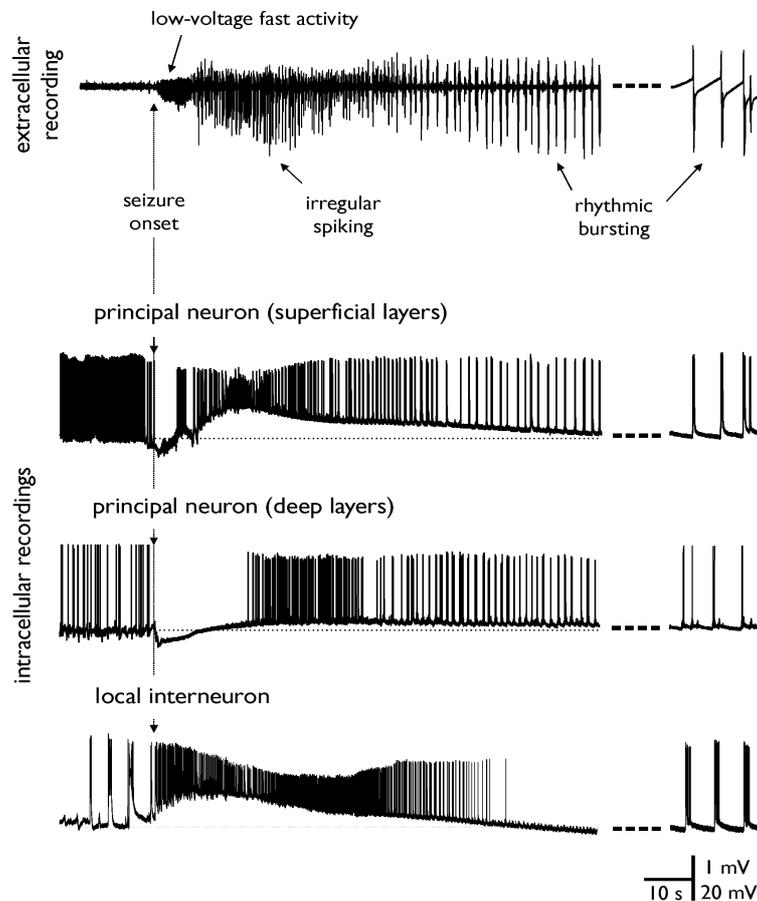


Fig.8 La traccia in alto mostra una registrazione extracellulare dell'attività icale indotta dalla somministrazione di bicucullina. Le tracce sottostanti sono ottenute da registrazioni intracellulari da un neurone piramidale degli strati superficiali, da un neurone degli strati profondi ed da un interneurone della m-EC in ordine dall'alto al basso. L'inizio dell'attività critica correla con un silenziamento dell'attività dei neuroni principali contestualmente ad un'intensa attività degli interneuroni (de Curtis & Gnatkovsky, 2009).

1.9 Modelli animali di epilessia del lobo temporale

Diversi modelli animali sono stati sviluppati per studiare l'epilessia del lobo temporale. I differenti approcci prevedono l'induzione di uno stato di male epilettico (caratterizzato da crisi epilettiche subcontinue per una durata superiore a 2 ore) tramite la somministrazione di chemioconvulsivanti o mediante la stimolazione elettrica, l'uso di tossine tetaniche, l'ipertermia, i danni cerebrali traumatici e l'ischemia perinatale.

I modelli basati sull'induzione dello stato epilettico ben mimano la patologia umana. Infatti, nei pazienti con epilessia del lobo temporale un insulto iniziale può determinare uno stato di male epilettico, che è seguito da un periodo di latenza clinica che termina con la comparsa di crisi

spontanee e ricorrenti. La pilocarpina, un agonista muscarinico, e l'acido kainico, un agonista glutamatergico che agisce sui recettori ionotropici non NMDA, sono somministrate per via sistemica per indurre uno stato epilettico sperimentale (Cavalheiro et al., 19984; Fujikawa et al., 2003; Perry et al., 1978; Ben-Ari et al., 1985). Solitamente lo stato di male viene bloccato dopo due ore mediante somministrazione di diazepam. La mancata interruzione dello SE porterebbe, nel più delle volte, alla morte dell'animale. Lo stato epilettico acuto induce morte neuronale, neurogenesi e gliosi (de Lanerolle, Kim et al., 1989; Cascino et al., 1989; Miyashiro et al., 1990; Pan et al., 2004, Cavalheiro et al., 1993). L'analisi dei tessuti provenienti da animali che hanno sviluppato epilessia cronica evidenzia la presenza di danni simili a quelli riscontrati nei pazienti affetti da TLE con sclerosi ippocampale. Va aggiunto che spesso le alterazioni si estendono a strutture normalmente non coinvolte nelle TLE. Infatti, modifiche nella struttura e nella conta cellulare sono state riscontrate in corteccia piriforme, nella corteccia olfattoria, nell'amigdala, nei nuclei talamici e della neocorteccia. Inoltre, i danni, sia all'ippocampo sia alle altre strutture, sono estese e bilaterali, mentre nell'uomo sono focali e unilaterali (Fig 9, Sloviter, 2004).

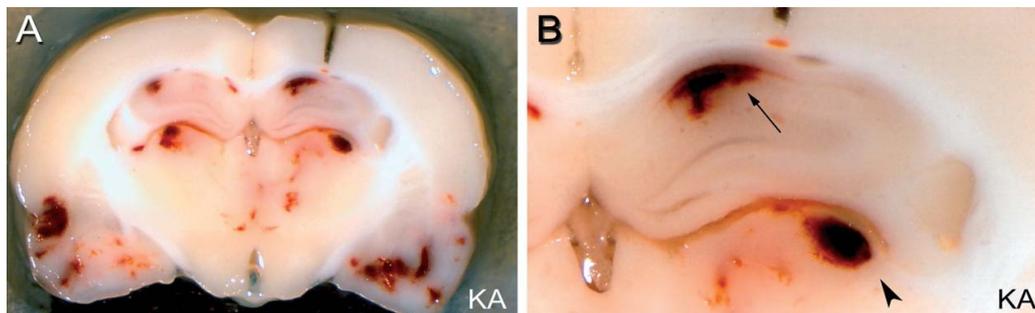


Fig.9 Carvello di ratto dopo 3 giorni dall'iniezione intraperitoneale di AK. In A si notano possibili foci emorragici in diverse strutture cerebrali: ippocampo, talamo e corteccie temporali. I danni si presentano in tutti e due gli emisferi. In B un Ingrandimento dell'area ippocampale (Sloviter 2005).

Sia lo stato di male epilettico che le crisi ricorrenti degli animali cronici, dal punto di vista clinico hanno caratteristiche comportamentali difficilmente riscontrabili nell'uomo. Classicamente, nel modello animale, le crisi sono caratterizzate da tremori iniziali agli arti ed evolvono rapidamente in crisi tonico-cloniche evidenti, che terminano con un periodo di completa depressione dell'animale. Nell'uomo affetto da TLE le crisi convulsive e motorie sono rare.

Una percentuale di pazienti affetti da TLE ha avuto un'esperienza di convulsioni febbrile in età compresa tra pochi mesi e 6 anni. Se queste siano direttamente collegate all'insorgenza di epilessia

nell'età adulta è ancora materia di dibattito. Secondo l'ipotesi più accreditata, le crisi febbrili indurrebbero danni all'ippocampo con conseguente sclerosi e sviluppo di TLE. L'induzione di crisi da ipertermia in ratti di 1-2 settimane è un modello utile per verificare o confutare questa ipotesi. Dubé e collaboratori hanno mostrato nel 2006 che il 35% degli animali sottoposti a questo trattamento, dopo un periodo silente sviluppano crisi elettrografiche e comportamentali. Dal punto di vista elettrografico, comunque, gli eventi ictali registrati non sono paragonabili alle crisi osservate nelle TLE umane. Infatti, le crisi si presentano come sequenze di polipunte, dalla durata media di 50 sec in corteccia e 8-9 sec in ippocampo (Fig.10).

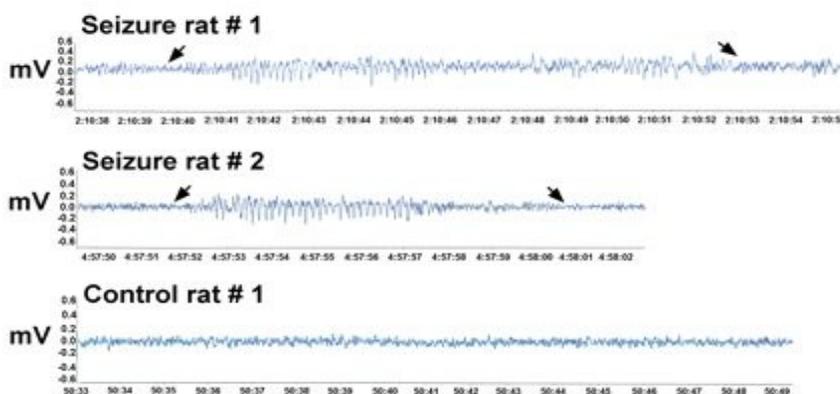


Fig.10 Nelle prime due tracce si osserva l'attività epilettiforme registrata in due differenti ratti dopo 90 gior dall'induzione di convulsioni febbrili. L'attività si presenta come polispikes. L'ultima traccia è stata registrata da un animal controllo (Dubé et al., 2006).

Sono assenti sia l'attività ad alta frequenza e basso voltaggio all'inizio della crisi sia la successiva l'attività di scarica irregolare e la depressione post-critica. Dal punto di vista strutturale non vi osservano le tipiche anomalie a carico dell'ippocampo che caratterizzano la patologia umana.

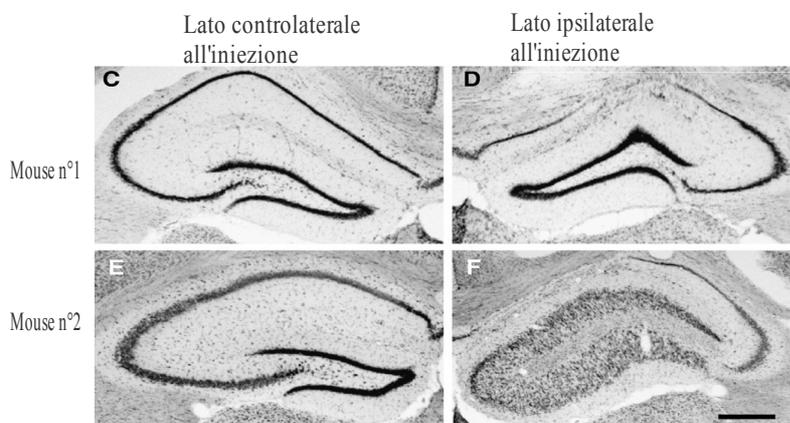


Fig.11 Sezioni ippocampali di topi ottenute dopo 26 giorni dall'iniezione intraippocampale di AK. Le immagini sulla destra corrispondono all'ippocampo ipsilaterale al trattamento. La colorazione tionina evidenzia come il danno ippocampale sia limitato all'emisfero trattato (Grotike et al., 2008).

Un ulteriore approccio sperimentale, per ottenere un modello animale di TLE, prevede la somministrazione di acido kainico direttamente nell'ippocampo. L'iniezione può essere fatta con l'animale in anestesia oppure in condizione di veglia (Raedt et al., 2008). L'iniezione intraippocampale limita l'area danneggiata al solo ippocampo trattato (Grotike et al., 2008) andando così a mimare il danno unilaterale presente nella larga maggioranza dei pazienti con TLE e sclerosi ippocampale.

Una caratteristica che accomuna questo modello alla patologia umana è l'anomala arborizzazione degli assoni delle cellule dell'ilo del giro dentato ben evidenziato dalla colorazione istochimica TIMM (Fig.12).



Fig.12 Colorazione Timm effettuata su di una sezione ipsilaterale proveniente da un animale iniettato con AK nell'ippocampo. L'anomala arborizzazione è confermata dalla positività della colorazione nella regione sopragranulare (Longo et al., 1998).

Dal punto di vista elettrofisiologico questo modello è caratterizzato nella fase acuta, immediatamente dopo l'iniezione, da scariche ictali solitamente circoscritte all'ippocampo trattato. Il comportamento espresso dagli animali è caratterizzato da uno stato di rigidità. Dopo un'ora dall'iniezione l'attività ictale diventa più frequente coinvolgendo anche l'emisfero controlaterale con manifestazioni che vanno dai movimenti facciali stereotipati alle crisi cloniche generalizzate. A quattro ore dall'inizio dell'esperimento l'animale non esprime nessun evidente comportamento se non immobilità. L'EEG mostra un'attività critica limitata all'ippocampo ipsilaterale (Longo et al., 1998; Leite et al., 1996). Nelle successive 9-17 ore le crisi del periodo acuto si risolvono autonomamente senza l'utilizzo di anticonvulsivanti (Gröticke et al., 2008).

Dopo un periodo silente, sia dal punto di vista elettrografico che comportamentale, nel sito di iniezione si registra attività di breve durata ad alta frequenza (*fast ripple*). I *fast ripples* presenti in questo modello animale sono un altro punto in comune con i dati ottenuti dall'uomo. Oltre ai *fast ripples* in questi animali si registrano anche eventi di punta interictali ("interictal spikes" IS). A differenza dell'attività ad alta frequenza, le IS non sono localizzate nell'area di iniezione ma si

presentano anche nell'emisfero controlaterale. Le IS ma soprattutto i *fast ripples* rappresentano le prime evidenze di un attivo processo di epilettogenesi. Infatti, in media 20 giorni dopo la loro comparsa è possibile registrare crisi epilettiche solo in quegli animali in cui sono stati registrati i *fast ripples* (Bragin et al., 2004). Le attività ictali registrate si

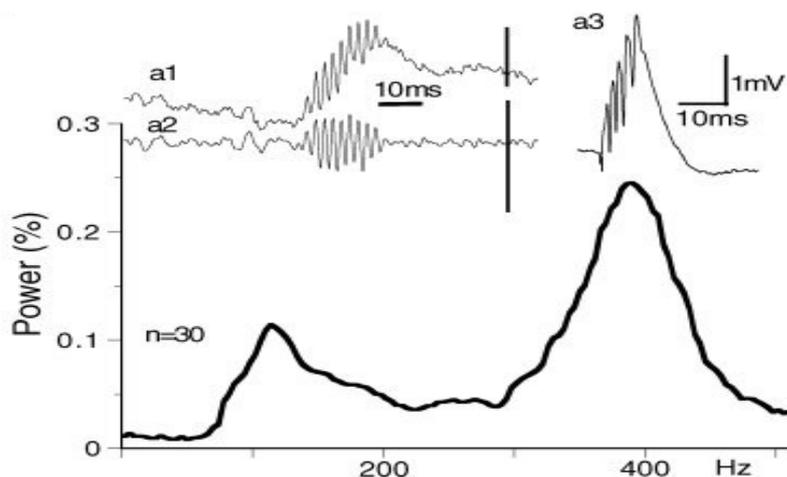


Fig.13 Spettrogramma e registrazioni extracellulari di *fast ripple* (fr) in un animale che ha sviluppato epilessia dopo il trattamento con AK intraippocampale. In a1 è rappresentata la registrazione senza filtri di un fr. In a2 è riportata la medesima registrazione con un filtro passabanda compreso tra 80 e 500Hz. A3 mostra la risposta evocata in ippocampo in seguito alla stimolazione del perforant path. In basso lo spettrogramma del fr in a che indica la presenza di un ampio picco di frequenza a 380Hz (Bragin et al., 2004).

possono classificare in due grandi gruppi in base alle caratteristiche degli EEG registrate all'inizio della scarica epilettica. Il 70% delle crisi inizia con un aumento della frequenza delle punte intercritiche, che all'inizio della crisi si arricchiscono di un'oscillazione ad alta frequenza. Questa tipologia di crisi, definita ipersincrona (HYP), comincia proprio nella zona di iniezione per poi diffondere alle altre zone cerebrali. Le crisi HYP si manifestano durante il sonno degli animali e non hanno nessun correlato comportamentale. Nel 20% dei casi le crisi iniziano con un potenziale ampio seguito da un aumento delle alte frequenze del segnale EEG accompagnato da una diminuzione della loro ampiezza. Questo tipo di crisi, detta di attività a basso voltaggio (LVF), inizia contemporaneamente in ippocampo e corteccia in tutti e due gli emisferi (Bragin et al., 2002).

