BANDO FONDAZIONE LICE 2024

PROGETTO di RICERCA CLINICA

Responsabile scientifico del progetto: Anna-Elisabetta Vaudano

Data di nascita: 23/03/1978

Affiliazione:

- UOSD Neurofisiologia Clinica, Epilepsy Monitoring Unit - Azienda Ospedaliera-Universitaria di Modena
- Dipartimento di Scienze Biomediche Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena.

Ente ospitante del progetto:

- UOSD Neurofisiologia Clinica – Epilepsy Monitoring Unit - Azienda Ospedaliera-Universitaria di Modena

Elenco dei Centri partecipanti:

1. Unità 1 (U1): UOSD Neurofisiologia Clinica – Epilepsy Monitoring Unit - Azienda Ospedaliera-Universitaria di Modena (AOU), **Dr.ssa Anna-Elisabetta Vaudano**
2. Unità 2 (U2): Laboratorio di EEG e Neurofisiologia sperimentale, Dipartimento di Scienze Biomediche Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, **Prof. Giulia Curia**
3. Unità 3 (U3): Sezione di Neurologia, Ospedale S.M. della Misericordia, Laboratori di Neurologia Sperimentale Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia, **Prof. Cinzia Costa**
4. Unità 4 (U4): Centro Epilessia - Neurologia, Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza, **Dr. Jacopo C. DiFrancesco**
5. Unità 5 (U5): Epilettologia Clinica e Sperimentale Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, **Dr.ssa Laura Librizzi**

Titolo del progetto: Caratterizzazione fenotipica delle epiLessie temporali ad esordio tardivo mediante biomarcatori sierici e metodiche avanzate di imaging cerebrale: dall'Uomo al modello animalE (CLUE)

SINOSSI

Background

Il 20% circa delle epilessie ad esordio tardivo ha una eziologia indeterminata (1) e un'origine spesso temporale (**Late-Onset Temporal Lobe Epilepsy of Unknown Origin, LO-TLE**) (2). Ricerche traslazionali indicano possibili meccanismi comuni tra LO-TLE, la positività liquorale di biomarcatori di neurodegenerazione [**amoiloide (Aβ)**, proteina **photo-tau** (**p-tau**) e **tau totale** (**t-tau**)] e lo sviluppo di declino cognitivo (3). Infatti, livelli liquorali di Aβ risultano ridotti in sottopopolazioni di LO-TLE (4) e i pattern di atrofia corticale, derivati da analisi di **Risonanza Magnetica Cerebrale** (**RMNc**), sono sovrapponibili a pazienti con disturbo cognitivo lieve (**Mild Cognitive Impairment**, **MCI**) (5). Non esistono, tuttavia, studi multidisciplinari che combinino le informazioni cliniche a quelle laboratoristiche e di imaging. Inoltre,

l'analisi dei mediatori di infiammazione (6,7) potrebbe migliorare le conoscenze della patogenesi della LO-TLE. In questo ambito, vi è un'evidente carenza di studi su modelli animali di LO-TLE (1,8), il cui sviluppo potrebbe chiarire ulteriormente i meccanismi dell'epilettogenesi e della neurodegenerazione associati a questa condizione.

Obiettivi

1. studiare longitudinalmente le basi biologiche del declino cognitivo e dell'atrofia cortico-sottocorticale nella LO-TLE;
2. identificare profili biochimici nei LO-TLE mediante dosaggio di citochine rilasciate dalle **cellule mononucleate del sangue** (**PBMC**);
3. studiare l'effetto dei mediatori rilasciati dai PBMC sull'eccitabilità neuronale *in vitro*;
4. realizzare un modello murino di LO-TLE e studiarne i meccanismi della neurodegenerazione;
5. verificare le analogie tra il modello animale di LO-TLE e pazienti in termini di: i) correlazione tra dati biologici/clinici, ii) confronto tra le modificazioni anatomopatologiche nei roditori e i pattern di imaging nei pazienti.

Breve descrizione del progetto

Il progetto, traslazionale e longitudinale, comprende tre **workpackages** (**WP**) paralleli.

WP1, su LO-TLE reclutati retro e prospetticamente e controlli sani reclutati prospetticamente.

- *Task1.1*, reclutamento pazienti (tempo T1): criteri di inclusione: (i) prima crisi > 50 anni (9); (ii) RMNc (10); (iii) **Mini Mental State Examination** (**MMSE**) >26; (iv) prelievo ematico; (v) valutazione **neuropsicologica** (**NPS**) (11).
- *Task1.2*, valutazione longitudinale (tempo T2, almeno 6 mesi dopo T1) con (i) RMNc; (ii) MMSE; (iii) prelievo ematico; (iv) NPS.
- *Task1.3*, raccolta dati da soggetti sani (imaging/biologici).
- *Task1.4*, raccolta variabili cliniche e biologiche (T1-T2): (i) frequenza, tipo di crisi, terapia anticrisi, (ii) dosaggi sierici di Aβ1-42, Aβ1-42/1-40 ratio, p-tau, t-tau, **Neurofilamenti a catena Leggera** (**NfL**) (iii) MMSE, NPS.
- *Task1.5*, analisi dei dati di imaging e correlazione con variabili cliniche e biologiche.

WP2, su cervelli isolati di cavie in vitro perfusi con i mediatori infiammatori rilasciati dai PBMC.

- *Task 2.1*, isolamento e messa in coltura di PBMC di LO-TLE e controlli sani(6).
- *Task 2.2*, perfusione dei cervelli isolati di cavia (n=30) con i mediatori rilasciati da LO-TLE e controlli e simultanee registrazioni elettrofisiologiche extracellulari per monitorare l'insorgenza di attività epilettiforme.
- *Task 2.3*, profiling delle citochine rilasciate dai PBMC dei pazienti e controlli.

WP3, su roditori con LO-TLE indotto da **stato epilettico** (**SE**).

- *Task3.1*, 29 roditori (età 6-9 mesi) trattati con Kainato per indurre SE; 14 roditori di pari età utilizzati come controllo.
- *Task3.2*, analisi severità crisi (12), prelievo ematico seriato (T1, 3-4 giorni dopo SE; T2, 4 settimane dall'esordio LO-TLE) per dosaggio biomarcatori (Aβ, NfL).
- *Task3.3*, test comportamentali (13) [prima del trattamento (T0), T2 e nei roditori controllo).
- *Task3.4*, quantificazione immunoistochimica *post-mortem* dei depositi cerebrali di Aβ e correlazione con severità delle crisi e test comportamentali.

Risultati Attesi

Grazie alle somiglianze tra uomo e modello animale in termini clinici/laboratoristici/cognitivi, questo studio permetterà di migliorare le conoscenze sui meccanismi patogenetici della LO-TLE. L'estesa caratterizzazione

fenotipica e biologica e il profilo longitudinale dello studio consentiranno di ottenere una stima di rischio di neurodegenerazione dei pazienti studiati fornendo ai clinici potenziali nuovi algoritmi per un corretto inquadramento diagnostico e prognostico dei LO-TLE.

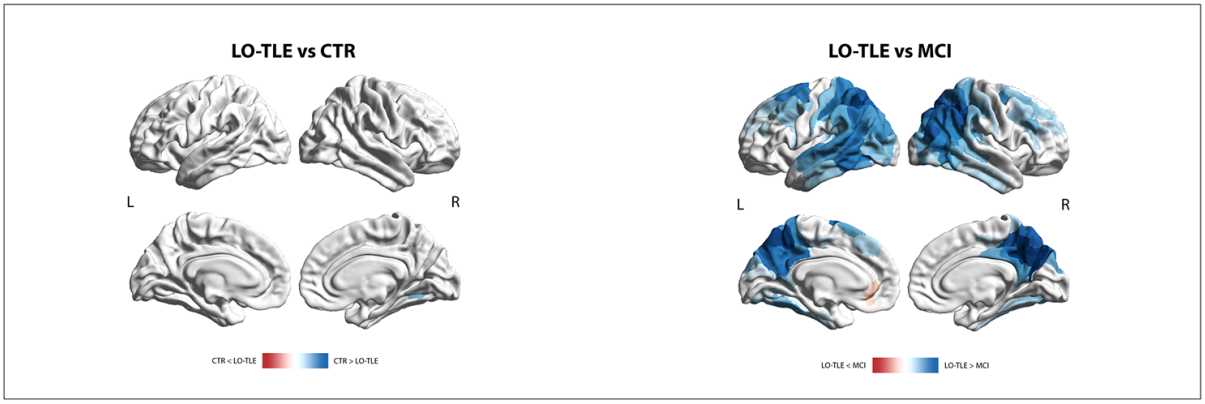
PAROLE CHIAVE
Epilessia temporale ad esordio tardivo
NeuroImaging
Biomarcatori ematici
Neurodegenerazione
Neuroinfiammazione

RAZIONALE

L'incidenza di crisi epilettiche ed epilessia aumenta dopo i 50 anni raggiungendo il picco oltre i 65 anni d'età (1). L'**epilessia a esordio tardivo (LOE)** rappresenta il terzo disturbo neurologico più comune negli adulti più anziani, dopo ictus e demenza (14). Questo dato è di particolare interesse per Paesi come l'Italia dove l'età media della popolazione è tra le più alte al mondo (15).

