

Roma, 25/06/2019

## **Epilessia e malformazioni corticali**

### *Tecniche innovative per una migliore comprensione della patogenesi e lo sviluppo di trattamenti neoadiuvanti*

Le Displasie Corticali Focali (FCD) sono la principale causa di epilessia intrattabile e, non essendo ancora del tutto nota l'eziologia genetica delle FCD, i target farmacologici sono spesso generici e ad oggi il miglior trattamento risulta quello chirurgico. Recenti evidenze hanno dimostrato che le FCD possono essere causate da mutazioni somatiche de novo, in particolare di geni coinvolti nel pathway di mTOR. Inoltre, è noto che l'epilessia è causata da una disfunzione della trasmissione GABAergica che determina una condizione di ipereccitabilità neuronale ed è stato ipotizzato che le FCD presentano caratteristiche di corteccia immatura, mostrando un'alterazione della trasmissione GABAergica, con sbilanciamento proprio verso la componente eccitatoria.

L'obiettivo di questo progetto è di ricercare, attraverso un approccio con tecniche di sequenziamento genico, mutazioni somatiche in pazienti con malformazioni corticali sottoposti a chirurgia dell'epilessia. Lo scopo quindi è di comprendere meglio i meccanismi patogenetici in cui sarebbero coinvolti i geni che hanno una bassa frequenza nella popolazione generale e per i quali, al momento, ci sono pochi modelli sperimentali.

Il campione chirurgico sarà quindi analizzato per studiare le proprietà dei recettori GABAergici nei diversi tipi di malformazioni corticali con particolare attenzione alle correnti eccitatorie e inibitorie del GABA, e i risultati saranno correlati con l'età dei pazienti e alla gravità dell'epilessia.

Negli ultimi anni la principale limitazione per gli studi elettrofisiologici dell'attività cerebrale è stata correlata all'impossibilità di mantenere vivo il tessuto cerebrale asportato; di conseguenza vi erano spesso solo poche ore a disposizione per l'analisi del tessuto. L'utilizzo di tessuto

cerebrale umano nella coltura organotipica permetterebbe invece di mantenere il tessuto cerebrale in vitro senza deterioramento per diverse settimane. Infatti, con questa tecnica è possibile mantenere l'attività epilettica e l'eccitabilità dei tessuti invariata, fino a 6 settimane. Saranno arruolati pazienti con epilessia farmaco-resistente strutturale, dovuta a FCD, di età compresa tra 0 e 18 anni. Attualmente, circa 50 pazienti all'anno vengono sottoposti a valutazione pre-chirurgica presso il nostro ospedale e, di questi, 20 pazienti all'anno vengono sottoposti ad intervento chirurgico.

Tutti i pazienti saranno sottoposti al protocollo diagnostico convenzionale per selezionare i tempi e il tipo di trattamento. Inoltre, saranno applicate le seguenti procedure di studio:

- raccolta di informazioni sul fenotipo clinico (caratteristiche cliniche, di neuroimaging e neuropatologiche secondo la classificazione ILAE) in un database per consentire il raggruppamento di pazienti con fenotipo simile in sottoinsiemi, in modo tale da facilitare l'identificazione delle basi genetiche condivise e la correlazione genotipo-fenotipo;
- classificazione istopatologica delle lesioni (laminazione anormale, organizzazione colonnare, neuroni displastici, cellule balloniformi e gliosi) e identificazione di campioni con evidenza di alterazioni di mTOR / PI3K / AKT pathway.
- analisi immunohistochimica per caratterizzare le alterazioni nella composizione cellulare e i cambiamenti reattivi (ad esempio macchie per NeuN, Neurofilamento, proteina fosforibosomale-S6 ecc.).
- analisi genetica per l'identificazione di CNV di grandi dimensioni (> 100 kb).

Per i soggetti per i quali non sarà rilevata alcuna CNV somatica, verranno eseguite le seguenti ulteriori indagini genetiche per cercare altri tipi di mutazioni somatiche:

- 1) sequenziamento NGS mirato su geni che codificano per proteine di segnalazione di mTOR / PI3K / AKT;

2) nei casi negativi alle precedenti indagini genetiche, sequenziamento esomico (WES) sia su tessuto cerebrale sia su campione ematico, per ricercare mutazioni somatiche in altri geni oltre a quelli già identificati dell' mTOR / PI3K / AKT pathway.

Saranno inoltre eseguite registrazioni di patch-clamp sul tessuto cerebrale per lo studio sia delle correnti gabaergiche inibitorie ed eccitatorie (IGABA e EGABA). Le registrazioni saranno eseguite anche su microtrapianti di tessuto cerebrale di pazienti FCD in ovociti di *Xenopus* per caratterizzare la corrente EGABA e affinità per il neurotrasmettitore.

L'obiettivo finale del progetto è migliorare l'outcome dei pazienti con epilessia mediante una migliore conoscenza della patogenesi dell'epilessia nelle FCD. Se l'ipotesi di una disregolazione focale del GABA nelle epilessie chirurgiche fosse verificata, un nuovo trattamento neo-adiuvante, ad esempio con il Bumetanide, che è un modulatore del GABA, potrebbe diventare un'opzione valida per migliorare l'outcome chirurgico. Lo stesso potrebbe essere per nuovi farmaci emergenti ad azione sul pathway di mTOR.

Federico Vigevano

Nicola Specchio