2. SCOPO DEL LAVORO

La possibilità di studiare sempre con maggior dettaglio gli eventi che da un EEG intercritico portano all'insorgenza dell'attività ictale potrebbe aprire la strada a nuovi approcci terapeutici. Un importante contributo all'analisi di questa finestra temporale, detta ictogenesi, è dato dall'utilizzo gli elettrodi intracranici nello studio pre-chirurgico dei pazienti affetti da TLE o epilessie extratemporali. Di fondamentale importanza inoltre è l'utilizzo di modelli animali in grado di riprodurre le caratteristiche elettrofisiologiche dell'attività interictale ed ictale osservate nei pazienti.

In questo lavoro di tesi abbiamo sviluppato lo studio del **cervello isolato di cavia** come **modello di ictogenesi del lobo temporale**. Precedenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la somministrazione sistemica acuta di bicucullina induce una sequenza di eventi, critici ed intercritici, simili a quelli registrati nella TLE umana. Ci siamo chiesti se il pattern epilettico acuto osservato fosse specifico per la bicucullina oppure se fosse una risposta propria del **network limbico** indipendente dall'agente epilettogeno utilizzato. Per verificare questa ipotesi, sono stati condotti esperimenti di ictogenesi acuta che hanno utilizzato come pro-epilettico la 4 aminopiridina.

Il passo successivo è stato quello di creare un **modello animale cronico di TLE nella cavia** mediante la somministrazione di **acido kainico direttamente nell'ippocampo**, per verificare se il pattern interictale/ictale fosse simile a quello osservato nel modello acuto.

Obiettivo futuro sarà l'utilizzo della tecnica del cervello isolato di cavia e studiare a fondo l'ictogenesi in un cervello proveniente da un animale che ha sviluppato un modello cronico di TLE simile alla patologia umana.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Il cervello isolato di cavia in vitro

Gli esperimenti sono stati eseguiti su femmine di cavia Hartley di peso variabile tra 150 e 200 gr. L'animale viene anestetizzato con iniezione intraperitoneale di tiopentale sodico (80 mg/kg). La concentrazione di barbiturico diminuisce al di sotto di valori anestetici (2.03 ± 0.56 mg/L; mean \pm SD) dopo 30' dalla messa in vitro (Librizzi, et al.,2005). Questo permette di escludere ogni eventuale interferenza dell'anestetico sulla funzionalità del preparato e sui risultati ottenuti. Dopo aver raggiunto uno stato profondo di anestesia, verificato dall'assenza del riflesso corneale e dei riflessi di flessione alla stimolazione cutanea, si procede alla rapida toracotomia per esporre il cuore. Si introduce una cannula nel ventricolo sinistro, si sospinge fino a raggiungere l'aorta ascendente e si procede alla perfusione intracardiaca per circa 3 minuti di una soluzione salina a 7-8 °C costituita da NaCl 126mM, NaHCO₃ 24.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.3mM, KCl 3mM, glucosio 15mM, HEPES 2.1mM, CaCl₂ 2.4mM e destrano (PM 70.000) al 3% come plasma expander. La soluzione è ossigenata con una miscela gassosa 95% O₂ e 5% CO₂. Il pH finale, corretto con HCl glaciale, è di 7.1 U. Questo passaggio ha il duplice scopo di 1) ridurre il metabolismo cerebrale per rallentare i processi di degenerazione cerebrali indotti dalla breve anossia che si verifica durante la dissezione, e 2) rimuovere dai vasi il sangue, evitando la formazione di trombi. Il flusso durante la perfusione è di 7 ml/min e la pressione di 80-100 mmHg imposta da un sistema di perfusione a caduta. Durante la perfusione intracardiaca si procede alla rimozione dello scalpo seguita poi dalla decapitazione. Sempre in condizioni di ipotermia si esegue una vasta e delicata craniotomia mediante ossivora, esponendo la porzione dorsale dei bulbi olfattori, la corteccia, il cervelletto, il tronco encefalico e la prima porzione del midollo spinale (fino a C1- C2). Se la perfusione cardiaca ha avuto successo il cervello appare bianco e privo di coaguli nei vasi. Con forbicine da iride viene rimosso lo strato meningeo dalla volta dorsale e si scolla delicatamente il cervello dalla base cranica, inserendo una spatolina ricurva a livello dei bulbi olfattori. Si recidono quindi le carotidi e il chiasma ottico, il peduncolo ipofisario insieme alle arterie ipofisarie, i nervi cranici, le arterie vertebrali e i primi nervi spinali. Il cervello così isolato viene rapidamente trasferito in una camera di perfusione/incubazione costituita da una vaschetta di alluminio (12x7 cm x 4 cm di altezza) rivestita con un materiale siliconico inerte ed isolante (Sylgard), riempita con la stessa soluzione utilizzata per la riperfusione cardiaca a 7.4 pH. La camera è termoregolata tramite sonda termica inserita nella vaschetta collegata ad un termostato

che agisce su un sistema di celle di Peltier alimentate da un generatore di corrente. La temperatura della soluzione della vaschetta in queste fasi iniziali è mantenuta a 15° C.

Il cervello viene appoggiato sul lato dorsale così che la porzione ventrale, in cui si trovano il circolo di Willis e i grossi vasi, sia facilmente accessibile; in questa posizione viene stabilizzato da una struttura a ponte costituita da due fili di seta fissati al fondo della vaschetta.

Per ripristinare la perfusione cerebrale si procede immediatamente all'inserimento nell'arteria basilare di una cannula di polietilene (200-300 µm di diametro alla punta) collegata ad una pompa peristaltica (Gilson) tramite un sistema di tubi di TYGON impermeabili all'ossigeno (in cui sono intercalati un bubble trapper ed un filtro di nitrocellulosa con pori di 22 µm). La soluzione (pH 7.4, ossigenata) viene perfusa con un flusso di 7.0 ml/min. Il sistema è studiato in modo da garantire la perfusione e impedire che eventuali impurità e/o bolle d'aria giungano al sistema vascolare e abbiano effetto embolizzante. Dalla decapitazione alla riperfusione in vitro trascorrono meno di 10 minuti; si chiudono quindi i due monconi delle arterie carotidi interne e delle due ipofisarie con fili di seta ricostituendo così l'integrità funzionale del circolo di Willis e garantendo una perfusione ottimale a tutto il cervello. Queste operazioni microchirurgiche sono effettuate con l'ausilio di uno stereomicroscopio (ingrandimento 30x) ed illuminando il campo operatorio con una fibra ottica che crea un fascio di luce fredda tangenziale alla superficie del preparato.

Dopo aver controllato che non ci siano perdite arteriose si innalza gradualmente la temperatura della soluzione fino a 32° C con un incremento di 0.2° C/min. Gli esperimenti elettrofisiologici vengono effettuati a 32° C.

In queste condizioni, il cervello di cavia è funzionalmente e strutturalmente preservato per 6-8 ore. (Llinas et al., 1981; de Curtis, Pare et al., 1991a; de Curtis et al., 1994; Biella and de Curtis, 1995; Biella et al., 1996; de Curtis et al., 1998; Librizzi et al., 1999, 2001).

3.2 Registrazioni elettrofisiologiche in vitro

Gli esperimenti hanno previsto la registrazione delle risposte indotte dalla stimolazione del tratto laterale olfattorio (LOT) con un elettrodo bipolare (filo d'argento teflonato arrotolato a spirale) nel sistema olfattorio- limbico. Precedenti studi hanno mostrato l'alta stabilità delle risposte indotte dalla stimolazione del LOT in un tessuto funzionalmente preservato (Biella and de Curtis, 2000). Per questo motivo sono state utilizzate per valutare lo stato di preservazione della preparazione. L'analisi delle risposte indotte dalla stimolazione del LOT nel tubercolo olfattorio e nella corteccia piriforme è stata oggetto di uno studio preliminare per confermare la preservazione del preparato (Carriero et al., 2009).

Le registrazioni extracellulari del presente studio sono state eseguite con microelettrodi di vetro a bassa resistenza (5–6 MΩ) riempiti con NaCl 0.9%. Gli elettrodi di registrazione e stimolazione

sono stati posti sotto controllo visivo attraverso uno stereomicroscopio. RegISTRAZIONI extracellulari sono state eseguite negli strati II/III della corteccia piriforme (PC), nello strato III della corteccia entorinale laterale (l-EC), negli strati profondi della corteccia entorinale mediale (m-EC) e nella regione ippocampale CA1. In alcuni esperimenti le registrazioni sono state compiute in entrambi gli emisferi.

Gli stimoli sono stati indotti grazie ad un generatore di impulsi (Grass Telefactor S88, Warwick, RI). I segnali elettrofisiologici sono stati amplificati attraverso un amplificatore differenziale multicanale (Biomedical Engineering, Tornwood, NY, USA) e sono stati acquisiti in forma digitale attraverso una scheda analogica/digitale AT-MIO-64E3 National A/D Board (National Instrument, Milano, Italia). Le tracce infine sono state acquisite ed analizzate con un software sviluppato presso il nostro laboratorio dal dott. Vadym Gnatkovsky (ELPHO®).

Per valutare il contenuto di frequenze nei tracciati extracellulari in PC, l-EC, m-EC e CA1 è stata compiuta un'analisi dell'ampiezza spettrale con un algoritmo basato sulla trasformata di Fourier. Inoltre, è stato calcolato il coefficiente di correlazione (r) tra i potenziali di campo registrati in PC contro la l-EC, CA1 e la m-EC, calcolati in finestre di 40 ms traslate con un periodo di 20 ms. Lo stesso metodo è stato utilizzato per valutare i coefficienti r per tutte le possibili combinazioni tra PC, l-EC, CA1 e m-EC. Per evidenziare la differenza tra i coefficienti di correlazione i dati sono stati presentati come il valore quadrato di r (r^2). Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando lo student's t-test. Le seguenti sostanze chimiche, acquistate dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) o dalla Tocris Cookson (Ellisville, MO), sono state perfuse attraverso l'arteria basilare nel cervello isolato di cavia: 4aminopiridina (4AP), 6-cyano-7-nitroqui-noxaline-2,3-dione (CNQX, 50 μ M), 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-di-one (DNQX, 50 μ M), and 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, 100 μ M).

3.3 Valutazione della posizione e della dose di KA da iniettare in vivo

I primi esperimenti sull'animale in vivo sono stati effettuati per individuare il punto di iniezione e per valutare la dose di acido kainico da iniettare. Sono state utilizzate cavie Hartley del peso circa di 250-300gr. Dopo un adeguato periodo di adattamento (7 giorni), gli animali sono stati anestetizzati mediante isoflurano e posti sullo stereotassico. Il flusso di isoflurano è stato impostato ad un valore di partenza pari al 4% per poi essere adattato durante tutto l'esperimento fino ad un livello di 1-1,5%.

Per raggiungere l'ippocampo abbiamo inciso la cute ed esposto il cranio. E' stato effettuato un foro (diametro \approx 1.2mm) alle coordinate stereotassiche -7 mm antero-posteriormente, $+3,5$ mm medio-lateralmente. Come punto di riferimento stereotassico è stato considerato il Lambda. Per somministrare l'acido kainico in ippocampo, è stato fatto passare un ago collegato ad una siringa

Hamilton da 1 μ l attraverso il foro. La superficie del cranio è stata considerata come punto di riferimento per il posizionamento dell'ago in senso dorso-ventrale (-4.5mm). Raggiunto il punto finale sono stati fatti passare 2 minuti per permettere ai tessuti attraversati dall'ago di ristabilizzare la loro forma. A questo punto sono state iniettate 1 μ l di soluzione di AK con concentrazioni differenti nell'arco di tempo di 2 minuti. L'ago è stato quindi sollevato e rimosso dal cervello dell'animale dopo ulteriori 2 minuti.

Dopo aver suturato la ferita, gli animali sono stati posizionati su di un lettino di plexiglass, per poter effettuare le analisi di risonanza magnetica nucleare.

Al termine di ogni procedura chirurgica gli animali sono stati trattati con antibiotico, Baytril (enrofloxacin soluzione iniettabile 2,5%), per 3 giorni ogni 12 ore. Inoltre, il trattamento post-chirurgico prevede l'iniezione intramuscolo di fidadyne (2mg/k, flunixin meglumina: analgesico) per 3 giorni ogni 12 ore ed una singola iniezione di ringer lattato come ricostituente-reidratante.

3.4 Risonanza magnetica

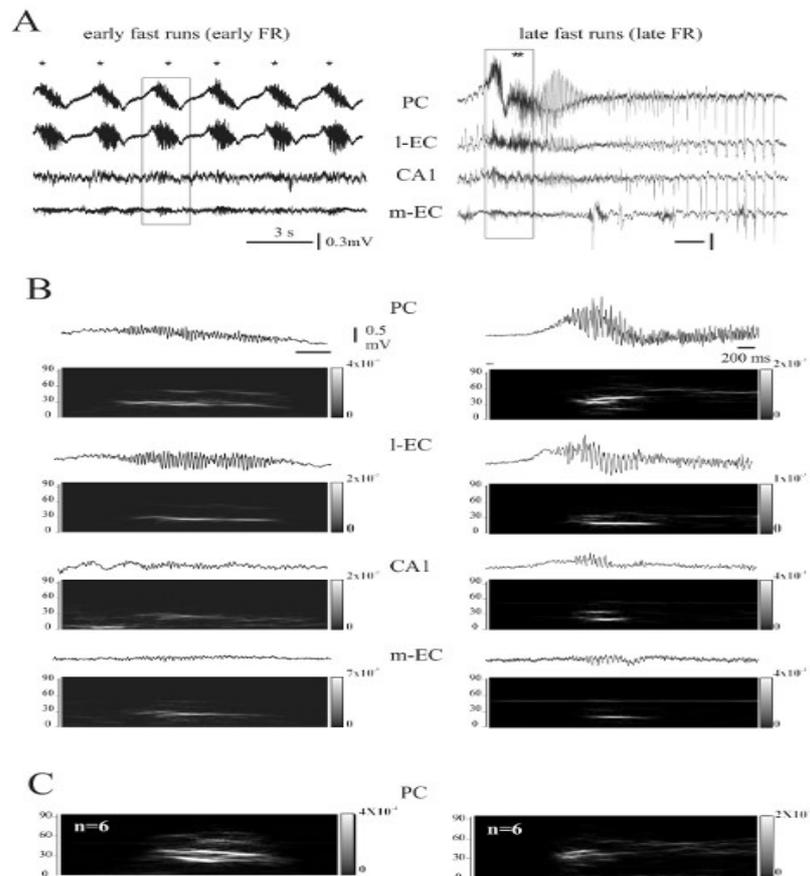
Gli animali trattati con AK intraippocampo durante l'anestesia sono stati utilizzati per l'acquisizione di immagini di RM. Gli studi di RM sono stati effettuati immediatamente dopo la somministrazione di AK e dopo un periodo non inferiore ai due mesi con un sistema Bruker a 7 Tesla utilizzando una bobina di superficie in ricezione ed una di volume in trasmissione (BIOSPEC 70/30 USR). Per evidenziare il passaggio dell'ago-cannula nel tessuto cerebrale sono state acquisite immagini pesate in T2 (TR= 4000, TE= 39 ms, inter echo time= 13 ms, FOV= 3x3 cm², data matrix 256x256, slice thickness = 1 mm) lungo i tre piani ortogonali.

3.5 Impianto elettrodi e cannula di somministrazione

Dopo 7 giorni dall'arrivo, Cavie Hartley del peso di 250-300gr sono state anestetizzate mediante isoflurano e poste sullo stereotassico. Come per i precedenti esperimenti il livello dell'anestetico gassoso è stato modificato durante l'operazione, partendo da una concentrazione pari al 4% per terminare con l'1-1,5%. Per evitare l'ipotermia, la temperatura corporea dell'animale è stata mantenuta grazie ad un lettino riscaldato.

Dopo la completa esposizione del cranio sono stati praticati sei fori per inserire gli elettrodi epidurali e di profondità. Sono stati inseriti nella corteccia fronto-parietale in entrambi gli emisferi, nel cervelletto e nelle fosse nasali elettrodi epidurali (viti di acciaio inossidabile dal diametro di 1,2 mm recanti un filo di rame saldato). Due elettrodi di profondità (cavi di acciaio inossidabile ricoperti da teflon del diametro di 0,125 mm) sono stati posti in entrambi gli ippocampi utilizzando

coordinate stereotassiche e come punto di riferimento il Lambda (AP= -7; ML= $\pm 3,5$ e DV= -4,5). All'elettrodo posizionato nell'ippocampo di destra e stata incollata una cannula guida del diametro



di 23G (Cooper Needles Works, Birmingham). La distanza tra la punta della cannula guida e la punta dell'elettrodo è stata calcolata (3,2 mm) in modo che l'elettrodo arrivi in ippocampo dorsale e la base della cannula sfiori la superficie della corteccia. La cannula guida è stata, quindi, temporaneamente occlusa (Raedt et al., 2008).