La maggior parte delle LOE è secondaria a cause strutturali, principalmente malattie cerebrovascolari (30-50%), traumi cranici (≤25%) e tumori cerebrali (10-30%) (16,17). Tuttavia, oltre il 20% delle LOE non presenta danni strutturali e/o un'eziologia identificabile; questi casi sono denominati "**Epilessia a insorgenza tardiva ad eziologia sconosciuta**" (**LOEU**). Nella maggior parte dei pazienti con LOEU, le crisi sono focali e hanno un'origine temporale. Nel 2021, su una casistica di pazienti con LOEU ben caratterizzati da un punto di vista clinico e di imaging metabolico, abbiamo dimostrato una eziologia temporale in oltre il 70% dei casi (2). Le **forme temporali di LOEU (LO-TLE**) presentano generalmente una buona risposta alla terapia con **farmaci anticrisi** (**ASM**) e una prognosi favorevole con una elevata percentuale di pazienti *seizure-free* al follow-up (18). Nonostante l'apparente buon andamento dal punto di vista epilettologico, le LO-TLE rappresentano una significativa preoccupazione in contesto sanitario e di ricerca scientifica considerato lo stretto legame con le malattie neurodegenerative ed in particolare con la **malattia di Alzheimer** (**AD**). Studi di coorte (19) e revisioni sistematiche (20,21) hanno mostrato che le persone con LOEU hanno un rischio 2-3 volte maggiore di sviluppare un disturbo cognitivo lieve (**Mild Cognitive Impairment, MCI**) o **AD** rispetto agli adulti della stessa età senza epilessia. In linea con questa ipotesi, diversi studi degli ultimi 5 anni hanno riscontrato livelli ridotti di **β-amiloide** (**Aβ**) e livelli aumentati di **tau fosforilata** (**p-tau**) nel **liquido cerebrospinale** (**CSF**) di pazienti LOEU rispetto a individui controllo. In un nostro studio prospettico, il 37,5% delle persone con LOEU senza segni clinici di demenza (**Mini Mental State Examination**, **MMSE** >24) presentava livelli patologici di Aβ nel CSF al basale, associato a un rischio 3-4 volte maggiore di sviluppare AD al follow-up rispetto a controlli sani (4). Oltre al dosaggio liquorale dei biomarcatori di AD, approcci avanzati di analisi di dati di **Risonanza Magnetica Cerebrale (RMNc)** hanno mostrato nei pazienti con LO-TLE un pattern di atrofia corticale/sottocorticale sovrapponibile al **MCI** amnesico, la fase prodromica dell'AD (5). L'insieme di queste osservazioni suggerisce che le forme di LO-TLE potrebbero rappresentare un **utile biomarcatore per la diagnosi precoce dell'AD**, oltre a essere un importante **nuovo fattore di rischio modificabile** per la demenza. Nonostante i notevoli progressi in questo ambito di ricerca, mancano ad oggi evidenze multidisciplinari che combinino i dati clinici, biologici e di neuroimaging per un'adeguata stratificazione del rischio di sviluppare demenza in pazienti con LO-TLE. In un nostro recente lavoro (22) abbiamo combinato i dati di imaging avanzato con i valori dei biomarcatori dell'AD nel CSF di pazienti con LO-TLE e li abbiamo confrontati con anziani sani e popolazioni di MCI. Abbiamo dimostrato che pazienti LO-TLE con concentrazioni liquorali normali di Aβ e p-tau presentano un pattern di spessore corticale e volumi sottocorticali sovrapponibili a popolazioni di controllo sane e diverso da MCI **(Fig.1)**, supportando (a) l'esistenza di diversi fenotipi di LO-TLE e (b) l'importanza della valutazione combinata del neuroimaging e del dosaggio di marcatori biologici per una corretta caratterizzazione di queste forme di epilessia tardiva.

A) Risultati analisi di morfometria (misurazione spessore corticale) e confronto tra LO-TLE e controlli (CRT) e tra LO-TLE e MCI. Il colore blu identifica una maggiore atrofia. Si noti la differenza tra LO-TLE (spessore corticale simile ai CRT) e MCI diffuso pattern di atrofia corticale)



B) Risultati dosaggio biomarcatori liquorali per AD in LO-TLE (valori di p-tau e Aβ1-42/1-40 ratio normali) e MCI (elevati livelli di p-tau e basso Aβ1-42/1-40 ratio)

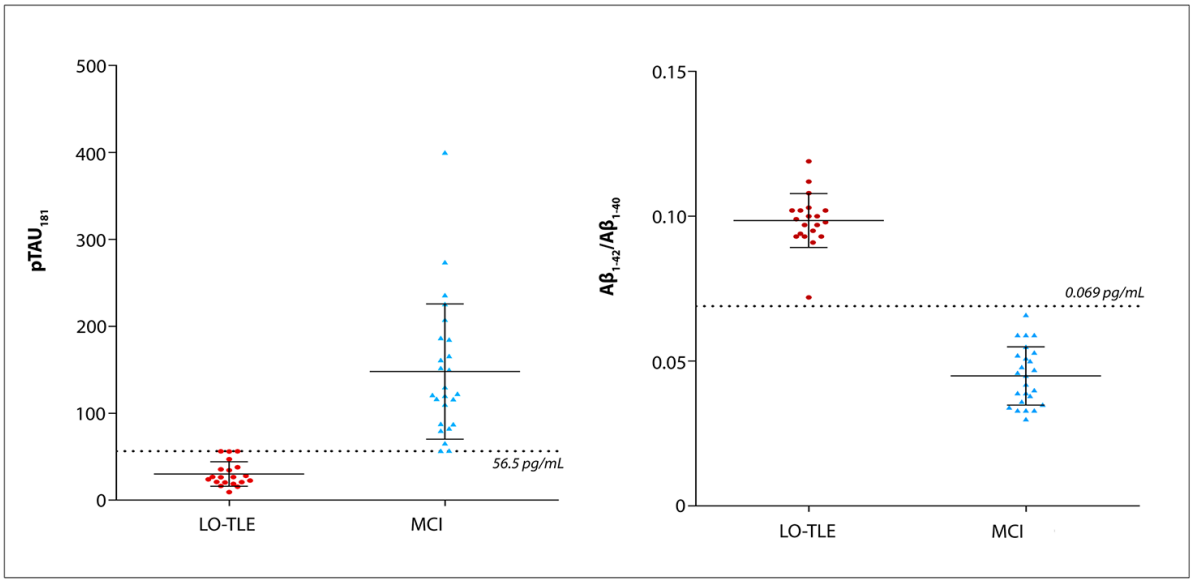


Fig.1

Da un punto di vista patogenetico, oltre agli effetti pro-epilettogeni diretti di proteine Aβ e tau (2), l'infiammazione neurologica mediata dagli astrociti e dalla microglia con il conseguente rilascio di **citochine pro-infiammatorie** è stata implicata sia nell'AD preclinico che nella LOEU (1,7,23,24). Di recente, abbiamo dimostrato un ruolo attivo delle **cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs)** e delle citochine da essi rilasciate, nell'innesco di infiammazione cerebrale e nell'induzione di attività epilettiforme nel cervello isolato di cavia (6). Questo dato, se riprodotto utilizzando PBMCs isolati *in vivo* da pazienti con LO-TLE potrebbe contribuire a chiarire la cascata patogenetica alla base della comparsa delle crisi epilettiche nei LO-TLE oltre a una miglior caratterizzazione biologica dei mediatori infiammatori coinvolti.

Altri biomarcatori oggetto di studio nelle LO-TLE sono i **Neurofilamenti Leggeri (NfL)** i cui livelli nello spazio extracellulare aumentano a seguito di danno neuronale acuto o cronico. Differenti studi mostrano un transitorio incremento dei livelli sierici e liquorali di NfL sia dopo singole crisi (25) sia nei pazienti con **Stato Epilettico** (**SE**) (26). Inoltre, è stata dimostrata una correlazione positiva tra i livelli di NfL e l'atrofia corticale confermando il ruolo dei NfL come biomarcatore affidabile per le demenze neurodegenerative (27).

Lo studio di **modelli animali** è centrale per scoprire i legami fisiopatologici tra AD e LOEU. I modelli animali maggiormente oggetto di studio sono roditori portatori di mutazioni di proteine umane coinvolte nella

cascata dell'amoilode (1,28). Questi studi hanno contribuito a migliorare le nostre conoscenze relative all'associazione tra Aβ e tau (sia in depositi sia nella forma solubile) e la comparsa di crisi (3), portando al riconoscimento di potenziali meccanismi protettivi e a trattamenti farmacologici che inibendo il ricorrere delle crisi riducono l'entità dell'accumulo delle proteine anomale. In un nostro lavoro condotto in un modello pre-sintomatico di AD, il trattamento con lamotrigina di crisi indotte sperimentalmente determinava una attenuazione dell'accumulo di placche di Aβ e un miglioramento delle performance mnesiche (13).

La ricerca sperimentale, nonostante questi progressi, manca quasi completamente di studi condotti su modelli animali di LOEU. Il vantaggio di studiare l'effetto di crisi indotte in animali adulti/anziani è significativo poiché permette di fare un reale parallelismo con il modello umano e di poter studiare, nell'animale, i meccanismi alla base dell'epilettogenesi.