Per fissare gli elettrodi intraippocampali e la cannula è stato utilizzato un cemento bi-componente (Paladur: Heraeus, Germany) che ha sfruttato le viti come elementi di ancoraggio. Tutti gli elettrodi sono stati inseriti in un connettore di plastica filettato e posto stabilmente mediante l'utilizzo del Paladur.

Al termine di ogni procedura chirurgica gli animali sono stati trattati con antibiotico, Baytril (enrofloxacin soluzione iniettabile 2,5%), per 3 giorni ogni 12 ore. Inoltre, il trattamento post-chirurgico prevede l'iniezione intramuscolo di fidadyne (2mgr/k, flunixin meglumina: analgesico) per 3 giorni ogni 12 ore ed una singola iniezione di ringer lattato come ricostituente-reidratante. Un connettore complementare è stato utilizzato per connettere l'animale al sistema di registrazione (Plastic Pedestal: Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf).

3.6 Iniezione intraippocampale

Una settimana dopo l'operazione chirurgica, le cavie sono state iniettate con KA (1 μ gr/1 μ l in 2min) nell'ippocampo di destra. Una cannula da 30G è stata introdotta attraverso la cannula prima allocata sulla corteccia dell'animale. La cannula di iniezione è stata ideata con una forma ad L, in modo tale da permettere che il braccio lungo della L potesse raggiungere l'ippocampo. La cannula di iniezione è stata collegata mediante un connettore alla siringa Hamilton. Dopo il posizionamento si attendono due minuti prima di iniziare con la somministrazione di AK.

3.7 Video-EEG monitoring

Il monitoraggio video-eeG è stato eseguito in condizioni controllate (ciclo giorno notte di 12ore regolato mediante un timer) in una camera isolata dello stabulario. L'unità di video-eeG è in grado di registrare 4 animali contemporaneamente.

Gli animali sono stati collegati mediante un connettore, complementare al connettore dell'impianto presente sulla testa dell'animale, recante un gruppo di 6 cavi (six channel cable 55 cm, Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf) a loro volta collegati ad un rotore (Slip ring serie SRC, Servotecnica, Novate Milanese). Questo sistema permette agli animali di muoversi liberamente nella gabbia.

Il rotore è stato collegato ad un sistema di acquisizione Micromed che amplifica e converte il segnale elettrico in un segnale digitale. Il sistema Micromed ha gestito anche la sincronizzazione del segnale EEG con il segnale video. L'acquisizione video è stata effettuata mediante l'utilizzo di telecamere commerciali. Le registrazioni EEG sono state acquisite con una frequenza di campionamento di 256Hz e i dati sono stati immagazzinati in forma digitale.

3.8 Monitoraggio dell'animale in fase acuta e cronica

Le cavie iniettate con KA in anestesia sono state videoregistrate per non meno di 8 ore per valutare lo sviluppo di crisi epilettiche. La gravità delle crisi è stata valutata in base all'evidenza comportamentale di crisi parziali, crisi generalizzate e in base alla durata dello stato epilettico. È stato attribuito il valore 0 a quegli animali che non hanno sviluppato crisi; valore 1 per una crisi lateralizzata; valore 2 per più crisi lateralizzate; valore 3 per crisi inizialmente lateralizzate che in seguito generalizzano, di durata inferiore alle 3 ore; valore 4 per crisi inizialmente lateralizzate che in seguito generalizzano, di durata superiore alle 3 ore; valore 5 per quelli animali che sono deceduti in seguito ad una violenta crisi. La comparsa di crisi epilettiche in cronico è stata valutata mediante la revisione delle videoregistrazioni effettuata ogni due giorni per 48ore, per un periodo non inferiore a 3 mesi.

Le cavie recanti l'impianto corticale sono state registrate 24 ore su 24 mediante video-EEG dal

giorno precedente all'iniezione di AK fino ad un periodo non inferiore ai 2 mesi. Le crisi e gli eventi intercritici sono stati identificati mediante l'analisi degli EEG.

3.9 Preparazione dei tessuti per l'analisi morfologica

Le cavie destinate all'analisi istologica sono state prima anestetizzate profondamente con una soluzione di cloralio idrato al 4% (1ml/100g di peso corporeo) e poi perfusi per via intracardiaca con 500ml di una soluzione acquosa di solfuro di sodio 0,4% seguita da 500ml di una soluzione di paraformaldeide 4% e glutaraldeide 1%. I cervelli sono stati rimossi dalla scatola cranica, postfissati in paraformaldeide al 4% e glutaraldeide all'1% per circa 24 ore e quindi tagliati al vibratomo in sezioni coronali dello spessore di 50 μ m. Tali sezioni sono state raccolte in ordine seriale e conservate in una soluzione di PB e NaN₃ 1%.

3.9.1 Controcolorazione con tionina

Le sezioni, montate su vetrino con Cromalin e disidratate in stufa a 37°C per 30 minuti, vengono successivamente idratate mediante lavaggi di 5 minuti cad. con alcoli a concentrazione decrescente (da 100% a 50%), e infine con acqua bidistillata. Successivamente le sezioni vengono immerse in tionina per 30 secondi. Dopo due lavaggi con acqua bidistillata, le sezioni vengono disidratate mediante lavaggi di 2 minuti cad. con alcoli a concentrazione crescente (da 50% a 100%) e infine coperte con DPX.

3.9.2 Immunoistochimica

Le sezioni tagliate al vibratomo sono state protette in una soluzione di saccarosio al 4% per 30 minuti e successivamente permeabilizzate in metanolo 100% per altri 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggi con tampone fosfato salino (PBS) sono state pretrattate con H₂O₂ all'1% in PBS. Le sezioni sono state quindi lavate di nuovo in PBS e incubate con siero Normal Goat Serum (NGS) al 10% in PBS per 60 minuti, per mascherare i siti di assorbimento aspecifici e a questa soluzione è stato aggiunto Triton X-100 allo 0,2%, tensioattivo permeabilizzante utilizzato per migliorare la penetrazione dell'anticorpo. Le sezioni sono state poi incubate overnight a 4°C con anticorpo anti-GFAP (xxx) in una soluzione di NGS 1% in PBS.

Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in PBS, le sezioni sono state incubate con anticorpo IgG secondario biotinilato anti-xxx diluito 1:200 in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggi con PBS per 15 minuti le sezioni sono state incubate con il complesso avidina-biotina coniugato con perossidasi (ABC, Vector Laboratories) diluito 1:100 in PBS.

La colorazione è stata ottenuta incubando le sezioni in DAB (3-3'-diamminobenzidina) 0,075% e H₂O₂ 0,002% in tampone Tris Hcl 50mM.

Le sezioni così reagite sono state montate su vetrino in soluzione di Cromalin (5g $K_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$) alla diluizione 1:4, poste in stufa a 37°C per 30 minuti, disidratate in una soluzione di $CHCl_3$ in toluene per 10 minuti e quindi coperte con DPX.

3.9.3 Colorazione TIMM

Le sezioni coronali sono state montate su di un vetrino e disidratate in forma a 37°C per 30 minuti in condizioni di buio. Ad una soluzione composta in proporzione 60:30:10 da gomma arabica (50mg/100ml), idrochinone (5,67g/100ml) ed tampone citrato (acido citrico 6,375g/25ml e citrato di sodio 5,875g/25ml) sono state aggiunte 0,5ml di nitrato d'argento (1,7gr/100ml). Tale miscela è stata posata sulle sezioni montate sui vetrini e lasciate reagire per 30-60 minuti al buio.

4. RISULTATI

4.1 Modello di ictogenesi acuta sul cervello isolato di cavia in vitro

Il primo gruppo di esperimenti, oggetto di una pubblicazione su *Journal of Neurophysiology* (Carriero et al., 2010) sono stati preceduti dalla caratterizzazione preliminare dei potenziali evocati nella regione olfattoria prevalentemente focalizzata sul tubercolo olfattorio e la corteccia piriforme (Carriero et al., *J. Neurophysiol.* 2009), necessaria per identificare i parametri di stimolazione del tratto laterale olfattorio e la metodica di registrazione con elettrodi multicanale, necessari per definire la preservazione del cervello isolato di cavia.

L'obiettivo di questa parte iniziale dello studio è verificare se il pattern di attività epilettiforme indotta acutamente nel cervello isolato di cavia dipende dalle caratteristiche di network o dal tipo di sostanza utilizzata per indurre l'attività epilettiforme.

4.1.1 Attività epilettiforme indotta dalla somministrazione acuta di 4 aminopiridina

Gli esperimenti effettuati per valutare l'attività indotta dalla perfusione della 4AP nel cervello isolato di cavia sono stati condotti su di un gruppo di 13 cavie.

La dose di 4AP somministrata ($50\mu\text{M}$) è stata usata comunemente negli esperimenti su fettine cerebrali (Avoli, 2002) per indurre attività epilettiforme. La figura 14 mostra i potenziali evocati dalla stimolazione dell' LOT nei diversi punti di registrazione nella corteccia piriforme (PC), nella corteccia entorinale laterale e mediale (l-EC e m-EC) e dall'area CA1 dell'ippocampo. Le risposte ottenute confermano le buone condizioni del preparato.

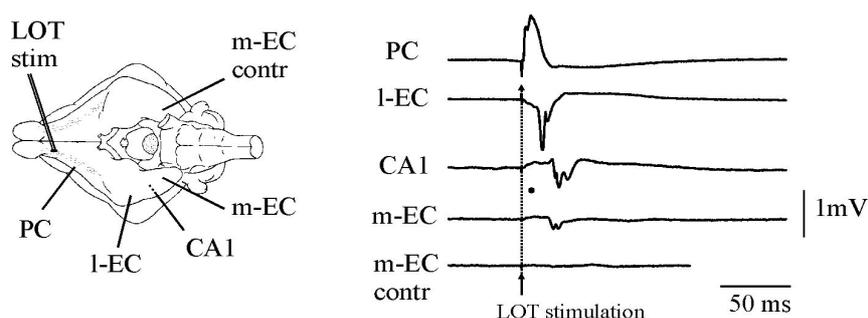


Fig.14 Registrazione dei potenziali di campo evocati dalla stimolazione dell'LOT nella corteccia piriforme (P) nella corteccia entorinale laterale (l-EC) nell'ippocampo (CA1) nella corteccia entorinale mediale (m-EC) e nella corteccia entorinale mediale controlaterale (m-EC contra). A sinistra una rappresentazione del cervello isolato di cavia e la posizione relativa degli elettrodi di registrazione (Carriero et al., 2010)

Nel nostro laboratorio erano state precedentemente analizzate le attività indotte dalla perfusione di bicucullina e pilocarpina in queste stesse strutture (Gnatkovsky et al. 2008; Uva et al. 2005, 2008).

La somministrazione di 4AP induce differenti pattern elettrografici rappresentati nella figura 15.

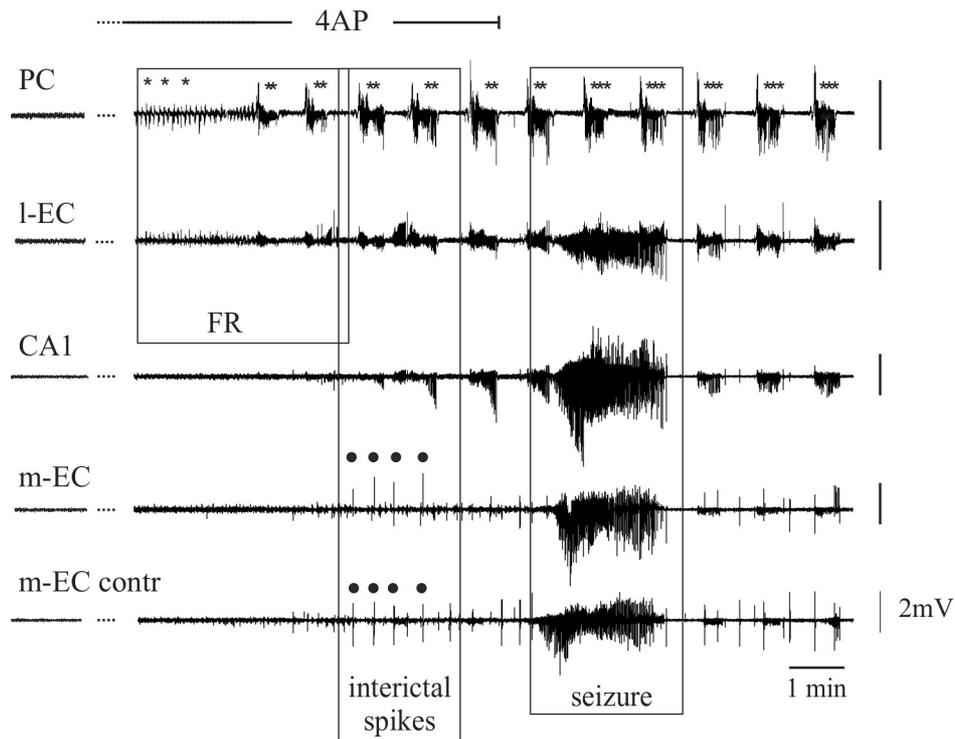


Fig.15 Attività indotte dalla somministrazione sistemica di 4-aminopiridina (4AP, 50 μ M) nel cervello isolato di cavia. Inizialmente compaiono in PC i FR di breve durata (e-FR, *) seguiti dai FR tardivi (FR, **). Questi ultimi, a differenza dei e-FR, propagano in CA1 e l-EC. Successivamente nelle m-EC c o m Da notare che la crisi propaga nell'emisfero controlaterale e che i FRs in PC si presentano anche durante l'attività ictale (***). Il periodo di perfusione della 4AP è indicato dalla linea posta sopra i traccianti elettrofisiologici (Carriero et al., 2010).

La prima tipologia di attività indotta dalla 4AP è stata osservata dopo 4.5 ± 1.2 min (media \pm SE) dall'arrivo del farmaco nel cervello isolato di cavia. Questa attività, caratterizzata da sequenze di oscillazioni ad alta frequenza di breve durata (1-2 secondi), denominata attività di *fast run* (FR). I primi FR sono stati registrati in PC (n=8), successivamente propagano nella l-EC (n=8), nell'ippocampo (n=5) e, meno frequentemente, nella m-EC (n=4). In 5 dei 13 esperimenti condotti non sono stati registrati FR. I primi FR di breve durata (early FR - eFR) sono evoluti in attività di maggiore complessità sovrainposta ad un lento potenziale che termina con attività di punta sincrona (late FR - l-FR). La registrazione bilaterale della PC (n=2), di CA1 (n=2) e della m-EC (n=3) ha mostrato che i FR sono attività che si sviluppavano indipendentemente nei due emisferi (Fig.16).

Dopo 6.5 ± 4.3 minuti (media \pm SE) dalla perfusione della 4AP compaiono punte interictali nella regioni limbiche di entrambi gli emisferi che includono CA1 (n=4) e la m-EC (n=6). Approssimativamente due minuti dopo la comparsa dell'attività interictale, la 4AP induce delle scariche epilettiformi nelle aree limbiche, ippocampo e corteccia entorinale (n=8).

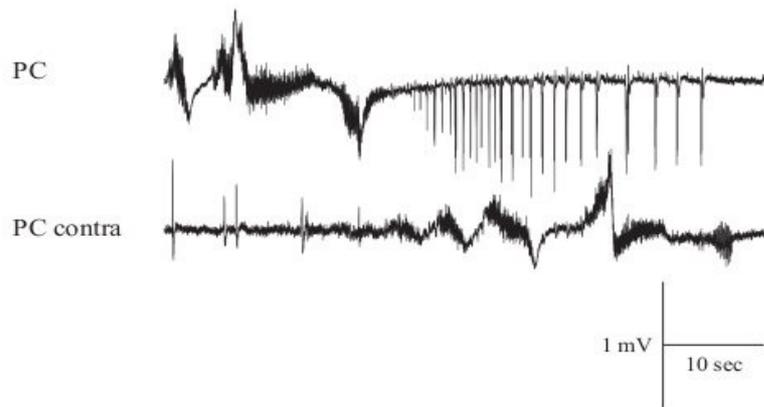


Fig.16 FRs indipendenti registrati in PC e PC controlaterale

I FR osservati nelle strutture olfattorie e le crisi del sistema limbico sono tra loro non correlati e compaiono in tempi differenti dall'inizio della perfusione con 4AP. Sebbene l'attività ictale di norma si presenti successivamente alla comparsa dei FR, in alcuni esperimenti è stata registrata anche in assenza di questi ultimi.

I brevi FR che si evidenziano per primi dopo la somministrazione di 4AP hanno una durata di 1.78 ± 0.51 sec ($n=8$) e ricorrono ogni 1.82 ± 0.49 secondi, mentre quelli che si sviluppano in seguito di maggiore complessità (i l-FR) hanno una durata di 27.95 ± 4.55 secondi con un intervallo di 34.16 ± 6.03 secondi tra un evento e il successivo. In 4 degli 8 esperimenti in cui sono stati registrati FR, l'inizio di questi eventi è stato riscontrato nella corteccia piriforme. Sia gli eFR che i l-FR hanno un'ampiezza maggiore in PC e l-EC, due regioni cerebrali strettamente correlate tra di loro (Haberly & Price 1978; Krettek & Price 1977; Luskin & Price 1983) e funzionalmente indipendenti dalle aree propriamente limbiche, con le quali sono anatomicamente connesse. Il graduale aumento dell'ampiezza dei FR in CA1 e m-EC con il passare del tempo suggerisce che questi eventi propagano dalle strutture olfattorie (PC e l-EC) alle aree caudali limbiche solo quando la loro intensità e la sincronizzazione aumentano. Come mostrato in figura 15 i FR continuano ad essere registrati in PC indipendentemente dalla comparsa in CA1 e m-EC dell'attività ictale. In 5 degli 8 esperimenti le caratteristiche generali e la frequenza di occorrenza dei FR non sono alterati dalla comparsa degli eventi epilettiformi asincroni nelle corteccie limbiche. In 3 esperimenti i FRscompaiono durante le crisi elettrografiche in CA1 e m-EC. L'analisi dello spettro delle frequenze che compongono sia gli eFR che i l-FR evidenzia come la componente principale di queste attività oscillatoria, compresa tra i 20 e 40Hz (attività beta-gamma) sia presente in tutti i siti di registrazione. Nei FR complessi la principale frequenza di oscillazione, con il passare del tempo, si sposta verso valori più alti intorno a 40-60Hz. I FR di tardiva comparsa sono sovrainposti ad una onda lenta e terminano con una sequenza di eventi ipersincroni alla frequenza

di 4-8Hz (Fig.17) chiaramente epilettiformi. Per valutare se durante la transizione dalla fase degli

Fig.17 In A le registrazioni dei primi brevi FR (eFR,*) e dei FR tardivi (l-FR,**) indotti in PC, l-EC, CA1, m-EC dalla somministrazione di 4AP. In entrambi i casi i Frs dalla PC propagano alla m-EC. In B un'espansione dei Frs e l'analisi delle frequenze. Da notare che la frequenza principale che caratterizza gli eFR è circa 20Hz, mentre, il picco di frequenza dei l-FR raggiunge valori più alti di 30Hz. In C la media ottenuta da 6 analisi delle frequenze in PC

eFR ai l-FR ci fosse un progressivo aumento di sincronizzazione tra le diverse strutture, abbiamo condotto l'analisi della correlazione prendendo in considerazione tutte le possibili coppie di elettrodi registranti (PC/l-EC, PC/CA1, PC/m-EC, l-EC/CA1, l-EC/m-EC, CA1/m-EC). L'analisi del coefficiente di correlazione (r) è rappresentato in figura 18. I dati sono presentati come quadrato di r (r^2). Le media di r^2 calcolate durante gli eFR, per tutte le possibili coppie di punti di registrazione, mostrano un significativo incremento rispetto alla condizione pre-4AP ($p < 0.05$). In tutte le coppie di segnali con l'esclusione delle registrazioni PC/CA1 i valori della correlazione aumentano ulteriormente durante i l-FR che precedono l'insorgenza delle crisi ($n=4$). Da notare inoltre che dopo la crisi i valori della correlazione diminuiscono, senza tornare ad un livello precritico, anche se non in maniera significativa, in tutte le accoppiate escluso PC/CA1.

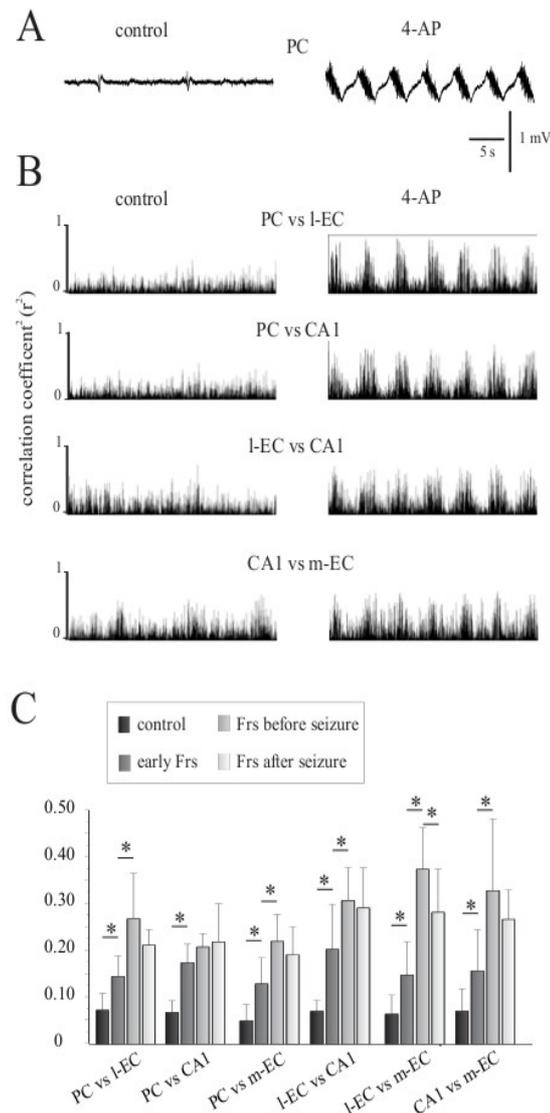


Fig.18 Analisi della correlazione dei FRs tra le diverse strutture. In A le registrazioni extracellulari dell'attività in PC prima dell'inizio dei FR (control) e dopo la loro comparsa indotta dalla 4AP. In B la rappresentazione del quadrato coefficiente di correlazione (r^2) della PC vs. I-EC, PC vs. CA1, I-EC vs. CA1 e CA1 vs. m-EC valutato in una finestra temporale di 30 secondi. Da notare l'incremento di r^2 con la comparsa dei FRs. In C l'istogramma dei valori di r^2 durante il periodo di controllo (in nero), degli e-FRs (in grigio scuro), degli I-FRs prima delle crisi (in grigio), e dopo la comparsa delle crisi (in bianco). Si nota un incremento di r^2 in tutte le possibili accoppiature dalla fase controllo alla comparsa dei I-FR (Carriero et al., 2010).

Le caratteristiche attività di punta presenti alla fine dei I-FR hanno come struttura di origine la PC. Da qui propagano in I-EC (12.59 ± 8.79 msec), CA1 (30.5 ± 8.93 msec) and m-EC (34.3 ± 7.29 msec) come mostrato nella figura 19. Diversamente, le attività interictali che si presentano sia in ippocampo che in m-EC 6.5 ± 4.3 min dopo l'inizio della somministrazione di 4AP, propagano bilateralmente esclusivamente all'interno dell'area ippocampale e paraippocampale, senza coinvolgere la PC e le aree più propriamente olfattorie. Le spikes interictali limbiche sono quindi eventi indipendenti dai FR e le loro caratteristiche morfologiche e di propagazione ricordano i potenziali pre-ictali GABA-mediati precedentemente descritti in fettine di cervello di roditori e nel

cervello isolato di cavia durante la somministrazione di 4AP (Perreault & Avoli 1992; Uva et al. 2009) e in quest'ultimo preparato durante la transitoria disinibizione indotta da una breve perfusione con bicucullina (Gnatkovsky et al., 2008).

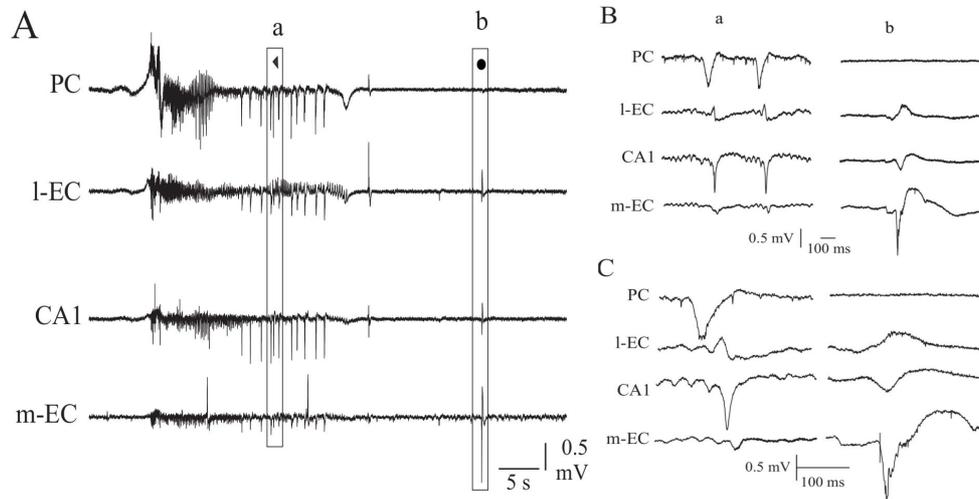


Fig.19 I Frs tardivi terminano con delle attività di punta (a). Queste originano in PC e propagano nella l-EC in CA1 e in m-EC. Contrariamente la preictal spike (b) originano in m-EC e propagano in CA1 e l-EC senza la PC. In B e C delle spansioni delle spike presenti alla fine dei FRs e delle preictal spike (Carriero et al., 2010)

Le attività di punta interictali in ippocampo si organizzano in eventi sempre più complessi che evolvono infine in una scarica epilettica ictale. L'esordio dell'attività critica nella corteccia limbica è caratterizzato dalla scomparsa dei FR in m-EC e in CA1, ma non in l-EC e in PC. Nelle prime fasi della scarica epilettiforme si evidenzia un segnale elettrografico ad alta frequenza (10-60Hz) che può avere inizio in ippocampo (n=6) o in m-EC (n=2) e successivamente propaga bilateralmente nelle strutture paraippocampali e nell'ippocampo (n=8). L'attività ictale presente in queste strutture non interessa la PC, dove permangono i FR. L'attività ictale prosegue con punte irregolari di ampio voltaggio che progressivamente si organizzano in gruppi separati da brevi intervalli. Durante la fase finale della crisi gli intervalli tra i gruppi di punte diventano sempre più lunghi fino alla comparsa di una depressione post-ictale che indica la fine della crisi. L'attività critica, indipendentemente dalla sua area di origine, termina contemporaneamente in tutti i punti in cui si è presentata (Fig.20).

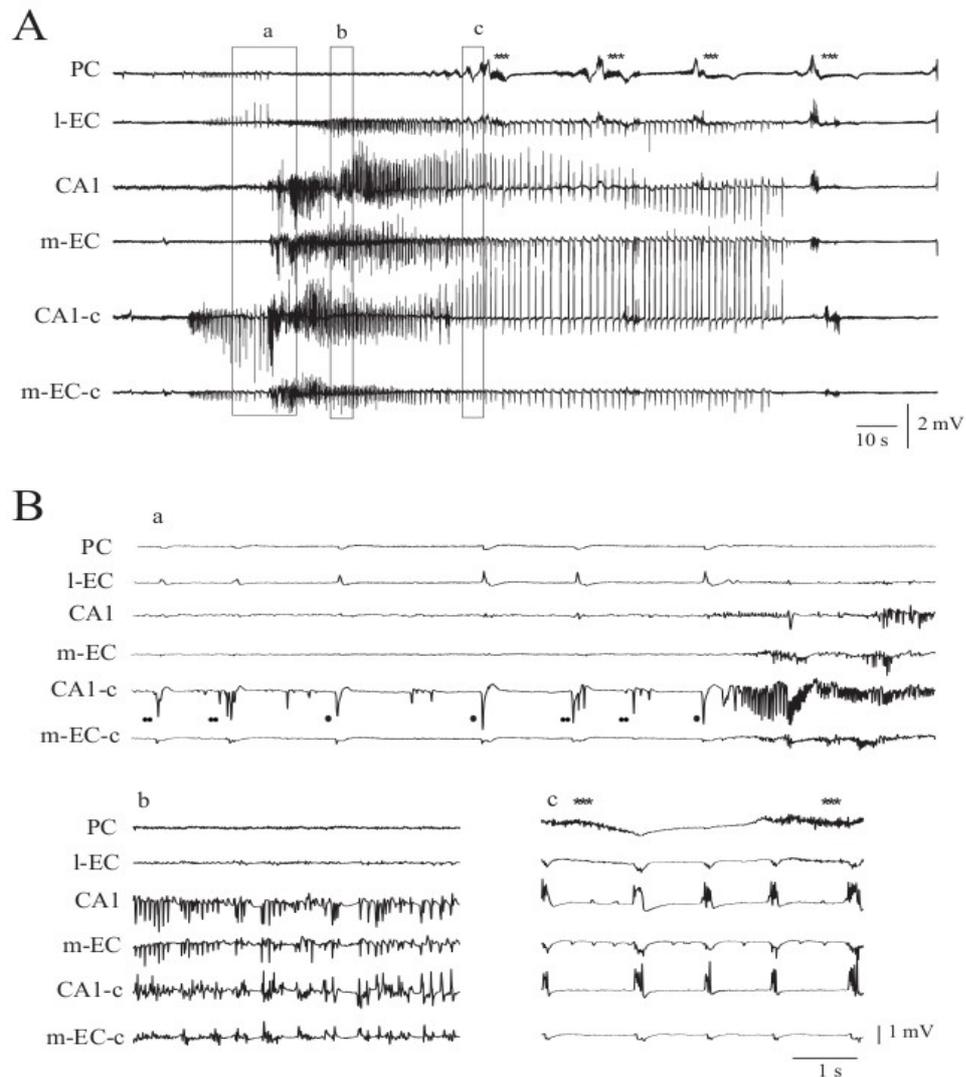


Fig.20 Attività epilettiforme indotta dalla 4AP nel cervello isolato di cavia. In A è riportata l'intera sequenza di eventiepilettiformi registrati nelle struttureolfattorie e limbiche. In B le espansioni delle sezioni indicate in A. Da notare in a che le spike preictali sono registrate in nell'emisfero controlaterale (CA1-c and m-EC-c). Alcuni di questi eventi ricordano i potenziali interictali GABAergici (●) evidenziati dalla coperfusione della 4AP con antagonisti del recettore del glutammato riportati in precedenti lavori. Dopo la comparsa delle spike GABA mediate (●) e delle preictal spike complesse (● ●) compare l'attività rapida che non viene registrata delle aree olfattorie. Successivamente (b) si presentano eventi di punte irregolari. In fine (c) appare l'attività ipersincrona. Da notare in c anche la comparsa di FRs in PC durante l'attività ipersincrona (***)

4.1.2 Caratteristiche farmacologiche dell'attività epilettiforme acuta indotta dalla 4AP

Per valutare il coinvolgimento dei recettori per il glutammato nella generazione dell'attività epilettiforme indotta dalla 4AP, abbiamo co-perfuso in esperimenti differenti la 4AP insieme a bloccanti del recettore NMDA (AP5, 100 μ M 30min) e del recettore non NMDA (CNQX, 50 μ M 30min); la perfusione di questi bloccanti dei recettori glutammatergici è stata iniziata 30 minuti prima dell'inizio della perfusione con 4AP. Come mostrato in figura 21, il blocco del recettore NMDA non influenza l'insorgenza delle crisi (n=4 di 5). Questo trattamento, per di più, non altera la comparsa dei FR nella corteccia olfattoria, n blocca gli eventi intercritici in CA1, m-EC e l-EC

(Fig.19). Quale unico effetto, la coperfusione di AP5 e 4AP induce un ritardo nella comparsa degli eventi critici rispetto ai preparati in cui veniva perfusa esclusivamente la 4AP. Questi valori sono aumentati da una media di 8min (8.1 ± 1.17 min) ad una di 25min (25 ± 4.97 min). Inoltre, la durata degli eventi critici aumenta da 1.91 ± 1.3 min negli esperimenti in cui veniva perfusa solo 4AP, ad una durata di 3.1 ± 1.1 min negli esperimenti di coperfusione con l'AP5. L'azione dell'AP5 sull'attività critica, inoltre, induce un'alterazione delle proprietà di propagazione che comporta la comparsa delle crisi anche nella corteccia piriforme. Anche l'ampiezza delle punte intercritiche risente dell'effetto della AP5. Infatti, l'ampiezza media del valore di 1.3mV (1.3 ± 0.48 mV) durante la somministrazione di 4AP con la coperfusione di 4AP+AP5, ha subito un incremento portandosi a valori pari a 3.74 (3.74 ± 1.72 mV, Fig.20).