Partendo da solidi risultati preliminari, tra cui un'ampia casistica di LO-TLE già seguiti presso le Unità Operative coinvolte, il presente progetto si pone l'obiettivo di identificare i principali meccanismi patogenetici che sottendono allo sviluppo di LO-TLE. Tali risultati saranno supportati dalla creazione e caratterizzazione di un modello sperimentale di malattia consentendo di esplorare le fasi dell'epilettogenesi e la valutazione delle alterazioni istologiche responsabili delle crisi tardive.

OBIETTIVI

L'obiettivo primario ambizioso del progetto è provare l'esistenza di un parallelismo nei meccanismi patogenetici di neurodegenerazione di pazienti con LO-TLE e in modelli animali di LO-TLE al fine individuare biomarcatori biologici, clinici o di neuroimaging utili a scopi diagnostici, prognostici e terapeutici. Gli obiettivi specifici sono:

- **Ob.1. studiare longitudinalmente le basi biologiche del declino cognitivo e dell'atrofia cortico-sottocorticale in pazienti con LO-TLE** – L'obiettivo è dimostrare l'esistenza di una correlazione tra pattern morfometrici di spessore corticale e volumi delle strutture sottocorticali ottenuti mediante analisi avanzate della RMNc e dosaggi plasmatici di biomarcatori di neurodegenerazione in una popolazione di LO-TLE all'esordio e dopo almeno 6 mesi di malattia confrontati con una popolazione di controlli sani di pari età e sottoposta allo stesso protocollo sperimentale. Le informazioni ottenute saranno correlate con le variabili cliniche raccolte durante lo studio.
- **Ob.2. individuare citochine infiammatorie rilasciate dai PBMC di pazienti con LO-TLE** – Attraverso un semplice prelievo ematico e il dosaggio longitudinale di citochine pro-infiammatorie ci proponiamo di verificare la correlazione tra profili biochimici infiammatori, biomarcatori di neurodegenerazione e analisi di neuroimaging nella popolazione LO-TLE in studio per ottenere una miglior caratterizzazione fenotipica e biologica dei LO-TLE.
- **Ob.3. studiare l'effetto dei mediatori rilasciati dai PBMC sull'eccitabilità neuronale in vitro** – L'obiettivo è di caratterizzare da un punto di vista elettrofisiologico l'attività ictale e interictale eventualmente indotta dalla perfusione di mediatori infiammatori nel preparato di cervello isolato di cavia. Questo ci permetterà di 1) verificare la patogenicità dei biomarcatori identificati nei pazienti e valutare il loro impatto sull'eccitabilità neuronale, e 2) di correlare le registrazioni in vitro con dati in vivo neurofisiologici (registrazione EEG di scalpo) e biologici nei pazienti studiati.
- **Ob.4. studiare i meccanismi della neurodegenerazione nell'animale con LO-TLE** – Otterremo un modello animale di LO-TLE attraverso l'induzione di SE in roditori di 6-9 mesi che verranno seguiti fino a 4 settimane dopo la comparsa di crisi spontanee. Verrà investigata la possibile correlazione tra severità e frequenza delle crisi, con le prestazioni cognitive, il dosaggio sierico di biomarcatori di neurodegenerazione e le alterazioni anatomiche. In aggiunta, nel modello animale, l'esecuzione di un dosaggio sierico temporalmente vicino all'induzione dello SE permetterà di ottenere informazioni sul processo di epilettogenesi.
- **Ob.5. verificare le somiglianze e le differenze tra il modello animale creato e i pazienti LO-TLE.** In dettaglio, l'obiettivo consiste nel confrontare il modello clinico e quello preclinico in termini di: a)

correlazione tra i dati biologici (dosaggio NfL e Aβ), i deficit cognitivi/comportamentali e i dati clinici (es. severità/frequenza delle crisi nei LO-TLE); b) correlazione tra le alterazioni di spessore corticale e volumi sottocorticali dei LO-TLE ai diversi tempi di studio e le quantificazioni anatomopatologiche nel modello animale (quantificazione immunoistochimica *post-mortem* dei depositi di Aβ e misurazione dello spessore corticale di alcune aree cerebrali).

PIANO SPERIMENTALE

Il progetto si configura come uno studio retrospettivo e prospettico longitudinale e traslazionale caso-controllo. Lo studio è articolato su tre **Workpackage** (**WP**) paralleli:

1. **WP1**, prevede la raccolta e lo studio di variabili cliniche, biologiche e di neuroimaging ottenute a diversi tempi da pazienti LO-TLE;
2. **WP2**, prevede il dosaggio delle citochine rilasciate da PBMC isolati dal sangue di pazienti LO-TLE e controlli sani e lo studio *in vitro* della loro eventuale attività pro-eccitatoria;
3. **WP3**, prevede lo sviluppo di un modello animale di LO-TLE e la raccolta di informazioni riguardanti la severità delle crisi, il profilo cognitivo, il dosaggio sierico di biomarcatori di neurodegenerazione e l'analisi anatomopatologica.

In caso di finanziamento, al momento della notifica, tutte le Unità coinvolte avvieranno le procedure burocratiche per ottenere l'approvazione del comitato etico di ciascuna unità operativa e del Ministero della Salute per gli studi preclinici. L'avvio delle attività specifiche di ogni WP avrà luogo solo dopo l'ottenimento delle autorizzazioni necessarie per legge (**primi 2 mesi del progetto**).

WP1: Correlare dati biologici (biomarcatori di neurodegenerazione), clinici e di neuroimaging in una coorte di pazienti con LO-TLE studiati longitudinalmente (Ob1).

Task1.1: Arruolamento retrospettivo e prospettico nell'arco di 12 mesi di pazienti adulti (≥ 50 anni) con diagnosi elettroclinica di LO-TLE presso U1, U3, U4 (**tempo T1 dello studio clinico**).

Numerosità campionaria: In letteratura, la numerosità delle corti di LO-TLE studiate anche con dosaggio dei biomarcatori di neurodegenerazione non supera i 50 soggetti (2,4). Utilizzando il software SampleSize Calculator (https://www.epicentro.iss.it/strumenti/SampleSize), fissato un intervallo di confidenza al 5%, un livello di confidenza al 95% e una grandezza di popolazione di N=50, la minima sample size richiesta è di 47 soggetti. Considerando un intervallo di tempo di 3 anni (2021-2024) e basandosi su dati preliminari (2,4,22), ci si attende di reclutare retrospettivamente 45 soggetti e prospetticamente ulteriori 15 per una numerosità campionaria di 60 pazienti con LO-TLE. Tenendo conto di un possibile dropout di circa il 10% (bassa qualità di immagini di Risonanza e/o impossibilità a proseguire lo studio), la coorte finale di LO-TLE previsti dal progetto è di 50 soggetti. I pazienti verranno reclutati dall'ambulatorio epilessia e/o dal reparto di Neurologia/Unità Monitoraggio Epilessia presso U1, U3, U4.

Task1.2: A distanza di almeno 6 mesi da T1, ogni paziente arruolato verrà ricontattato per un successivo follow-up (**tempo T2 dello studio clinico**) che prevede la valutazione clinica, la ripetizione della RMNc, della valutazione neuropsicologica e MMSE e del prelievo ematico per il dosaggio dei marcatori di neurodegenerazione. Da un punto di vista di neuroimaging, studi precedenti hanno dimostrato modificazioni longitudinali dello spessore corticale dopo almeno 6 mesi di follow-up (29). Considerando inoltre che più di 2/3 della popolazione che ci si aspetta di reclutare è retrospettiva e tenendo conto della tempistica di inizio dello studio, prevediamo che i dati clinici, biologici e di imaging relativi al tempo T2 siano ottenuti a distanza di almeno 12 mesi da T1 per la maggior parte dei pazienti.

Task1.3: Una popolazione di 30 soggetti sani di età ≥ 50 anni sarà reclutata come controllo. L'arruolamento dei controlli avverrà esclusivamente presso U1 a partire dall'inizio dello studio e nei successivi 10 mesi. U1 ha già attivo un comitato etico per l'esecuzione di protocolli estesi di RMN encefalo in soggetti volontari sani (Prot. 679/2022/SPER/UNIMO_SIRER_ID_4953, Comitato Etico Provinciale AVEN) e per esecuzione di prelievo ematico a scopi di ricerca (Pratica 26/17, Comitato Etico Provinciale AOU Modena). I controlli sani

saranno sottoposti a prelievo ematico per il dosaggio dei biomarcatori di neurodegenerazione e delle citochine in studio, valutazione NPS e RMNc con protocollo identico a quello utilizzato nei pazienti. I campioni ematici raccolti saranno conservati presso la NeuroBioBanca, AOU Modena.

Task1.4: Attraverso un'apposita ***electronic Case Report Form*** (**eCRF**) creata *ad hoc* verranno registrati per ciascun paziente arruolato e per entrambi i tempi dello studio T1 e T2 i dati clinici, biologici e strumentali. La stessa eCRF verrà utilizzata anche per raccogliere i dati dei soggetti sani e i dati di neuroimaging. Ciascuna Unità coinvolta nel reclutamento provvederà al raccoglimento dei dati clinici/biologici/strumentali dei pazienti arruolati. Ci si attende di completare l'arruolamento entro il 14^ mese dall'inizio dello studio e il completamento dell'eCRF entro il 22^ mese.