La prolungata co-somministrazione (più di 60min) degli antagonisti del recettore AMPA (CNQX: 50 μ M, n=2 o DNQX: 50 μ M, n=2) insieme alla 4AP ha completamente abolito l'insorgenza dell'attività critica nel sistema limbico, ma non la comparsa degli eventi interictali. La coperfusione di CNQX o DNQX ha influenzato i FR diminuendone la durata e l'ampiezza (Fig.21).

Nella figura 22 sono riportate le medie i) delle misura di ampiezza e di durata dei l-FR registrati in PC, ii) del tempo trascorso tra l'inizio della perfusione con la 4AP e la comparsa delle crisi, iii) della durata delle crisi e iv) dell'ampiezza della spike interictale e della durata dell'onda lenta che segue la spike in CA1. sono indicati in questa tabella i valori medi registrati in condizioni di controllo (solo 4AP) ed in presenza dei bloccanti dei canali NMDA e non NMDA (4AP+AP5; 4AP+CNQX o 4AP+DNQX).

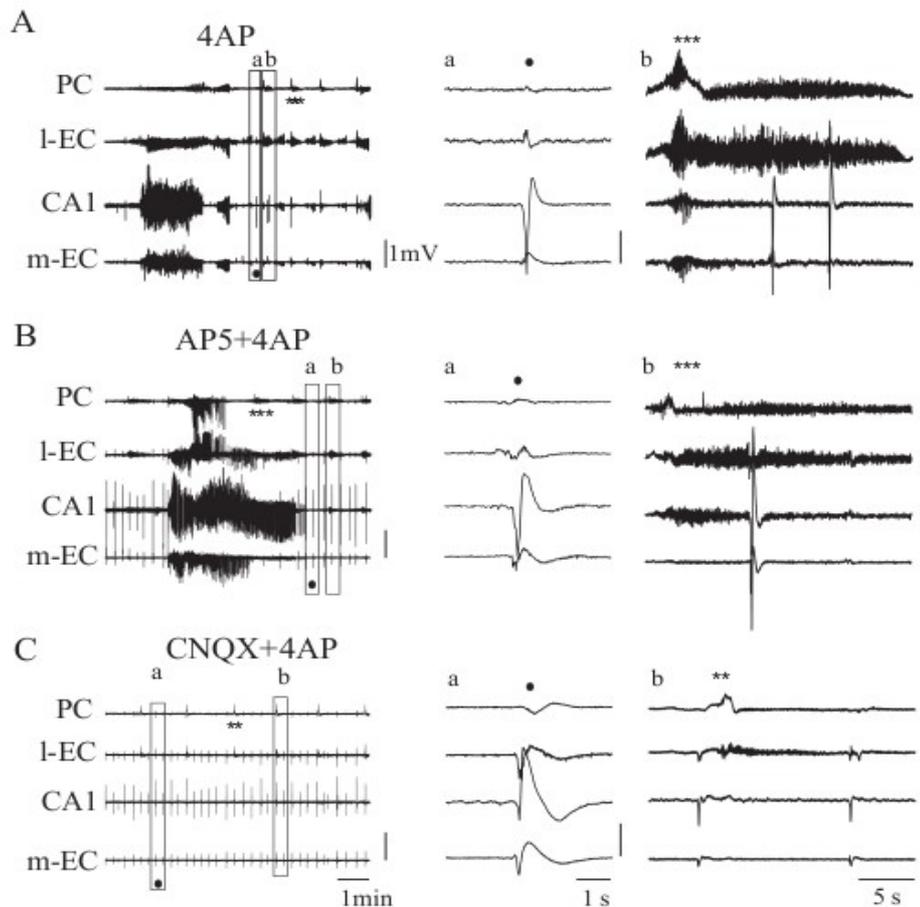


Fig.21 Attività indotta dalla perfusione di 4AP (A), dalla coperfusione di 4AP e AP5 (B) e 4AP con CNQX (C) nel cervello isolato di cavia. In B si osserva un aumento della durata dell'attività critica che compare anche in PC. In C si nota la mancanza dell'attività critica. Mentre, sono presenti dei Frs di basso voltaggio e le punte interictali. a e b rappresentano espansioni delle sezioni in A,B e C (**, FR tardivi; ***, FRs durante e dopo le crisi; ●, punte intercritiche).

Sia la 4AP che pilocarpina e bicucullina (Uva et al., 2005; 2008) inducono pattern simili che quindi molto probabilmente **non** sono dipendenti dalla sostanza epilettogena, ma rivelano le capacità auto organizzanti del network olfattorio e ippocampo-paraippocampale per la generazione di patterns critici stereotipati e regione-specifici. Questo pattern critico è caratterizzato da un'attività rapida in banda beta-gamma all'inizio della crisi che persiste per 2-5 secondi, seguita dall'attivazione di un firing irregolare, che progressivamente tende a sincronizzare in bursts di spikes progressivamente più ampie e sincrone. Tale attività persiste per decine di secondi ed è seguita da una depressione post-critica.

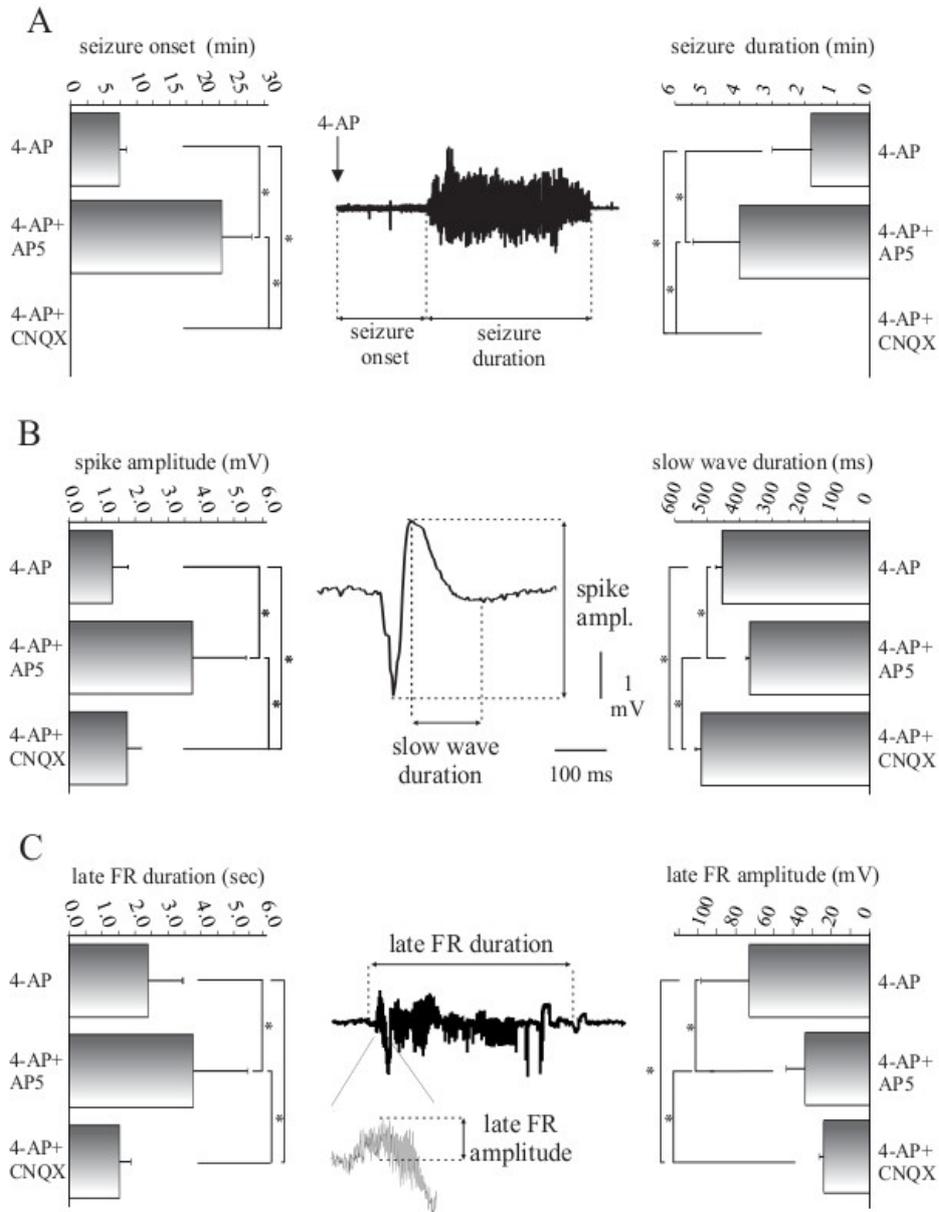


Fig.22 A: Tempo di esordio delle crisi e loro durata registrate in CA1. La coperfusione di 4AP e AP5 induce un aumento statisticamente significativo sia del tempo di esordio che della durata delle crisi, mentre la coperfusione di 4AP con CNQX inibisce completamente l'insorgere delle crisi. B: Durata e ampiezza delle punte interictali registrate in CA1. La co-perfusione di 4AP con AP5 o CNQX induce, rispettivamente, una diminuzione ed un aumento della durate degli eventi interictali rispetto alla sola perfusione di 4AP. L'ampiezza del picco in entrambi i casi di co-perfusione è aumentata ($P < 0.05$). C: Durata ed ampiezza degli I-FR registrati in PC. La co-perfusione di 4AP con AP5 induce un aumento della durata ed una diminuzione dell'ampiezza statisticamente significativi dei I-FR. Contrariamente la co-perfusione di 4AP con CNQX induce una diminuzione statisticamente significativa dell'ampiezza e della durata e dei FR.

4.2 Modello cronico di epilessia del lobo temporale

Gli esperimenti condotti sul modello acuto dimostrano che l'attività epilettiforme si manifesta in modo riproducibile nelle medesime strutture, indipendentemente dalla sostanza pro-epilettica utilizzata. Questo pattern correla con le caratteristiche della scarica epilettica osservata durante registrazioni intracraniche dal lobo temporale di pazienti con epilessia focale farmaco resistente (Gotman et al., 1991; Bartolomei et al., 2004; Wendling et al., 2009). Il pattern critico è caratterizzato da attività rapida all'inizio della crisi, seguito da firing irregolare, e successivamente da bursts di spikes.

In un secondo gruppo di esperimenti abbiamo verificato l'ipotesi che la sequenza tipica definita qui sopra possa verificarsi anche in un modello cronico di epilessia del lobo temporale, nel quale dopo una fase iniziale di stato epilettico le crisi si manifestano in modo spontaneo e non farmacologicamente indotto. Dopo diversi tentativi non riusciti con protocolli che prevedono l'iniezione di pilocarpina intraperitoneale o la co-iniezione di pentilentetrazolo e il lipopolisaccaride per l'induzione del modello cronico, abbiamo utilizzato il protocollo dell'iniezione intra-ippocampale di acido kainico (AK - vedi Metodi).

4.2.1 Localizzazione del punto di iniezione intra-ippocampale dell'acido kainico

L'utilizzo della risonanza magnetica ci ha permesso di identificare le coordinate stereotassiche da utilizzare per poter raggiungere l'ippocampo dorsale con l'ago-cannula utilizzata per iniettare l'AK. Come mostra la figura 23, le immagini T2 pesate evidenziano il passaggio dell'ago-cannula attraverso la corteccia caratterizzato da un segnale ipointenso. Questi controlli indicano che le corrette coordinate stereotassiche per iniettare nell'ippocampo dorsale l'acido kainico sono: -7mm antero-posteriore; ± 3.5 mm medio-lateralmente e -4.5mm dorso-ventrale (punto di riferimento lambda).

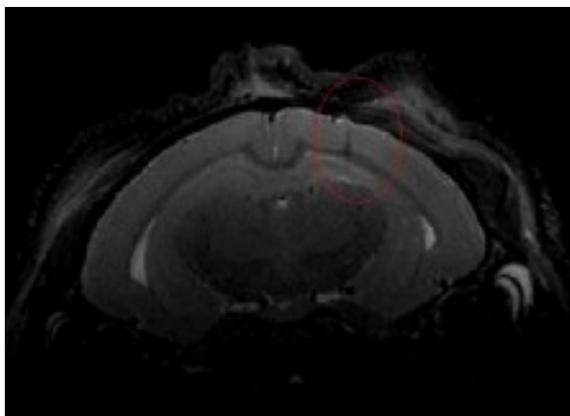


Fig.23 Immagine di risonanza magnetica pesata in T2. Il passaggio dell'ago-cannula induce un danno evidenziabile dal segnale ipointenso in T2.

4.2.2 Valutazione dose-risposta nella somministrazione di acido kainico

Data la mancanza di una letteratura sulla dose-risposta indotta dalla somministrazione di acido kainico intraippocampale nella cavia abbiamo ritenuto importante studiare l'effetto dell'AK a diverse dosi prima di decidere quale concentrazione utilizzare per la creazione del modello cronico.

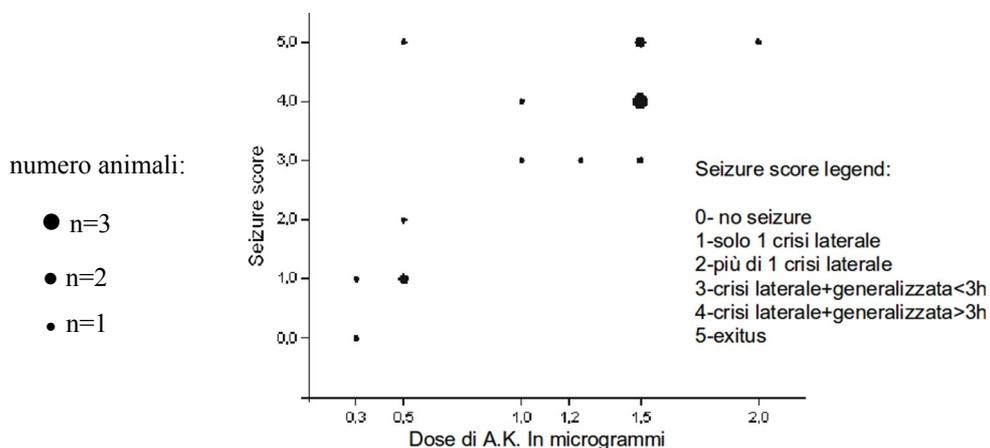


Fig.24 Grafico dose-gravità delle crisi. Dal grafico si nota come l'incremento della dose iniettata nell'ippocampo di cavia sotto anestesia corrisponda ad un aumento della gravità delle crisi al risveglio degli animali.

La somministrazione unilaterale di basse dosi di AK nell'ippocampo evidenzia, anche a basse concentrazioni, la comparsa di comportamenti riconducibili ad una lateralizzazione di esordio delle crisi. I fenomeni comportamentali più riproducibili sono i) le clonie della zampa anteriore contro laterale all'emisfero iniettato, ii) un comportamento esplorativo durante il quale l'animale percorre il perimetro della gabbia in senso antiorario e iii) la torsione del collo in direzione controlaterale rispetto all'iniezione associato a stereotipie oro-mandibolari (n=4 di 16). Aumentando la dose di AK le crisi hanno sempre un esordio lateralizzato e successivamente evolvono dando luogo a comportamenti riconducibili ad una generalizzazione della scarica epilettica (n=7 di 16). In questa situazione l'animale ha un'attività di tipo tonico clonica generalizzata associata spesso a perdita posturale e pedage dei quattro arti. Successivamente la cavia può andare incontro al decesso (n=4 di 16) associato, probabilmente, ad una crisi respiratoria, oppure riprendere la postura e dopo un breve periodo postcritico ritornare ad un comportamento normale. Prendendo come spunto la classificazione delle crisi nel ratto descritta da Racine (Racine, 1972), abbiamo definito una scala di gravità delle crisi secondo i parametri e la durata dei fenomeni critici comportamentali osservati. Abbiamo definito 5 stadi di gravità delle crisi che sono dettagliati nella legenda della figura 24. Quindi, in base alla tipologia più grave di comportamento espressa dall'animale ed alla durata del comportamento stesso abbiamo attribuito un punteggio in modo da costruire il grafico dose risposta rappresentato in figura 24.