Task1.5: I dati di neuroimaging raccolti nei pazienti (al tempo T1 e T2) e nei controlli sani saranno analizzati utilizzando una pipeline di analisi già consolidata presso U1 e descritta nel dettaglio nella sezione Metodi. La pipeline verrà condivisa con U3 e U4, in modo da permettere di attuare le analisi in loco senza necessità di centralizzazione. In ogni unità verranno analizzate le sequenze tridimensionali pesate in T1 (T13D).

WP2: studiare il profilo citochinico dei pazienti LO-TLE e l'effetto dei mediatori rilasciati dai PBMC sull'eccitabilità neuronale in vitro (Ob2&Ob3)

Al tempo T1 e al tempo T2 dello studio, per ciascun paziente arruolato si procederà a eseguire un prelievo ematico che verrà centralizzato presso U5 per eseguire il dosaggio delle citochine in studio da sangue intero. Per i pazienti acquisiti retrospetticamente verrà utilizzato il sangue depositato in NeuroBiobanca. Analogamente, un prelievo ematico dei controlli arruolati da U1 verrà inviato a U5 per le medesime analisi. I risultati verranno condivisi con U1 solo dopo il suo completamento, atteso entro il 22^ mese dello studio.

Task2.1: Isolamento e messa in coltura dei PBMC da sangue intero di pazienti LO-TLE e di soggetti sani di controllo.

Task 2.2: L'eluato derivato dalle culture di PBMC sarà infuso attraverso il sistema arterioso nel preparato di cervello isolato di cavia. Si procederà a registrazioni elettrofisiologiche da diverse aree cerebrali per valutare la possibile insorgenza di attività epilettiforme di tipo interictale ed ictale indotte dalla perfusione di mediatori infiammatori rilasciati dai PBMC dei pazienti.

Task 2.3: Analisi dell'eluato dei PBMC in coltura attraverso saggio immunoenzimatico (6).

WP3: Correlare dati biologici (biomarcatori di neurodegenerazione), preclinici (crisi epilettiche e deficit cognitivo) e anatomopatologici (depositi di Aβ e atrofia corticale) in un modello animale di LO-TLE (Ob4&Ob5).

Le attività che riguardano il modello animale saranno svolte da U2 e U3. Tutti gli animali saranno acquisiti a 12 settimane e dovranno essere mantenuti nello stabulario fino a 6 mesi, quando avrà inizio il Task3.1.

Numerosità campionaria. Il disegno del presente studio prevede due fattori: un fattore *between* (LO-TLE e controllo sano) e un fattore *within* (T0 vs T2 per test cognitivi). Si tratta quindi di un disegno con misure ripetute, e si pianifica di analizzare questi dati mediante una ANOVA per misure ripetute (RM-ANOVA). La *sample size* viene ricavata a partire dalle equazioni del test F di questa ANOVA.

Per quanto riguarda il fattore *within*, fissato l'errore di prima specie al 5%, la potenza all'80% e tenendo conto dei 2 gruppi (LO-TLE e controllo), la minima sample size richiesta è di 12 animali (6 per gruppo). Per il fattore *between* riteniamo ragionevole fissare il minimo effect size f a 0.5, da cui deriva una numerosità di 26 animali (13 per gruppo) (https://gpower.software.informer.com).

Il fattore di attrito per le procedure previste per gli esperimenti in vivo è dovuto al tasso di mortalità durante l'induzione di SE o il mancato verificarsi dello SE, mentre nelle procedure di prelievo dalla coda problemi tecnici potrebbero impedire i 2 prelievi in tutti gli animali. Si ritiene quindi ragionevole ipotizzare un fattore di attrito del 55% per il gruppo trattato con kainato e del 5% per il gruppo controllo. La numerosità finale è quindi pari a 13/(1-0.55)+13/(1-0.05)=29+14=43 ratti.

Task3.1: Realizzeremo un modello murino di LO-TLE inducendo lo SE in 29 ratti adulti-anziani (6-9 mesi) con iniezioni sistemiche e ripetute di acido kainico (8). Roditori che riceveranno salina al posto del kainato saranno usati come gruppo controllo (N=14). Registrazioni video verranno usate per verificare lo sviluppo della condizione cronica di TLE nei ratti post-SE e per classificare la severità delle crisi epilettiche e stabilirne la frequenza.
Task3.2: Il prelievo ematico verrà eseguito dalla vena della coda 3-4 giorni post-SE (**tempo T1 dello studio preclinico**) e 4 settimane dall'esordio di LO-TLE (**tempo T2 dello studio preclinico**) per il dosaggio dei biomarcatori Aβ e NfL. I prelievi verranno stoccati presso la NeuroBioBanca di U1 e U3 e successivamente analizzati.
Task3.3: Test cognitivi verranno eseguiti nei ratti controllo e nei ratti trattati prima di indurre lo SE (**tempo T0 dello studio preclinico**) e a T2. I test cognitivi valuteranno: a) locomozione e comportamento esplorativo (*open field test*), b) memoria spaziale (*object place recognition test*), c) livello di ansia (e*levated plus maze test*), d) comportamento aggressivo-difensivo (s*ocial behavior in a resident-intruder paradigm*).
Task3.4: analisi anatomopatologica verrà eseguita *ex vivo* sui cervelli dei ratti perfusi, affettati e usati per reazioni immunoistochimiche e colorazioni istologiche. Localizzeremo e quantificheremo i depositi cerebrali di Aβ. Valuteremo inoltre l'atrofia corticale misurando lo spessore corticale in diverse sedi (corteccia motoria, somatosensoriale, entorinale, peririnale) e comparandolo coi valori ottenuti dai cervelli di ratti controllo. Infine, valuteremo l'atrofia ippocampale comparando le dimensioni dell'ippocampo dorsale e ventrale in ratti LO-TLE rispetto a ratti controllo e misurando la densità cellulare per valutare la morte cellulare.

Facilities e personale coinvolto
Il presente progetto vede il coinvolgimento di 5 Unità, ciascuna delle quali svolge un ruolo fondamentale per lo svolgimento del progetto stesso. Essendo la LO-TLE è condizione piuttosto rara, solo una collaborazione multicentrica sarà in grado di reclutare in breve tempo la numerosità campionaria necessaria. In particolare, i referenti di U1, U3 e U4 hanno già raccolto casistiche consistenti di pazienti LO-TLE (~ 40 pazienti) e sono parte del GdS della LICE EPILESSIE LATE-ONSET. I referenti di U3 e U4 hanno già attivo un Comitato Etico specifico per lo studio e la raccolta di materiale biologico di pazienti con LOEU (BIONEURO2021 CER N: 3944/21 e ASG-MA-052 rispettivamente). **U1**, **U3** e **U4** si distinguono per un'ampia e consolidata esperienza e nella gestione delle epilessie in età adulta, supportata da team di neurologi, neurofisiologi e tecnici di neurofisiologia altamente specializzati. Presso ciascuna delle tre Unità cliniche è attivo un servizio di neuropsicologia clinica con una lunga esperienza specifica nella valutazione cognitiva dei pazienti con epilessia. U1 e U3 sono inoltre dotate di un laboratorio di neuroimmunologia dedicato che include una "neuro-biobanca" con una solida esperienza di ricerca nell'ambito dei biomarcatori di laboratorio trasversale a differenti ambiti neurologici. La pipeline di analisi dei dati di Neuroimaging è garantita da U1 grazie alla comprovata esperienza del PI e del suo team sul neuroimaging strutturale e funzionale nelle epilessie (22,30,31). U1, U2, U3 sono dotate di un servizio di Neuroradiologia dove è presente RM ad alto campo (3T), con protocolli dedicati per la caratterizzazione di pazienti con epilessia (32). U3 possiede anche un laboratorio di neurologia sperimentale specializzato nello studio della plasticità sinaptica in condizioni neurodegenerative, che dispone di quattro set-up per registrazioni elettrofisiologiche ex-vivo su modelli murini, possibilità di condurre test comportamentali e interventi chirurgici su diversi modelli sperimentali di malattie neurodegenerative presso lo stabulario dell'Università di Perugia. **U2** presenta una consolidata esperienza in modelli animali di crisi epilettiche e di epilessia, in particolare TLE, e in ricerca preclinica. Il laboratorio è dotato di sistemi di video-EEG per roditori e microscopi equipaggiati con software di acquisizione e analisi di immagini. UniMoRe dispone di un centro grandi strumenti dotato di microscopi confocali di ultima generazione, di uno stabulario specific pathogen free (SPF) e di uno stabulario convenzionale, 2 sale chirurgiche equipaggiate con macchine per anestesia, stanze per i trattamenti farmacologici e per i test comportamentali. **U5** è dotata di 3 postazioni completamente attrezzate per

registrazioni elettrofisiologiche del cervello isolato di cavia in vitro e di fettine di cervello, una sala operatoria per piccoli animali, un laboratorio di neuroanatomia attrezzato per preparati di immunoistochimica, immunofluorescenza.
Le Unità partecipanti, coordinate dal proponente dello studio, avranno una attiva comunicazione: tre incontri formali sono pianificati durante il corso del progetto.