A partire dal giorno seguente al trattamento, gli animali sopravvissuti sono stati videoregistrati ogni

2 giorni per 48ore consecutive (giorno e notte) per un periodo non inferiore ai 3 mesi. La visione dei video non ha evidenziato nessun comportamento anomalo delle cavie durante la fase conseguente alle crisi acute.

4.2.3 Risonanza magnetica ed immunoistochimica

La valutazione del danno dovuto alla somministrazione intraippocampale di AK ed alle crisi epilettiche indotte è stata effettuata sfruttando tecniche di risonanza magnetica nucleare, colorazioni istologiche e reazioni di immunoistochimica. Le reazioni di immunoistochimica sono state utilizzate anche per evidenziare la presenza di un eventuale processo di gliosi, mediante l'utilizzo di anticorpi anti-GFAP. La colorazione TIMM ci ha permesso di osservare lo sprouting neuronale degli assoni del giro dentato dell'ippocampo che spesso accompagna l'ippocampo sclerotico in pazienti epilettici (Maglóczy et al., 2010; Babb et al., 1996), mentre la colorazione con tionina ha mostrato le alterazioni strutturali a carico di diverse aree dell'ippocampo. La risonanza magnetica è stata effettuata su 7 animali. Di questi uno ha avuto crisi pari al livello 2, quattro cavie hanno raggiunto il livello 3 e due il livello 4. Le analisi di RM sono state effettuate due mesi dopo l'iniezione di AK. Gli animali che hanno sviluppato crisi epilettiche fino al raggiungimento del livello 3 e 4 nelle immagini di RM dimostrano una alterazione strutturale dell'ippocampo. Questa è caratterizzata dalla riduzione del segnale in T2, in particolare della regione di CA1 ipsilaterale all'iniezione. Il danno è evidente non solo nelle aree proprie nell'iniezione ma anche nelle zone limitrofe (Fig.25).

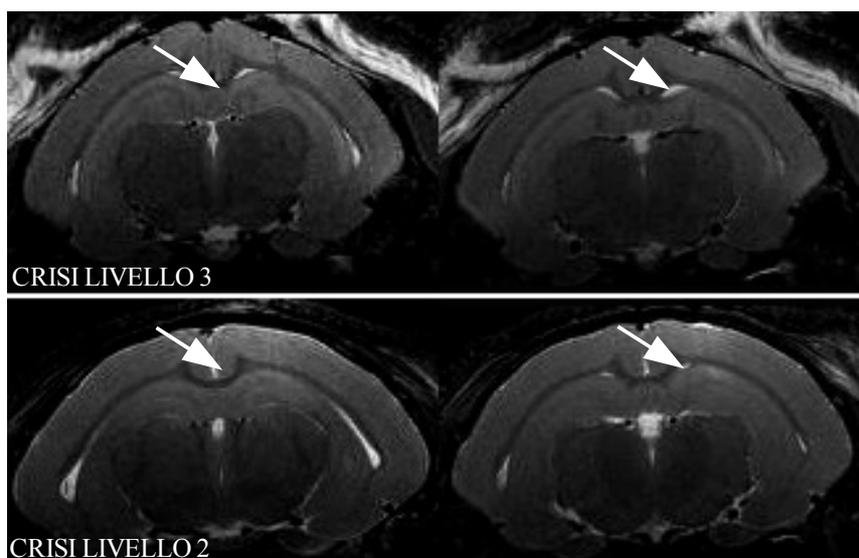


Fig.25 Immagine T2 pesata. Da notare l'alterazione strutturale in CA1 (freccia) nell'immagine della cavia con esperienza di crisi generalizzate per meno di 3 ore (crisi livello 3). Tale alterazione non è presente nella cavia che ha sviluppato solo crisi parziali (crisi livello 2)

Come mostrato in figura 25 l'unico animale che ha raggiunto il livello 2 nella scala delle crisi non mostra alterazioni RM. Le alterazioni individuate con la RM sono state confermate dalla colorazione istologica tionina. Negli animali che hanno sviluppato crisi di livello 3 e 4 si osserva l'assenza dello strato piramidale in CA1 associato ad un depauperamento neuronale nell'ilo del giro dentato. Sebbene le alterazioni osservate nei due gruppi di animali siano paragonabili nell'emisfero ipsilaterale alla iniezione di AK, è solo negli animali appartenenti al gruppo che hanno avuto crisi generalizzate per più di 3 ore (livello 4) che si osservano alterazioni in CA1 nell'emisfero controlaterale. Nessuna alterazione è stata riscontrata in animali che hanno mostrato esclusivamente crisi lateralizzate (livello 1 e 2). La colorazione TIMM ha mostrato un'evidente alterazione interpretabile come una neo arborizzazione assonica delle cellule dell'ilo nello strato molecolare esterno del giro dentato nell'emisfero ipsilaterale. Nell'emisfero controlaterale si riscontra un'aberrante sprouting neuronale, anche se di entità minore rispetto all'ippocampo dell'emisfero trattato, solo negli animali che hanno raggiunto il livello 4. La reazione immunostochimica anti-GFAP mette in luce una intensa gliosi nell'area ippocampale di CA1 e nell'ilo del giro dentato, nella regione che mostra alterazioni con la metodica di TIMM (Fig.26).

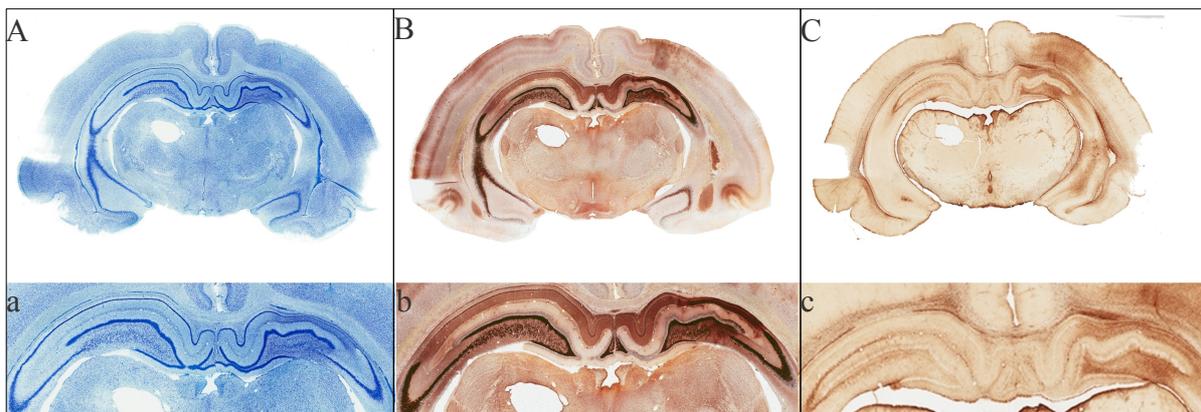


Fig.26 Colorazione tionina (A), TIMM (B) ed immunostochimica per GFAP(C) in una cavia che ha avuto crisi comportamentali di livello 3. In a, b e c un'espansione dell'area ippocampale di A, B e C. Da notare le alterazioni strutturali, evidenziate sia con la colorazione tionina che TIMM, nell'ippocampo ipsilaterale all'iniezione di AK (CA1 destro). L'incremento di positività per GFAP nell'ippocampo trattato indica una presenza di gliosi.

4.2.4 Registrazione video-EEG durante l'iniezione intraippocampale di AK nell'animale libero di muoversi

I principali problemi associati alla preparazione del modello sperimentale riguardano la preparazione dell'impianto. In alcuni casi le componenti chimiche del cemento utilizzato per stabilizzare il pedestal penetrano in prossimità degli elettrodi o nella cannula guida per l'iniezione, rendendo impossibile il posizionamento del connettore complementare al pedestal o la cannula di iniezione.

Introducendo la cannula di somministrazione attraverso la cannula guida e quindi nella corteccia fino a raggiungere l'ippocampo si può assistere alla comparsa di un'attività epilettiforme nell'ippocampo probabilmente dovuta allo stress meccanico della penetrazione dell'elettrodo. Questo tipo di attività è stata registrata indipendentemente dalla presenza nella siringa di iniezione di AK (2 su 4) o di soluzione fisiologica (1 su 2).

La somministrazione di AK unilaterale nell'ippocampo di cavia ($1\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ in 2 min) è associata alla comparsa di evidenti crisi elettrografiche senza indurre, in una prima fase, manifestazioni clinico-comportamentali evidenti o comunque ascrivibili ad un comportamento dichiaratamente epilettico (4 su 4). Infatti le cavie trattate esprimono un comportamento esplorativo difficilmente distinguibile dalla normale attività esplorativa della cavia oppure restano immobili in un angolo della gabbia (comportamento di *freezing*) come spesso accade negli animali non trattati. La prima crisi elettrica spontanea è stata registrata in media dopo 40 minuti dalla fine della somministrazione di AK. Successivamente gli eventi ictali si susseguono ad intervalli di $4,24\pm 1,81\text{min}$ (media \pm DS) con una durata di $67,27\pm 20,80$ secondi. Le ultime crisi spontanea sono state registrate in media dopo 6/7 ore. Negli animali in cui viene iniettata soluzione fisiologica, dopo l'eventuale comparsa dell'attività dovuta al passaggio dell'ago-cannula, non si registrano ulteriori eventi. Il pattern elettrofisiologico delle crisi è caratterizzato dalla presenza di una attività rapida all'esordio seguito da una attività di punta ampie che, successivamente, si organizzano in gruppi di scariche per poi terminare improvvisamente (Fig.27). Questi dati confermano che esiste un pattern tipico regione-

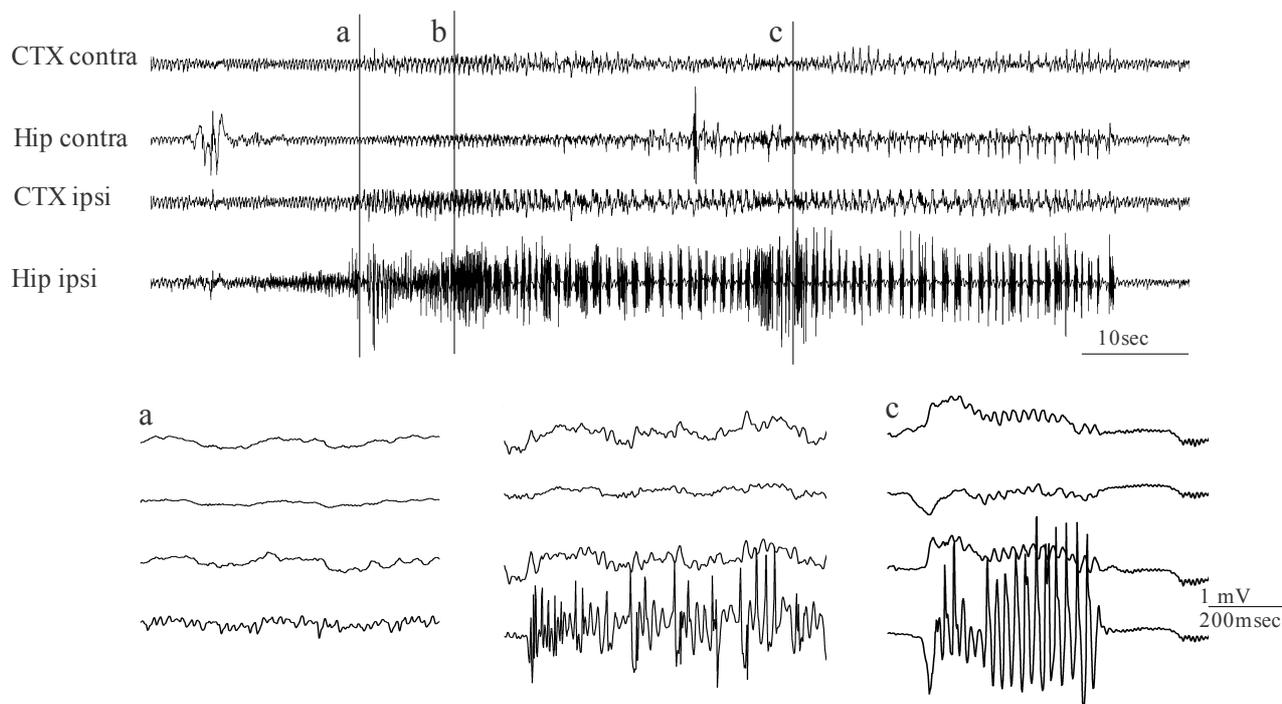


Fig.27 In alto la sequenza completa dell'attività indotta dalla somministrazione di AK intraippocampo nei diversi punti di registrazione. In basso le espansioni: a, corrispondente all'inizio della crisi con l'attività ad alta frequenza registrata solo in ippocampo ipsilaterale all'iniezione; b, mostra l'attività di scarica irregolare; c, mostra l'attività di burst registrabile della fase terminale della crisi

specifico nell'ippocampo indotto dall'AK, che è sovrapponibile all'attività osservata dopo perfusione di 4AP (e di bicucullina e pilocarpina; Uva et al., 2005; 2008) nel cervello di cavia isolato in vitro.

L'inizio dell'attività critica è stato osservato nell'ippocampo trattato o contemporaneamente nei due ippocampi e da qui la scarica epilettica diffonde alle relative cortece. In alcuni casi la crisi ha interessato esclusivamente l'emisfero ipsilaterale o addirittura il solo ippocampo trattato. Il periodo intercritico è caratterizzato da una intensa attività di punta dell'ippocampo ipsilaterale.

4.2.5 Video-EEG nella fase cronica

I tracciati elettrografici ottenuti nel periodo sub-acuto, cioè nei primi 5 giorni dopo l'iniezione di AK, hanno mostrato la presenza di attività epilettiforme intercritica in tutti gli animali trattati (4 su 4). In due cavie è stata registrata un'attività ictale un giorno seguente il trattamento. In una di queste è stata osservata una crisi elettrografica anche il terzo giorni dopo l'iniezione di AK. Dal punto di vista comportamentale in un caso la cavia dormiva e negli altri due era immobile. Nei mesi successivi, in tutti gli animali trattati la video-eeg ha messo in evidenza la presenza di eventi intercritici, caratterizzati da punte e punte-onda, sia nell'ippocampo che nella neocorteccia ipsilaterale all'iniezione di AK. Queste attività non correlano con comportamenti anomali evidenti. In una cavia dopo 70 giorni è stata registrata una crisi elettrografica con un chiaro esordio nell'ippocampo trattato. La crisi è stata preceduta da gruppi di punte precritiche proprio in questa struttura. I gruppi di punta precritici sono stati seguiti da un'attività ad alta frequenza registrata in tutti i punti di registrazione. Immediatamente dopo, come per le crisi registrate in acuto, sono state osservate un'attività di punte irregolari ed in fine gruppi regolari di scariche (Fig.28). Quest'unica crisi registrata conferma la presenza di un pattern critico simile a quello osservato nell'uomo con TLE e nel modello acuto su cervello di cavia isolato.

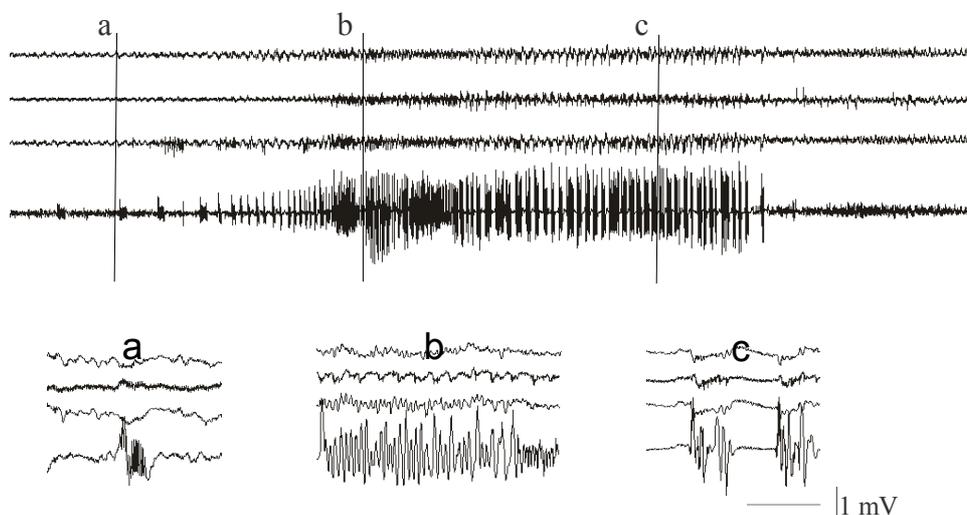


Fig.28 Registrazione elettrofisiologica della crisi nell'animale cronico. In basso le espansioni a, b e c mostrano rispettivamente l'attività preictale ad alta frequenza registrata in ippocampo, l'attività ad alta frequenza all'onset della crisi e i caratteristici gruppi di punte sincrone nella fase finale delle crisi.

5. DISCUSSIONE

Il lavoro qui descritto è organizzato in due parti principali. In una prima parte è stato caratterizzato il pattern critico indotto acutamente dalla 4AP (pubblicato in Carriero et al., 2010). Questa valutazione è stata preceduta dalla verifica della preservazione delle regioni olfattorie nel preparato di cervello isolato (pubblicato in Carriero et al., 2009). La seconda fase dello studio è stata indirizzata allo sviluppo di un modello cronico di epilessia del lobo temporale (pubblicazione in progress).

Modello acuto. La somministrazione per via arteriosa della 4AP nel cervello isolato di cavia induce la comparsa di un caratteristico pattern di attività epilettiforme nella regione ippocampale-paraippocampale. L'attività epilettiforme in questa regione è caratterizzata da punte intrecciate e da crisi epilettiche elettrografiche. Nella regione olfattoria la 4AP ha indotto alterazioni epilettiformi differenti caratterizzate da FR prolungati asincroni rispetto all'attività epilettiforme del lobo temporale. Gli eventi descritti originano in strutture differenti e sembrano essere tra di loro indipendenti. Infatti, sebbene la sequenza temporale degli eventi sia riproducibile in alcuni esperimenti non è stata rispettata. La comparsa di una particolare attività non implica forzatamente la presenza delle altre, rafforzando l'idea che i due sistemi corticali e i pattern di sincronizzazione sostenuti dai rispettivi network intrinseci sono separati e indipendenti.

L'aumento dell'eccitabilità indotta dal ripetersi degli eventi epilettiformi, quali i FR, potrebbe essere alla base della propagazione dei FR stessi in strutture, dove normalmente l'interazione sinaptica è debole (Librizzi et al., 2003).

Le caratteristiche dei FR evolvono con il passare del tempo. Infatti, i primi FR, si presentano come ampie oscillazioni con frequenze comprese tra 20 e 40Hz della durata di 1-2secondi. Successivamente, nei I-FR la durata e la complessità di questi eventi aumenta. Le oscillazioni ad alta frequenza sono sovrainposte ad un lento potenziale al termine del quale si registrano ampi potenziali di campo. Lo spettro di frequenza delle oscillazioni rapide evidenzia dei picchi a 40 e 60Hz. Analizzando il grado di correlazione tra tutte le possibili combinazioni dei punti di registrazione durante i FR abbiamo osservato un aumento del valore medio di r^2 (r =coefficiente di correlazione²) in tutte le possibili coppie di elettrodi. Questo suggerisce quindi un aumento della sincronizzazione lungo l'asse olfattorio- limbico. Il progressivo aumento della correlazione tra strutture corticali potrebbe essere dovuto o a meccanismi di plasticità sinaptica che avvengono durante l'evolversi dei FR o ad un progressivo rinforzo delle interconnessioni sinaptiche mediato dall'intensificazione dell'effetto esercitato dalla 4AP sul rilascio di neurotransmettitori (Thesleff 1980; Perreault & Avoli 1991).

Gli e-FR indotti dalla perfusione di 4AP nel cervello isolato di cavia mimano le oscillazioni evocate

nel sistema olfattorio da uno stimolo odoroso. Sono state descritte oscillazioni evocate da odori nella banda beta a 10 e 20Hz in animali sotto effetto di anestesia (Boeijinga & Van Groen 1984; Bressler & Freeman 1980; Ketchum & Haberly 1993; Neville & Haberly 2003) e nella corteccia piriforme in esperimenti di cervello isolato di cavia dove era stato preservato l'epitelio olfattorio (Ishikawa et al., 2006). Uno di questi studi ha mostrato il progressivo aumento della frequenza delle oscillazioni nella banda gamma (50-100Hz) e una diminuzione nella banda beta in risposta ad un aumento della concentrazione dello stimolo odoroso (Neville & Haberly 2003). La continua perfusione di 4AP dopo la comparsa dei primi FR potrebbe mimare l'aumento dello stimolo sensoriale e potrebbe spiegare l'aumento di frequenza da un intervallo di 20-40Hz ad uno di 40-60Hz.

Circa due minuti dopo la comparsa dei FR sono state registrate scariche ictali nella regione ippocampo/EC mediale. Durante le scariche epilettiformi limbiche i FR hanno continuato a presentarsi nelle cortecce olfattorie, confermando che queste due attività sono generate da sistemi e network neuronali differenti e separati. Gli eventi ictali nelle strutture limbiche sono preceduti dalla comparsa di punte interictali sia nell'ippocampo che nella corteccia entorinale. Diversamente dagli ampi potenziali osservati alla fine dei I-FR, questi eventi originano in m-EC/CA1 ed eventualmente propagano in l-EC. L'analisi dell'attività di punta preictale ha rivelato delle similitudini con i potenziali GABAergici registrati nelle sezioni di ippocampo e di corteccia di ratto (reviewed by Avoli, et al. 2002) e in precedenti lavoro effettuati sul cervello isolato di cavia (Uva, Avoli, & de Curtis 2009).

Nei nostri laboratori è stato mostrato che la perfusione di 50 μ M di bicucullina nel cervello isolato di cavia induce un'attività epilettiforme nell'ippocampo e nella corteccia entorinale preceduta da eventi di punta precritici. RegISTRAZIONI intracellulari hanno dimostrato che questa attività precritica è associata a potenziali inibitori nelle cellule principali in m-EC ed ad una intensa attivazione degli interneuroni (Gnatkovsky et al. 2008). Questi risultati e l'osservazione delle attività di punta precritiche nel cervello isolato di cavia perfuso con 4AP osservate nel presente studio suggeriscono che l'attività precritica possa essere sostenuta dai circuiti GABAergici, come suggerito da lavori condotti su modelli di crisi epilettica indotta da farmaci nelle strutture limbiche in vitro (Ziburkus et al 2006; Derchansky et al., 2008) e in studi condotti su neuroni del subicolo ottenuti da materiale post-chirurgico prelevato da pazienti epilettici sottoposti a chirurgia delle epilessia (Cohen et al., 2005; Huberfeld et al., 2007).

L'esordio dell'attività ictale è caratterizzato da un'attività ad alta frequenza in ippocampo/m-EC sia nel modello della 4AP (10-60Hz) che nel modello della bicucullina (20-30Hz) e della pilocarpina (Uva et al., 2005; 2008). A questa attività di inizio crisi segue una fase di transizione con ampie punte irregolari che evolvono in gruppi di attività ipersincrona in bursts

Studi precedenti hanno analizzato l'azione di composti farmacologici sull'attività ictale indotta dalla 4AP in sezioni in vitro di neocorteccia e ippocampo di cavai e di ratto. Antagonisti del recettore NMDA sono in grado di abolire l'insorgenza di crisi nelle cavie. Contrariamente, in letteratura sono riportati risultati contrastanti per quanto riguarda gli studi condotti sui ratti. L'aggiunta di AP5, un antagonista del recettore NMDA, nella vaschetta d'incubazione delle *slices* non inibisce l'induzione di attività critica nelle sezioni di ippocampo dorsale, mentre l'utilizzo di sezioni complesse di ippocampo/m-EC mostra che il l'antagonista dei recettori NMDA, CCP, è in grado di bloccare le crisi, ma non le attività di punta interictale. Il CNQX, antagonista dei recettori non NMDA, inibisce la comparsa di tutte le attività epilettiformi indotte dalla 4AP (Avoli *et al.* 1996). Infine, esperimenti condotti su sezioni ottenute da giovani roditori mostrano che gli antagonisti dei recettori NMDA non son in grado di agire sulla comparsa degli eventi critici.

Le crisi epilettiche nel preparato del cervello isolato di cavia vengono inibite dalla co-perfusione di 4AP con il CNQX, mentre l'utilizzo di AP5 non solo non influenza lo scatenarsi dell'evento ictale ma ne prolunga la durata e ne favorisce la propagazione della PC. Quest'ultimo effetto è probabilmente legato al prolungamento della crisi che potrebbe rinforzare il circuito ictogenetico inducendo una facilitazione delle connessioni sinaptiche tra i sistemi olfattorio e limbico. I nostri dati inoltre confermano che nessuno dei composti farmacologici utilizzati è in grado di bloccare la comparsa dell'attività intercritica.

I dati riportati in questa tesi e quelli presentati in letteratura evidenziano che l'azione dei composti farmacologici sull'attività indotta dalla 4AP varia a seconda della struttura, della specie animale e del tipo di preparazione utilizzate.

Modello cronico.

La somministrazione intraippocampale di AK nelle cavie anestetizzate induce al risveglio differenti profili comportamentali a seconda della quantità di sostanza iniettata. Crisi lateralizzate con clonie della zampa anteriore controlaterale al sito d'iniezione sono state osservate in tutti gli animali trattati; l'utilizzo di dosi crescenti di AK induce diffusione delle scariche epilettiche che correlano con crisi toniche generalizzate.

Dal punto di vista elettrofisiologico le cavie libere di muoversi trattate con 1µg di AK intraippocampale esprimono evidenti crisi ricorrenti che perdurano dalle 5 alle 8 ore. Queste hanno origine spesso dell'ippocampo trattato e da questa struttura diffondono agli altri siti di registrazione. Il pattern critico è caratterizzato da un'attività iniziale di bassa intensità ad alta frequenza seguita da potenziali irregolari che in fine si organizzano in gruppi di punte sincrone. Lo stesso pattern critico è stato registrato sia nel modello in vivo di stato epilettico indotto dalla somministrazione intraperitoneale di pilocarpina (Englot *et al.*, 2008) che nei modelli in vitro del cervello isolato di

cavia (Uva et al., 2005; 2008) e nelle sezioni complesse di ratto nelle quali viene preservata l'integrità dell'ippocampo e della corteccia entorinale e delle loro interconnessioni (Barbarosie & Avoli, 1997; Avoli et al., 2002; Wozny et al., 2005). Contrariamente, l'azione di agenti epiletogeni su sezioni ippocampali o corticali semplici porta alla comparsa esclusivamente di intense scariche neuronali dette afterdischarge (Lothman et al., 1991; Bertram, 1997; McIntyre & Gilby, 2008). Quindi, il pattern critico completo sembrerebbe essere espresso solo in condizioni in cui è preservata una buona l'integrità strutturale di tutto il sistema limbico ed olfattorio.

Negli animali trattati con AK l'aspetto comportamentale delle crisi ben riproduce le caratteristiche delle epilessie del lobo temporale mesiale nell'uomo. Infatti, nonostante la florida attività elettrica non sono osservabili anomalie cliniche evidenti. Dosando ed indirizzando l'AK in una zona limitata del cervello si evita l'attivazione diffusa di tutto il cervello e quindi la generazione di crisi generalizzate ripetute che si induce mediante la somministrazione sistemica di sostanze epiletogene (Cavalheiro et al., 1984; Fujikawa et al., 2003; Perry et al., 1978; Ben-Ari et al., 1985). L'iniezione intraippocampale di AK nei ratti induce la comparsa di eventi intercritici, come le spike interictali e i *fast ripples*. La registrazione dei *fast ripples* nella zona di iniezione è predittiva dell'evoluzione in senso cronico dell'animale (Bragin et al., 2004). Il periodo cronico delle cavie trattate con AK intraippocampale è caratterizzato da attività intercritica di punte e punte onde in ippocampo e in neocorteccia che non correlano con alterazioni comportamentali. In un solo animale è stata registrata una crisi dopo 70 giorni dal trattamento con AK. Il punto di esordio di questa attività è stato l'ippocampo ipsilaterale all'iniezione. Il tracciato elettrofisiologico della crisi è caratterizzato dalla stessa sequenza elettrografica osservata nelle crisi indotte nella fase acuta dell'esperimento. Il processo epiletogenico nei ratti è più rapido ed induce una più intensa attività critica con eventi ictali che si ripetono con una frequenza di 0.38-9.92 crisi al giorno in un periodo di registrazione di quattordici giorni dopo 40 giorni dall'iniezione (Raedt et al., 2009). Questa discordanza di risultati potrebbe essere dovuta ad una diversa definizione di attività critica, oppure potrebbe indicare una maggiore resistenza delle cavie al processo epiletogenico.

Le indagini istologiche effettuate, dopo non meno di 2 mesi, sugli animali trattati con AK durante l'anestesia hanno mostrato chiari danni ippocampali che dimostrano un processo di epiletogenesi. Questi sono tipicamente unilaterali e correlano con la gravità delle crisi comportamentali espresse dall'animale. Solo nel caso di crisi generalizzate per più di 3 il danno si estende anche all'ippocampo controlaterale. CA1, il giro dentato e l'ilo del giro dentato sono le aree ippocampali interessate dal danno indotto dalle crisi. La colorazione TIMM ha evidenziato chiari segni di sprouting neuronale. Questa è una chiara evidenza di una riorganizzazione neuronale che potrebbe portare ad un incremento dell'eccitabilità. In fine un intenso processo di gliosi è stato messo in evidenza grazie a reazioni immunoistochimiche utilizzando l'anticorpo anti-GFAP. La

localizzazione unilaterale delle anomalie ippocampali, la gliosi, l'arborizzazione anomala delle cellule dell'ilo del giro dentato sono caratteristiche riscontrate sia nei modelli di epilessia del lobo temporale sviluppati in ratti e topi trattati con AK intraippocampale (Bouilleret et al., 1999; Le Duigou et al., 2005; Raedet et al., 2009) sia nei tessuti autoptici o post-chirurgici provenienti da di pazienti affetti da epilessia del lobo temporale (Nadler et al., 2003; Maglóczy et al, 2010; Thom et al., 2009).

In conclusione, in questo lavoro abbiamo mostrato che nel modello del cervello isolato di cavia le caratteristiche delle crisi indotte nel sistema limbico da differenti sostanze sono paragonabili, indicando che indipendentemente dallo stimolo farmacologico utilizzato la regione ippocampo-paraippocampale del lobo temporale risponde sempre con le medesime modalità di organizzazione dell'attività di network. Il pattern critico caratterizzato da un'attività iniziale di basso voltaggio ad alta frequenza seguito da punte irregolari che successivamente si organizzano in gruppi di potenziali ipersincroni in burst è stato osservato anche in esperimenti condotti in vivo mediante la somministrazione unilaterale di AK nell'ippocampo. Di particolare interesse è il fatto che questo trattamento ha indotto modifiche nei network neuronali evidenziabili dalla registrazione di attività intercritiche e soprattutto dall'occorrenza di crisi epilettiche nel periodo cronico. E' stato quindi messo a punto un nuovo modello animale di epilessia del lobo temporale caratterizzato dalle stesse anomalie elettrofisiologiche, comportamentali e di danno ippocampale presenti nell'uomo.

In futuro sarà possibile utilizzare questo modello animale per effettuare degli esperimenti , simili a quello effettuati nel modello acuto in vitro (Gnatkovski et al., 2008), utilizzando la metodica del cervello isolato di cavia permettendo un più approfondito studio dell'ictogenesi in un animale di per se ipereccitabile.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcon, G., Binnie, C. D., Elwes, R. D., and Polkey, C. E. Power spectrum and intracranial EEG patterns at seizure onset in partial epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 94: 326-37, 1995.
- Allen, P. J., Fish, D. R., and Smith, S. J. Very high-frequency rhythmic activity during SEEG suppression in frontal lobe epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 82: 155-9, 1992.
- Avoli, M., Barbarosie, M., Lücke, A., Nagao, T., Lopantsev, V., and Köhling, R. Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro. *Journal Of Neuroscience* 16: 3912-24, 1996.
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Kohling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., and Tancredi, V. Network pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in Neurobiology* 68: 167-207, 2002.
- Baghdadi, T. S. and Najjar, M. W. Evaluation of intractable epilepsy. Invasive monitoring. *Neurosciences (Riyadh)* 15: 71-8, 2010.
- Bancaud, J., Angelergues, R., Bernouilli, C., Bonis, A., Bordas-Ferrer, M., Bresson, M., Buser, P., Covello, L., Morel, P., Szikla, G., Takeda, A., and Talairach, J. Functional stereotaxic exploration (SEEG) of epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 28: 85-6, 1970.