METODI

WP1: Studio clinico

Arruolamento pazienti

Criteri di inclusione: **(a)** diagnosi di LO-TLE con esordio della prima crisi ≥ 50 anni di età. Questo limite di età è stato scelto in base a dati di letteratura che suggeriscono una inflessione nell'incidenza dell'epilessia intorno ai 50 anni (9). La diagnosi di TLE verrà formulata secondo le linee guida internazionali ILAE (33). **(b)** RMNc verrà eseguita come da protocollo clinico. Come sequenza indispensabile per poter eseguire le analisi di imaging avanzato è richiesta una sequenza T13D acquisita rispettando le raccomandazioni fornite dalla commissione neuroimmagini della ILAE(10). **(c)** valutazione NPS completa e punteggio al MMSE ≥ 26 entrambi eseguiti entro 4 settimane dalla diagnosi. La valutazione NPS avverrà secondo i protocolli clinici in essere presso U1, U3, U4 e in accordo con dati di letteratura in pazienti con epilessie tardive (11); **(d)** prelievo ematico acquisito entro 2 mesi dalla diagnosi di epilessia (4).
Criteri di esclusione: (a) pazienti con SE; (b) pazienti con epilessie focali ad esordio tardivo extratemporali; (c) pazienti che non possano sottoporsi alla RMNc; (d) pazienti con LO-TLE ad eziologia nota. Rientrano in questa categoria tutti i pazienti per i quali l'iter diagnostico per pratica clinica abbia dimostrato una eziologia strutturale, disimmune, infiammatoria o neurodegenerativa dell'epilessia.

Arruolamento controlli sani

Criteri di inclusione: (a) soggetti di età >50 anni; (b) diagnosi patologica remota negativa per malattie neurologiche, psichiatriche e patologie del sonno; (c) assenza di terapia cronica con farmaci psicotropi al momento della RMNc e del prelievo ematico.
Criteri di esclusione: (a) controindicazioni assolute all'esecuzione della RMNc.

Prelievo e analisi biomarcatori di Neurodegenerazione

I prelievi di siero (2cc per prelievo di sangue) verranno acquisiti al momento dell'arruolamento (T1) e successivamente a una seconda visita che avverrà a distanza di almeno 6 mesi dalla precedente (T2). Per i pazienti reclutati retrospetticamente verranno utilizzati i prelievi ematici conservati presso la NeuroBioBanca di U1 e U3. I prelievi sierici verranno analizzati attraverso test immuno-enzimatico (ELISA kit) per la determinazione dei seguenti biomarcatori: Aβ1-42, Aβ1-42/1-40 ratio, p-tau, t-tau, NfL. Gli stessi biomarcatori verranno analizzati nei gruppi di controllo. Per i controlli si eseguirà un solo dosaggio attraverso prelievo sierico eseguito al momento dell'arruolamento.

Analisi dei dati di RMNc

Le analisi dei dati di RMNc seguiranno una pipeline consolidata presso U1 (22,31). Il software FreeSurfer v7.3 (34) verrà utilizzato per ottenere stime dello spessore corticale e volumi subcorticali per ciascun paziente e controllo sano. In aggiunta verrà applicata una pipeline dedicata per eseguire la parcellazione automatica dei sottocampi dell'ippocampo e dell'amigdala (35,36). Dopo adeguate procedure di armonizzazione (31) dei valori di spessore corticale e volume sottocorticale tra pazienti e controlli (necessarie per ridurre il bias legato alle acquisizioni di risonanza avvenute con scanner diversi), per ciascuna misura e ciascuna area cerebrale si stimeranno gli z-score utilizzando i valori ottenuti nella popolazione di controllo.

Raccolta Dati

Utilizzando una apposita eCRF per ciascun paziente reclutato e per entrambi i tempi dello studio (T1 e T2) verranno raccolti i seguenti dati: età, genere, comorbidità e terapie concomitanti, frequenza/tipo di crisi, tipo/durata e dosaggio dei farmaci anti-crisi utilizzati, tipo/durata e dosaggio di ogni altra terapia utilizzata, risultati degli studi neurofisiologici (pattern critico e intercritico), punteggio MMSE, punteggi grezzi della valutazione NPS, ora/data e risultati dei prelievi sierici del dosaggio dei biomarcatori in studio e i dati derivati dalle analisi delle immagini di RMNc. Grazie a un programma dedicato (https://www.project-redcap.org) che consente la condivisione della raccolta dati, U1, U3 e U4 provvederanno a riempire progressivamente le informazioni per ogni paziente arruolato. U5 utilizzerà il medesimo programma per raccogliere le informazioni riguardanti le citochine. Infine, la stessa eCRF verrà utilizzata da U1 per raccogliere le informazioni dei controlli sani: età, genere, ora/data, risultati dei prelievi sierici del dosaggio dei biomarcatori in studio, dati grezzi NPS e risultati delle analisi dei dati di RMNc.

Analisi statistica dati clinici e di neuroimaging

L'analisi statistica verrà condotta mediante l'utilizzo di software (Matlab, R, SPSS) e verrà centralizzata presso U1. L'analisi si comporrà di diverse fasi:

1. Statistiche descrittive: test parametrici e non parametrici verranno utilizzati per valutare la differenza tra le variabili demografiche tra i pazienti e i controlli.
2. Dati di imaging: i dati ottenuti dal post-processing delle sequenze T13D verranno inizialmente analizzati con modelli lineari generali (glm) così da osservare le differenze morfometriche corticali e sottocorticali tra i pazienti e i controlli al tempo T1 (analisi *between subjects*). Successivamente, un protocollo a misure ripetute verrà applicato al fine di valutare, nei soli pazienti, i pattern di atrofia che si possono essere manifestati tra T1 e T2 (analisi *within subjects*).
3. Dati biologici e neuropsicologici: gli stessi modelli applicati ai dati di imaging verranno eseguiti per testare prima le differenze tra i dosaggi di biomarcatori di neurodegenerazione, citochine e le valutazioni cognitive tra i pazienti e i controlli (analisi *between subjects*). Successivamente, verranno misurate eventuali modificazioni emerse in follow-up nel solo gruppo LO-TLE (analisi *within subjects*). Ogni test verrà corretto per confronti multipli, così da controllare la possibilità di incorrere in errori del 1° tipo.

WP2: Studio preclinico – neuroinfiammazione

Analisi delle citochine

Isolamento PBMC: I PBMC verranno isolati dal sangue intero utilizzando un gradiente di densità discontinua (Lymphoprep, Nycomed) e messi in coltura per 6 ore (2×10^6 in 1ml di medium)(6).

Immunoassay: l'analisi del surnatante derivato dalle colture dei PBMC (vedi sopra) verrà effettuata in duplicato attraverso il saggio immunoenzimatico Luminex High Performance and ELLA (Biotch-ne) (6). Il loro eluato sarà infuso attraverso il sistema arterioso nel preparato di cervello isolato di cavia.

Animali

Tutti gli esperimenti del WP2 saranno condotti su cavie Hartley adulte femmine. Dopo la somministrazione intraperitoneale (ip) di anestetico (Tiopentale) si perfonde l'animale per via intracardiaca con una soluzione salina complessa. Successivamente alla decapitazione dell'animale, il cervello viene delicatamente rimosso. Una cannula in polietilene viene inserita nell'arteria basilare e le arterie carotidi e ipofisarie vengono chiuse al fine di assicurare una perfusione fisiologica del cervello con fluido cerebrospinale artificiale modificato. Completate le operazioni di ripristino del circuito vascolare, il preparato passa da una temperatura di 15 °C ad una di 32 °C ad una velocità di 0.2 °C/min(37).

Registrazioni elettrofisiologiche

Registrazione elettrofisiologiche extracellulari verranno effettuate nella corteccia piriforme, corteccia entorinale mediale e nella regione ippocampale (giro dentato e/o CA1) al fine di monitorare eventuali modifiche dell'eccitabilità neuronale e/o l'insorgenza di attività epilettiforme interictale e ictale indotta dalla perfusione di mediatori infiammatori isolati dai PBMC dei pazienti affetti da LO-TLE (6). La stimolazione del tratto laterale olfattorio (LOT) con un elettrodo bipolare stimolante, permetterà di registrare potenziali evocati nelle aree di interesse al fine di verificare la vitalità e il mantenimento delle connessioni sinaptiche all'interno del preparato.

WP3: Studio preclinico – modello animale LO-TLE

Animali

Ratti Sprague-Dawley (*Rattus Norvegicus*, 12 settimane) perverranno presso il Centro Servizi Stabulario Interdipartimentale (CSSI) dell'Università di Modena e Reggio Emilia e presso il Laboratorio di Neurologia Sperimentale dell'Università degli Studi di Perugia e saranno stabulati in gabbia nel rispetto dei limiti di spazio consentiti dalla legge, saranno mantenuti a ciclo luce/buio standard, e riceveranno cibo ed acqua *ad libitum*. Ogni sforzo sarà messo in atto per ridurre il numero di animali da usare e la loro sofferenza.

Induzione dello SE

Per l'induzione dello SE, 29 ratti di 6 mesi riceveranno iniezioni ip di kainato ogni ora fino allo sviluppo dello SE (8); la dose iniziale di 3.0 mg/kg verrà ridotta a 1.5 mg/kg quando il ratto mostrerà attività epilettica di stadio ≥3 (scala di Racine (12)). Una soluzione di diazepam (5 mg/kg, i.p.) verrà iniettata entro 1 ora dall'insorgenza dello SE per standardizzarne la durata dello SE e al tempo stesso migliorare la sopravvivenza degli animali. Ratti non epilettici (N=14) riceveranno tutte le procedure sopra descritte ad eccezione del kainato, che sarà sostituito da soluzione salina (1 ml/kg; i.p.). Tutti i ratti trattati con kainato che non entreranno in SE verranno esclusi dallo studio.

Video-registrazioni per monitoraggio crisi epilettiche

Registrazioni video saranno condotte in cronico per monitorare la comparsa e la frequenza delle crisi epilettiche. Le crisi saranno classificate secondo una scala di Racine (12) adattata al modello di TLE indotto da SE.

Prelievi ematici

Il sangue verrà prelevato dalla vena laterale della coda da ratti anestetizzati con isoflurano (induzione 4%; mantenimento 1-2%). Ogni ratto subirà 2 prelievi effettuati a distanza di circa 4 settimane; ad ogni prelievo si collezionerà un volume massimo di sangue di 1 ml in accordo con le raccomandazioni del *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) relativamente ai protocolli standard per i prelievi di sangue dalla vena della coda. I campioni di sangue verranno mantenuti a -20 °C e successivamente analizzati per i dosaggi di Aβ e NfL utilizzando i medesimi Kit dei pazienti LO-TLE. È infatti documentata una identità tra *Homo Sapiens* e *Rattus Norvegicus* superiore al 90% per la Aβ 1-42, Aβ 1-40 ed i NfL (38).

Test comportamentali

Per tutti i test comportamentali, i movimenti dell'animale verranno registrati mediante il sistema di video *tracking* AnyMaze (San Diego Instruments, http://www.anymaze.com).

- ***Open field test*:** Gli animali verranno collocati al centro dell'arena e lasciati liberi di muoversi per 10 minuti. La distanza percorsa verrà misurata e considerata come un indicatore di attività di locomozione.
- ***Object Place Recognition*:** Gli animali verranno posti in un'arena per 5 min per abituarli all'apparato. Il giorno successivo, i ratti saranno posti nell'arena contenente 2 oggetti identici posti sulla linea

centrale e distanti fra loro 20 cm. Dopo 24 ore, l'animale sarà posto nell'arena per 5 minuti con uno dei due oggetti nella posizione iniziale (*old place object*), l'altro spostato casualmente verso uno dei due angoli dell'arena (*new place object*). Il tempo di esplorazione degli oggetti nelle diverse situazioni verrà registrato e usato come indicatore di memoria spaziale.

- ***Elevated Plus maze (EPM) test*:** La piattaforma EPM è costituita da una zona centrale, due braccia aperte e due braccia chiuse. Gli animali verranno collocati nella zona centrale e lasciati in libera esplorazione sulla piattaforma per 5 minuti. Verrà misurata la percentuale di tempo trascorso ad esplorare le tre zone (braccia aperte, chiuse e area centrale) e il tempo trascorso nelle braccia chiuse/aperte sarà usato come indicatore di ansia.
- ***Social behavior in a resident-intruder paradigm*:** Durante la fase di ambientamento, l'animale testato (residente) verrà collocato in un'arena sperimentale per 30 minuti. Successivamente, l'animale "intruso" verrà introdotto nell'arena, dove i due animali si incontreranno per la prima volta, e l'interazione sociale tra i due (residente-intruso) verrà registrata per 5 minuti. Il comportamento sociale verrà classificato in diverse categorie: comunicativo, individuale, sessuale, di aggressione e difesa. Il numero di comportamenti assunti e il tempo medio per ogni categoria verrà calcolato insieme al tempo di interazione totale.

Prelievo del cervello e istologia/immunoistochimica

Al termine dei test comportamentali, i ratti anestetizzati subiranno la perfusione intracardiaca con fisiologica seguita da **paraformaldeide** (**PFA**) fredda; il cervello verrà estratto, mantenuto in PFA overnight a 4 °C, e poi trasferito in soluzione di saccarosio al 30%. I cervelli verranno congelati a -80 °C, affettati al criostato (spessore 30 μm) e le fettine verranno utilizzate per colorazioni istologiche **Ematossilina-Eosina** (**H-E**) o per reazioni immunoistochimiche con anticorpo primario anti-Aβ (1:100, codice M0872, DAKO; (39))

Analisi anatomopatologica

Lo spessore della corteccia (motoria, somatosensoriale, entorinale e piriforme) e i depositi di Aβ verranno misurati su immagini acquisite con microscopio diritto Eclipse Ci-L (Nikon Instruments) mediante software NIS Elements BR (Nikon).

Statistica

Per entrambi i due WP preclinici (WP2, WP3), l'analisi statistica verrà eseguita utilizzando il software Origin 2022 (OriginLab, USA). I dati verranno presentati come media ± errore standard dalla media (SEM). Dati dei ratti LO-TLE verranno comparati con dati acquisiti da fettine di ratti controllo (analisi *between subjects*); i dati ottenuti a T2 verranno confrontati coi dati raccolti a T0 (per test cognitivi) o a T1 (per valori ematici; analisi *within subjects*). I valori saranno considerati significativamente diversi per $p<0.05$.

RISULTATI ATTESI E RILEVANZA CLINICA

Sulla base dei risultati preliminari, ci aspettiamo di osservare nei LO-TLE **al tempo T1** pattern morfometrici (spessore corticale e volume delle strutture cortico/sottocorticali) diversi a seconda del profilo biochimico e biologico emerso dal dosaggio ematico dei biomarcatori di AD e dei mediatori infiammatori. Nello specifico, confidiamo di confermare che i pazienti LO-TLE con normali valori sierici di Aβ e tau (p-tau e/o t-tau) presentano misure morfometriche non dissimili da soggetti sani di pari età. Di contrasto, ci aspettiamo che i LO-TLE con alterazioni sieriche della Aβ e/o tau all'esordio della malattia abbiano un pattern di atrofia cortico-sottocorticale significativamente diverso da individui sani, confermando i dati di letteratura che identificano questi soggetti come "epilessia prodromica per AD" (18). Lo studio trasversale delle valutazioni cliniche e l'identificazione di mediatori infiammatori derivati dai pazienti permetteranno di evidenziare profili di espressione delle citochine pro-infiammatorie differenti tra LO-TLE e controlli sani. Inoltre, attraverso lo studio elettrofisiologico su cervello isolato di cavia, ci aspettiamo di identificare quali bio-

marcatori possono avere un ruolo diretto nella patogenesi delle crisi consentendo di chiarire la cascata di eventi patogenetici che portano dall'epilessia alla neurodegenerazione. Considerato infine la dettagliata caratterizzazione fenotipica elettro-clinica e neuropsicologica dei pazienti reclutati otterremo di stratificare la popolazione LO-TLE in diversi gruppi affiancando al dato biologico (marcatori per AD, citochine, NfL) e di neuroimaging, aspetti clinici e cognitivi e fornendo ai clinici potenziali nuovi algoritmi per un corretto inquadramento diagnostico e prognostico dei LO-TLE. La valutazione longitudinale dei pazienti reclutati (**Tempo T2**) con la ripetizione dei biomarcatori sierici e della RMNc, ci consentirà di caratterizzare ulteriormente la popolazione oggetto di studio permettendo di fornire predizioni sull'evoluzione naturale dei sottogruppi di LO-TLE emersi da T1 rispetto a una popolazione di controllo anch'essa studiata longitudinalmente.

La creazione di un **modello murino di LO-TLE** ci permetterà di studiare l'effetto delle crisi ad esordio tardivo sul piano cognitivo-comportamentale e di biomarcatori biologici attraverso un approccio longitudinale. Sebbene fortemente ambizioso, ci aspettiamo di replicare sul modello animale il piano sperimentale proposto nell'uomo in modo da consentire parallelismi uomo/animale e così contribuire a comprendere i meccanismi patogenetici alla base del ricorrere di crisi ad esordio tardivo e della conseguente neurodegenerazione. Grazie all'esecuzione di un dosaggio sierico temporalmente vicino all'induzione dello SE nel modello animale, potremo ottenere informazioni sul processo di epilettogenesi. Attraverso l'analisi *post-mortem* dello spessore corticale e della quantificazione dei depositi di Aβ, ci aspettiamo di ottenere una mappatura delle aree cerebrali murine più soggette a neurodegenerazione e correlarle con il dato umano.

Il presente progetto consentirà di ampliare le conoscenze della patogenesi delle LO-TLE. Nella pratica clinica, se raggiunti i suoi obiettivi, permetterà di a) riconoscere biomarcatori periferici da includere in modo sistematico nel work-out diagnostico delle epilessie ad esordio tardivo, e b) identificare differenti sottotipi di LO-TLE, con caratteristiche ed evoluzione diverse e riconoscere i soggetti più a rischio di evoluzione in AD o MCI.