- Barbarosie, M. and Avoli, M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *Journal Of Neuroscience* 17: 9308-14, 1997.
- Bartolomei, F., Gavaret, M., Badier, J. M., Marquis, P., and Chauvel, P. [EEG and video-EEG explorations in refractory partial epilepsy]. *Rev Neurol (Paris)* 160 Spec no 1: 81-90, 2004.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., and Otterson, O. P. Injection of kainic acid in the amygdaloid complex of the rat: an electroencephalographic , clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 5: 1980.
- Bertram, E. H. Functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of limbic epilepsy. *Epilepsia* 38: 95-105, 1997.
- Biella, G. and de Curtis, M. Associative synaptic potentials in the piriform cortex of the isolated guinea-pig brain in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 7: 54-64, 1995.
- Biella, G. and de Curtis, M. Olfactory inputs activate the medial entorhinal cortex via the hippocampus. *J Neurophysiol* 83: 1924-31, 2000.
- Biella, G., Forti, M., and de Curtis, M. Propagation of epileptiform potentials in the guinea-pig piriform cortex is sustained by associative fibres. *Epilepsy Research* 24: 137-46, 1996.
- Blume, W., Young, B., and Lemieux, J. EEG morphology of parial epileptic seizures. *EEG clinical neurophysiol.* 57: 295-302, 1984.
- Boeijinga, P. H. and Van Groen, Th. Inputs from the olfactory bulb and olfactory cortex to the entorhinal cortex in the cat. *Exp. Brain Res.* 57:40-48, 1984.

Bouilleret, V., Ridoux, V., Depaulis, A., Marescaux, C., Nehlig, A., and Le Gal La Salle, G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 89: 717-29, 1999.

Bragin, A., Claeys, P., Vonck, K., Van Roost, D., Wilson, C., Boon, P., and Engel, J. Jr Analysis of initial slow waves (ISWs) at the seizure onset in patients with drug resistant temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48: 1883-94, 2007.

Bragin, A., Mody, I., Wilson, C. L., and Engel, J. Jr Local generation of fast ripples in epileptic brain. *J Neurosci* 22: 2012-21, 2002.

Bragin, A., Wilson, C. L., Almajano, J., Mody, I., and Engel, J. Jr High-frequency oscillations after status epilepticus: epileptogenesis and seizure genesis. *Epilepsia* 45: 1017-23, 2004.

Bragin, A., Wilson, C. L., and Engel, J. Jr Increased afterdischarge threshold during kindling in epileptic rats. *Exp Brain Res* 144: 30-7, 2002.

Bragin, A., Wilson, C. L., Fields, T., Fried, I., and Engel, J. Jr Analysis of seizure onset on the basis of wideband EEG recordings. *Epilepsia* 46 Suppl 5: 59-63, 2005.

Bressler, S. L. and Freeman, W. J. Frequency analysis of olfactory system EEG in cat, rabbit, and rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 50: 19-24, 1980.

Carriero, G., Uva, L., Gnatkovsky, V., and de Curtis, M. Distribution of the olfactory fiber input into

the olfactory tubercle of the in vitro isolated guinea pig brain. *J Neurophysiol* 101: 1613-9, 2009.

Cascino, G. D., Hirschorn, K. A., Jack, C. R., and Sharbrough, F. W. Gadolinium-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging in intractable partial epilepsy. *Neurology* 39: 1115-8, 1989.

Cavalheiro, E. A. N.-M. M. G. M. L. E. L. J. P. The pilocarpine model of seizures. In Pitkanen, A. S. P. A. M. S. L. ed. *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press. 2006, 433-446.

Clemens, Z., Molle, M., Eross, L., Barsi, P., Halasz, P., and Born, J. Temporal coupling of parahippocampal ripples, sleep spindles and slow oscillations in humans. *Brain* 130: 2868-78, 2007.

Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., and Miles, R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298: 1418-21, 2002.

de Curtis, M., Biella, G., Buccellati, C., and Folco, G. Simultaneous investigation of the neuronal and vascular compartments in the guinea pig brain isolated in vitro. *Brain Research Protocols* 3: 221-8, 1998.

de Curtis, M., Biella, G., Forti, M., and Panzica, F. Multifocal spontaneous epileptic activity induced by restricted bicuculline ejection in the piriform cortex of the isolated guinea pig brain. *Journal of Neurophysiology* 71: 2463-2475, 1994.

de Curtis, M. and Gnatkovsky, V. Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity. *Epilepsia* 2009.

de Curtis, M., Pare, D., and Llinas, R. R. The electrophysiology of the olfactory-hippocampal circuit in the isolated and perfused adult mammalian brain in vitro. *Hippocampus* 1: 341-54, 1991.

de Lanerolle, N. C., Kim, J. H., Robbins, R. J., and Spencer, D. D. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495: 387-95, 1989.

Derchansky, M., Jahromi, S. S., Mamani, M., Shin, D. S., Sik, A., and Carlen, P. L. Transition to seizures in the isolated immature mouse hippocampus: a switch from dominant phasic inhibition to dominant phasic excitation. *J Physiol* 586: 477-94, 2008.

Engel, J. J. Intracerebral recordings: organization of the human epileptogenic region. *J of clinical neurophysiology* 10: 90-98, 1993.

Engel, J. Jr Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 7: 340-52, 2001.

Englot, D. J., Mishra, A. M., Mansuripur, P. K., Herman, P., Hyder, F., and Blumenfeld, H. Remote effects of focal hippocampal seizures on the rat neocortex. *J Neurosci* 28: 9066-81, 2008.

Fariello, R. G., Doro, J. M., and Forster, F. M. Generalized cortical electrodecremental event. Clinical and neurophysiological observations in patients with dystonic seizures. *Arch Neurol* 36: 285-91, 1979.

Fisher, R. S., Webber, W. R., Lesser, R. P., Arroyo, S., and Uematsu, S. High-frequency EEG

activity at the start of seizures. *J Clin Neurophysiol* 9: 441-8, 1992.

Gabriel, S., Njunting, M., Pomper, J. K., Merschhemke, M., Sanabria, E. R., Eilers, A., Kivi, A., Zeller, M., Meencke, H. J., Cavalheiro, E. A., Heinemann, U., and Lehmann, T. N. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 24: 10416-30, 2004.

Gloor, P. Contributions of electroencephalography and electrocorticography to the neurosurgical treatment of the epilepsies. *Adv Neurol* 8: 59-105, 1975.

Gnatkovsky, V., Librizzi, L., Trombin, F., and de Curtis, M. Fast activity at seizure onset is mediated by inhibitory circuits in the entorhinal cortex in vitro. *Ann Neurol* 64: 674-86, 2008.

Gotman, J. Relationships between interictal spiking and seizures: human and experimental evidence. *Can. J. Neurol. Sci.* 18: 573-576, 1991.

Haberly, L. B. and Price, J. L. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle. *Journal Of Comparative Neurology* 181: 781-807, 1978.

Hogan, R. E., Wang, L., Bertrand, M. E., Willmore, L. J., Bucholz, R. D., Nassif, A. S., and Csernansky, J. G. Predictive value of hippocampal MR imaging-based high-dimensional mapping in mesial temporal epilepsy: preliminary findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 27: 2149-54, 2006.

Houser, C. R., Miyashiro, J. E., Swartz, B. E., Walsh, G. O., Rich, J. R., and Delgado-Escueta, A. V.

Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 10: 267-82, 1990.

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., and Rivera, C. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27: 9866-73, 2007.

Ishikawa, T., Sato, T., Shimizu, A., Tsutsui, K., de Curtis, M., and Iijima, T. Odor-driven activity in the olfactory cortex of an in vitro isolated guinea pig whole brain with olfactory epithelium. *J Neurophysiol* 97: 670-9, 2007.

Jacobs, J., LeVan, P., Chander, R., Hall, J., Dubeau, F., and Gotman, J. Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) are an indicator of seizure onset areas independent of spikes in the human epileptic brain. *Epilepsia* 49: 1893-907, 2008.

Ketchum, K. L. and Haberly, L. B. Synaptic events that generate fast oscillations in piriform cortex. *Journal Of Neuroscience* 13:3980-5,1993.

Krettek, J. E. and Price, J. L. Projections from the amygdala to the perirhinal and entorhinal cortices and subiculum. *BrainRes.* 71:150-154,1977.

Kwan, P. and Brodie, M. J. Definition of refractory epilepsy: defining the indefinable? *Lancet Neurol* 9: 27-9, 2010.

Le Duigou, C., Bouillere, V., and Miles, R. Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *J Physiol* 586: 4891-904, 2008.

- Le Duigou, C., Wittner, L., Danglot, L., and Miles, R. Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus *in vitro* and *ex vivo*. *J Physiol* 569: 833-47, 2005.
- Leite, J. P., Babb, T. L., Pretorius, J. K., Kuhlman, P. A., Yeoman, K. M., and Mathern, G. W. Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats. *Epilepsy Res* 26: 219-31, 1996.
- Librizzi, L., Biella, G., Cimino, C., and De Curtis, M. Arterial supply of limbic structures in the guinea pig. *Journal Of Comparative Neurology* 411: 674-82, 1999.
- Librizzi, L. and de Curtis, M. Epileptiform ictal discharges are prevented by periodic interictal spiking in the olfactory cortex. *Ann Neurol* 53: 382-9, 2003.
- Librizzi, L., Janigro, D., De Biasi, S., and de Curtis, M. Blood brain barrier preservation in the *in vitro* isolated guinea -pig brain preparation . *Journal of Neuroscience Research* 66: 289-297, 2001.
- Librizzi, L., Pastori, C., de Grazia, U., Croci, D., and de Curtis, M. Rapid *in vitro* elimination of anesthetic doses of thiopental in the isolated guinea pig brain. *Neurosci Lett* 380: 66-9, 2005.
- Llinás, R., Steimberg, I. Z., and Walton, K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys. J.* 33: 323-352, 1981.
- Longo, B. M. and Mello, L. E. Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. *Epilepsy Res* 32: 172-82, 1998.

- Lothman, E. W., Bertram, E. H. I., and Stringer, J. L. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol* 37: 1-82, 1991.
- Luders, H. and Schuele, S. U. Epilepsy surgery in patients with malformations of cortical development. *Curr Opin Neurol* 19: 169-74, 2006.
- Luskin, M. B. and Price, J. L. The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. *Journal Of Comparative Neurology* 216: 292-302, 1983.
- Magloczky, Z. Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Res* 89: 52-9, 2010.
- McIntyre, D. C. and Gilby, K. L. Mapping seizure pathways in the temporal lobe. *Epilepsia* 49 Suppl 3: 23-30, 2008.
- Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Babb, T. L., and Finch, D. M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34: 985-95, 1993.
- Muhlethaler, M., de Curtis, M., Walton, K., and Llinas, R. The isolated and perfused brain of the guinea-pig in vitro. *Eur J Neurosci* 5: 915-26, 1993.
- Munari, C., Hoffmann, D., Francione, S., Kahane, P., Tassi, L., Lo Russo, G., and Benabid, A. L. Stereo-electroencephalography methodology: advantages and limits. *Acta Neurol Scand Suppl* 152: 56-67, discussion 68-9, 1994.
- Nadler, J. V. The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res* 28: 1649-58,

2003.

Neville, K. R. and Haberly, L. B. Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90: 3921-30, 2003.

Perrault, P. and Avoli, M. 4-Aminopyridine-induced activity in hilar neurons in the guinea pig hippocampal slice. *J. Neurosci.* 12: 104-115, 1992.

Perreault, P. and Avoli, M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 65: 771-85, 1991.

Pitkanen, A. and Sutula, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 1: 173-81, 2002.

Racine, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281-94, 1972.

Raedt, R., Van Dycke, A., Van Melkebeke, D., De Smedt, T., Claeys, P., Wyckhuys, T., Vonck, K., Wadman, W., and Boon, P. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurol Scand* 119: 293-303, 2009.

Rafiq, A., DeLorenzo, R. J., and Coulter, D. A. Generation and propagation of epileptiform discharges in a combined entorhinal cortex/hippocampal slice. *J Neurophysiol* 70: 1962-74, 1993.

Risinger, M. W., Engel, J. Jr, Van Ness, P. C., Henry, T. R., and Crandall, P. H. Ictal localization of

temporal lobe seizures with scalp/sphenoidal recordings. *Neurology* 39: 1288-93, 1989.

Rodin, E., Constantino, T., Rampp, S., and Wong, P. K. Spikes and epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 40: 288-99, 2009.

Sander, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 16: 165-70, 2003.

Schwartzkroin, P. A. and Prince, D. A. Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. *Brain Research* 147: 117-30, 1978.

Sloviter, R. S., Kudrimoti, H. S., Laxer, K. D., Barbaro, N. M., Chan, S., Hirsch, L. J., Goodman, R. R., and Pedley, T. A. "Tectonic" hippocampal malformations in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 59: 123-53, 2004.

Spencer, S. S., Guimaraes, P., Katz, A., Kim, J., and Spencer, D. Morphological patterns of seizures recorded intracranially. *Epilepsia* 33: 537-45, 1992.

Spencer, S. S., Spencer, D. D., Williamson, P. D., and Mattson, R. Combined depth and subdural electrode investigation in uncontrolled epilepsy. *Neurology* 40: 74-9, 1990.

Staba, R. J., Wilson, C. L., Bragin, A., Jhung, D., Fried, I., and Engel, J. Jr High-frequency oscillations recorded in human medial temporal lobe during sleep. *Ann Neurol* 56: 108-15, 2004.

Talairach, J. and Szikla, G. Application of stereotactic concepts to the surgery of epilepsy. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 30: 35-54, 1980.

Thesleff, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5: 1413-9, 1980.

- Thom, M., Eriksson, S., Martinian, L., Caboclo, L. O., McEvoy, A. W., Duncan, J. S., and Sisodiya, S. M. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 928-38, 2009.
- Thom, M., Mathern, G. W., Cross, J. H., and Bertram, E. H. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Ann Neurol* 68: 424-34, 2010.
- Uva, L., Avoli, M., and de Curtis, M. Synchronous GABA-receptor-dependent potentials in limbic areas of the in-vitro isolated adult guinea pig brain. *Eur J Neurosci* 29: 911-20, 2009.
- Uva, L. and de Curtis, M. Polysynaptic olfactory pathway to the ipsi- and contralateral entorhinal cortex mediated via the hippocampus. *Neuroscience* 130: 249-58, 2005.
- Uva, L., Librizzi, L., Marchi, N., Noe, F., Bongiovanni, R., Vezzani, A., Janigro, D., and de Curtis, M. Acute induction of epileptiform discharges by pilocarpine in the in vitro isolated guinea-pig brain requires enhancement of blood-brain barrier permeability. *Neuroscience* 151: 303-12, 2008.
- Uva, L., Librizzi, L., Wendling, F., and de Curtis, M. Propagation dynamics of epileptiform activity acutely induced by bicuculline in the hippocampal-parahippocampal region of the isolated Guinea pig brain. *Epilepsia* 46: 1914-25, 2005.
- Vonck, K., Boon, P., Goossens, L., Dedeurwaerdere, S., Claeys, P., Gossiaux, F., Van Hese, P., De Smedt, T., Raedt, R., Achten, E., Deblaere, K., Thieleman, A., Vandemaele, P., Thiery, E., Vingerhoets, G., Miatton, M., Caemaert, J., Van Roost, D., Baert, E., Michielsens, G., Dewaele, F., Van Laere, K., Thadani, V., Robertson, D., and Williamson, P. Neurostimulation for refractory epilepsy. *Acta Neurol Belg* 103: 213-7, 2003.

- Wendling, F., Bartolomei, F., Bellanger, J. J., Bourien, J., and Chauvel, P. Epileptic fast intracerebral EEG activity: evidence for spatial decorrelation at seizure onset. *Brain* 126: 1449-59, 2003.
- Wendling, F., Bartolomei, F., and Senhadji, L. Spatial analysis of intracerebral electroencephalographic signals in the time and frequency domain: identification of epileptogenic networks in partial epilepsy. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 367: 297-316, 2009.
- Williamson, P. D., French, J. A., and Thadani, V. M. characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp EEG, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Annals of neurology* 34: 781-787, 1993.
- Worrell, G. A., Gardner, A. B., Stead, S. M., Hu, S., Goerss, S., Cascino, G. J., Meyer, F. B., Marsh, R., and Litt, B. High-frequency oscillations in human temporal lobe: simultaneous microwire and clinical macroelectrode recordings. *Brain* 131: 928-37, 2008.
- Wozny, C., Gabriel, S., Jandova, K., Schulze, K., Heinemann, U., and Behr, J. Entorhinal cortex entrains epileptiform activity in CA1 in pilocarpine-treated rats. *Neurobiol Dis* 19: 451-60, 2005.
- Ziburkus, J., Cressman, J. R., Barreto, E., and Schiff, S. J. Interneuron and pyramidal cell interplay during in vitro seizure-like events. *J Neurophysiol* 95: 3948-54, 2006.