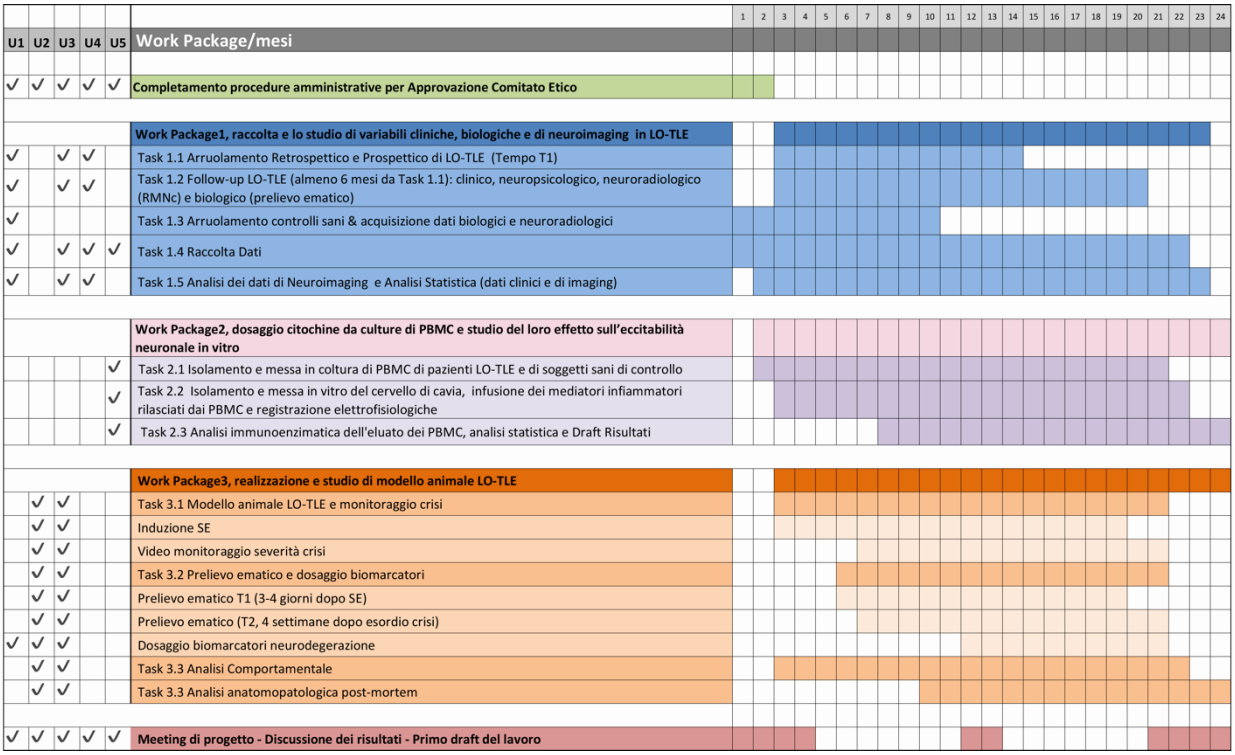
Bibliografia

1. Kamondi A, Grigg-Damberger M, Löscher W, Tanila H, Horvath AA. Epilepsy and epileptiform activity in late-onset Alzheimer disease: clinical and pathophysiological advances, gaps and conundrums. Nature Reviews Neurology. Nature Research; 2024.
2. DiFrancesco JC, Isella V, Licciardo D, Crivellaro C, Musarra M, Guerra L, et al. Temporal lobe dysfunction in late-onset epilepsy of unknown origin. Epilepsy and Behavior. 2021 Apr 1;117.
3. Romoli M, Sen A, Parnetti L, Calabresi P, Costa C. Amyloid-β: a potential link between epilepsy and cognitive decline. Vol. 17, Nature Reviews Neurology. Nature Research; 2021. p. 469–85.
4. Costa C, Romoli M, Liguori C, Farotti L, Eusebi P, Bedetti C, et al. Alzheimer's disease and late-onset epilepsy of unknown origin: two faces of beta amyloid pathology. Neurobiol Aging. 2019 Jan 1;73:61–7.
5. Kaestner E, Reyes A, Chen A, Rao J, Macari AC, Choi JY, et al. Atrophy and cognitive profiles in older adults with temporal lobe epilepsy are similar to mild cognitive impairment. Brain. 2021 Feb 12;144(1):236–50.
6. Librizzi L, Vila Verde D, Colciaghi F, Deleo F, Regondi MC, Costanza M, et al. Peripheral blood mononuclear cell activation sustains seizure activity. Epilepsia. 2021 Jul;62(7):1715–28.
7. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. Nat Rev Neurol. 2019 Aug 1;15(8):459–72.
8. Hattiangady B, Kuruba R, Shetty AK. Acute Seizures in Old Age Leads to a Greater Loss of CA1 Pyramidal Neurons, an Increased Propensity for Developing Chronic TLE and Severe Cognitive Dysfunction. Vol. 2, Aging and Disease •. 2011.
9. Lezaic N, Roussy J, Masson H, Jetté N, Keezer MR. Epilepsy in the elderly: Unique challenges in an increasingly prevalent population. Epilepsy & Behavior. 2020 Jan;102:106724.

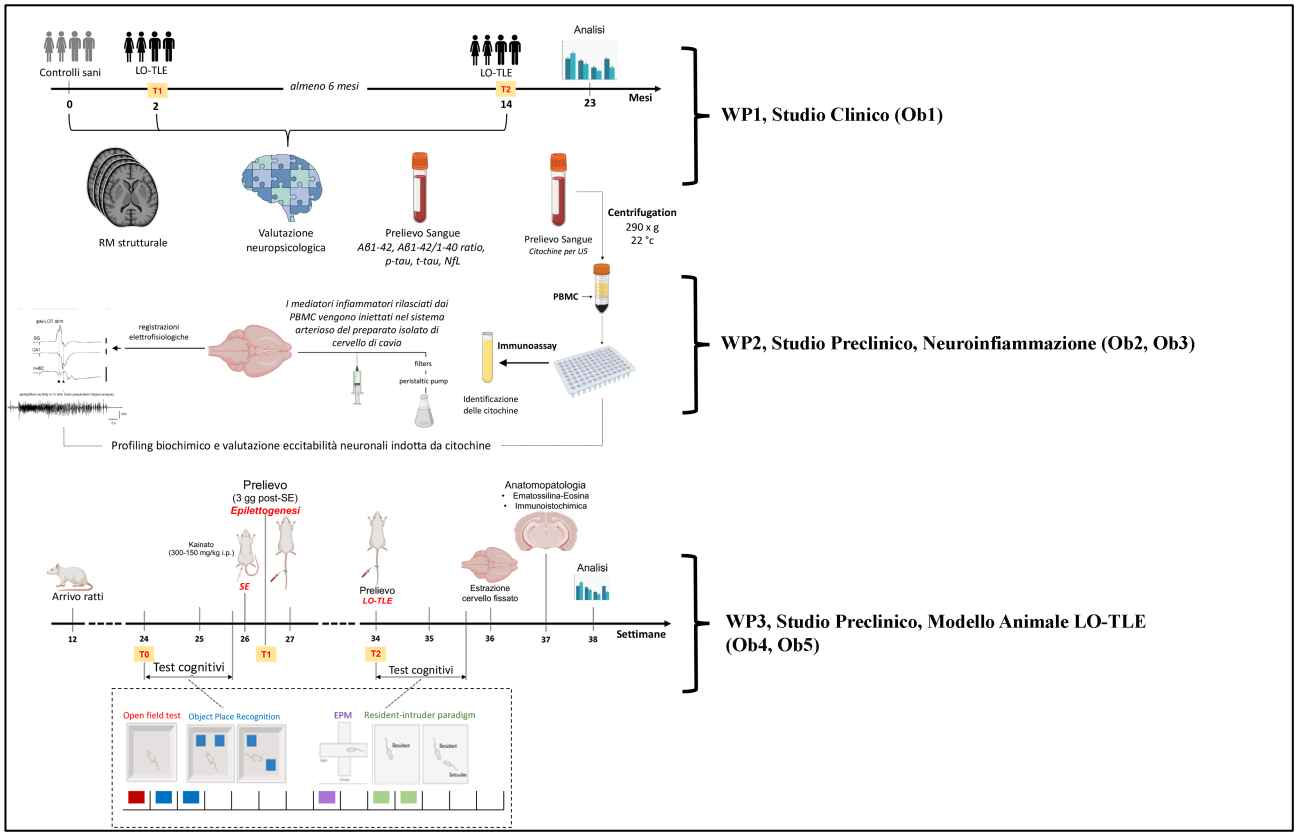
10. Bernasconi A, Cendes F, Theodore WH, Gill RS, Koepp MJ, Hogan RE, et al. Recommendations for the use of structural magnetic resonance imaging in the care of patients with epilepsy: A consensus report from the International League Against Epilepsy Neuroimaging Task Force. Epilepsia. 2019;60(6).
11. Reyes A, Kaestner E, Edmonds EC, Christina Macari A, Wang ZI, Drane DL, et al. Diagnosing cognitive disorders in older adults with epilepsy. Epilepsia. 2021 Feb;62(2):460–71.
12. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1972 Mar;32(3):281–94.
13. Rizzello E, Pimpinella D, Pignataro A, Titta G, Merenda E, Saviana M, et al. Lamotrigine rescues neuronal alterations and prevents seizure-induced memory decline in an Alzheimer's disease mouse model. Neurobiol Dis. 2023 Jun;181:106106.
14. Jellinger KA. Recent update on the heterogeneity of the Alzheimer's disease spectrum. J Neural Transm. 2022 Jan 17;129(1):1–24.
15. Sen A, Jette N, Husain M, Sander JW. Epilepsy in older people. Lancet. 2020 Feb 29;395(10225):735–48.
16. Lü Y, Liu S, Yu W. The causes of new-onset epilepsy and seizures in the elderly. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016 Jun;1425.
17. Lühdorf K, Jensen LK, Plesner AM. Etiology of Seizures in the Elderly. Epilepsia. 1986 Aug 5;27(4):458–63.
18. Hickman LB, Stern JM, Silverman DHS, Salamon N, Vossel K. Clinical, imaging, and biomarker evidence of amyloid- and tau-related neurodegeneration in late-onset epilepsy of unknown etiology. Vol. 14, Frontiers in Neurology. Frontiers Media SA; 2023.
19. Johnson EL, Krauss GL, Kucharska-Newton A, Albert MS, Brandt J, Walker KA, et al. Dementia in late-onset epilepsy. Neurology. 2020 Dec 15;95(24).
20. Huang L, Fu C, Li J, Peng S. Late-onset epilepsy and the risk of dementia: a systematic review and meta-analysis. Aging Clin Exp Res. 2022 Aug 15;34(8):1771–9.
21. Tang T, Zhang R, Pan X. Meta-analysis of the risk of dementia in elderly patients with late-onset epilepsy. Clin Neurol Neurosurg. 2022 Dec;223:107499.
22. Ballerini A BNCCCATMVGBRMMGMSSGGPMONMSZGVA. Late-onset temporal lobe epilepsy differs from mild cognitive impairment: insights from brain atrophy and CSF neurodegenerative biomarkers. submitted.
23. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. Nat Rev Neurol [Internet]. 2011;7(1):31–40. Available from: http://www.nature.com/articles/nrneurol.2010.178
24. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. Trends Neurosci. 2013 Mar;36(3):174–84.
25. Giovannini G, Meletti S. Fluid Biomarkers of Neuro-Glial Injury in Human Status Epilepticus: A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2023 Aug 7;24(15):12519.
26. Giovannini G, Bedin R, Orlandi N, Turchi G, Cioclu MC, Biagioli N, et al. Neuro-glial degeneration in Status Epilepticus: Exploring the role of serum levels of Neurofilament light chains and S100B as prognostic biomarkers for short-term functional outcome. Epilepsy & Behavior. 2023 Mar;140:109131.
27. Gallingani C, Carbone C, Tondelli M, Zamboni G. Neurofilaments Light Chain in Neurodegenerative Dementias: A Review of Imaging Correlates. Brain Sci. 2024 Mar 13;14(3):272.
28. Costa C, Parnetti L, D'Amelio M, Tozzi A, Tantucci M, Romigi A, et al. Epilepsy, amyloid-β, and D1 dopamine receptors: a possible pathogenetic link? Neurobiol Aging. 2016 Dec 1;48:161–71.
29. Galovic M, van Dooren VQH, Postma TS, Vos SB, Caciagli L, Borzì G, et al. Progressive Cortical Thinning in Patients With Focal Epilepsy. JAMA Neurol. 2019 Oct 1;76(10):1230.
30. Ballerini A, Talami F, Molinari MA, Micalizzi E, Scolastico S, Biagioli N, et al. Exploring the relationship between amygdala subnuclei volumes and cognitive performance in left-lateralized temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis. Epilepsy & Behavior. 2023 Aug;145:109342.

31. Ballerini A, Tondelli M, Talami F, Molinari MA, Micalizzi E, Giovannini G, et al. Amygdala subnuclear volumes in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis and in non-lesional patients. Brain Commun. 2022 Sep 1;4(5).
32. Vaudano AE, Ballerini A, Zucchini F, Micalizzi E, Scolastico S, Talami F, et al. Impact of an optimized epilepsy surgery imaging protocol for focal epilepsy: A monocentric prospective study. Epileptic Disorders. 2023 Feb 17;25(1):45–56.
33. Wirrell EC, Nabbout R, Scheffer IE, Alsaadi T, Bogacz A, French JA, et al. Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. Epilepsia. 2022 Jun 3;63(6):1333–48.
34. Fischl B. FreeSurfer. Vol. 62, NeuroImage. 2012. p. 774–81.
35. Iglesias JE, Augustinack JC, Nguyen K, Player CM, Player A, Wright M, et al. A computational atlas of the hippocampal formation using ex vivo, ultra-high resolution MRI: Application to adaptive segmentation of in vivo MRI. Neuroimage. 2015 Jul;115:117–37.
36. Saygin ZM, Kliemann D, Iglesias JE, van der Kouwe AJW, Boyd E, Reuter M, et al. High-resolution magnetic resonance imaging reveals nuclei of the human amygdala: manual segmentation to automatic atlas. Neuroimage. 2017 Jul;155:370–82.
37. de Curtis M, Biella G, Buccellati C, Folco G. Simultaneous investigation of the neuronal and vascular compartments in the guinea pig brain isolated in vitro. Brain Research Protocols. 1998 Nov;3(2):221–8.
38. Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid βA4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4. Eur J Biochem. 1991 Oct 3;201(1):61–9.
39. Oshima T, Kater MSJ, Huffels CFM, Wesseling EM, Middeldorp J, Hol EM, et al. Early amyloid-induced changes in microglia gene expression in male <scp>APP</scp> / <scp>PS1</scp> mice. J Neurosci Res. 2024 Mar 21;102(3).

Piano temporale del Progetto (Schema di GANTT)



Sintetico schema grafico del progetto



Modulo Piano Economico

	COSTO TOTALE DEL PROGETTO	**quota richiesta a Fondazione LICE**	**quota cofinanziata**	**Ente cofinanziatore**
Personale di ricerca	118.582,00€	0,00€	118.582,00€	-AOU Modena; -Università Modena e Reggio-Emilia; -Università degli Studi di Perugia; -IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano -Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza
Attrezzature	0,00€	0,00€	0,00€	-
Materiali di consumo	44.144,00 €	37.844,00€	6.300,00 €	IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano
Servizi informatici	0,00€	0,00€	0,00€	-
Partecipazioni a congressi e collaborazioni (max 10%)	2.156,00€	2.156,00€	0,00€	-
Costi di pubblicazione	2.800,00€	0,00 €	2.800.00€	IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano
Overheads **(max 10%)**	0,00€	0,00€	0,00€	-
TOTALE	167.682,00€	40.000,00€	127.682,00€	

Personale di ricerca:

- 2 neurologi (2 mesi/anno per 2 anni): 36.000€ (quota co-finanziata AOU Modena e Fondazione IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza)
- 1 biologo (3 mesi/anno per 2 anni): 18.000 € (quota co-finanziata AOU Modena)
- 1 biologo (3 mesi/anno per 2 anni): 18.000 € (quota co-finanziata Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano)
- 1 Professore Associato (1 mese/anno per 2 anni): 14.291 € (quota co-finanziata Università di Modena e Reggio-Emilia)
- 1 Professore Associato (1 mese/anno per 2 anni): 14.291 € (quota co-finanziata Università di Perugia)
- 1 tecnico di laboratorio (3mesi/anno/2anni): 18.000 € (quota co-finanziata Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano)

Materiali di consumo:

- Kit di dosaggio dei biomarcatori Uomo/Animali: 172 (130 uomo, 42 animali) campioni da analizzare per i 4 biomarcatori in studio: 17.400 € (13.800€ richiesti a Fondazione LICE; 3.600€ Cofinanziata da Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano).
- Kit di dosaggio cito-chemochine Uomo: 130 campioni da analizzare per cito-chemochine in studio: 10.000 € (quota richiesta a Fondazione LICE)
- Costi acquisto, trasporto animali sperimentali (N=43): 5.416 € (quota richiesta a Fondazione LICE)
- Costo mantenimento stabulario (12 settimane per 43 ratti prima di induzione SE; 12 settimane per 26 ratti dopo induzione SE): 6.628€ (quota richiesta a Fondazione LICE).
- Costo autorizzazione comitato etico animale: richiesta iniziale + valutazione finale: 1.000€ (quota richiesta a Fondazione LICE).
- Costi per anticorpo verso beta-amiloide per analisi post-mortem: 1.000€ (quota richiesta a Fondazione LICE).
- Costi per acquisto cavie (N=30), trasporto e mantenimento: 2.700€ (quota Cofinanziata da Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano).

Partecipazioni a congressi e collaborazioni:

Divulgazione dei risultati scientifici a congressi nazionali/internazionali di epilettologia e neuroscienze (N=2 iscrizioni) (2.156€ richieste a Fondazione Lice).

Costi di pubblicazione:

Costi per una pubblicazione su riviste open-access, 2.800€ (quota cofinanziata da Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano).