



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
IN SCIENZE BIOMEDICHE**

Direttore Prof. Eusebio Tolu

**INDIRIZZO IN FISIOLOGIA, FARMACOLOGIA, MORFOLOGIA
E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO**

XXIV CICLO

***La stimolazione elettrica trigeminale modifica
l'espressione genica di c-Fos e diminuisce le crisi
epilettiche nel ratto***

Tutor:

Prof. Eusebio Tolu

Tesi di dottorato di:

Dr.ssa Silvia Deriu

Anno Accademico

2010 - 2011

INDICE

SOMMARIO.....	4
INTRODUZIONE.....	8
Proteina c-Fos	8
Stimolazione vagale ed epilessia	12
– Possibili meccanismi di azione	14
– Espressione della proteina c-Fos dopo stimolazione vagale.....	17
Nervo trigemino	20
– Sistema trigeminale sensitivo.....	21
– Nucleo mesencefalico.....	23
– Nucleo sensitivo principale	24
– Nucleo orale	24
– Nucleo interpolare	25
– Nucleo caudale	26
Stimolazione trigeminale	27
– Studi nell’animale	28
– Efficacia della stimolazione bilaterale	29
– Studi nell’uomo	30
– Possibili meccanismi di azione	34
OBIETTIVI.....	36
MATERIALI E METODI	37

– Animali ed operazione chirurgica	37
– Perfusione ed Immunoistochimica (IHC)	38
– Stimolazione e somministrazione di Pentilentetrazolo	40
RISULTATI	42
– Area somatosensitiva, amigdala e nucleo endopiriforme	42
– Nuclei trigeminali	43
– Analisi comportamentale	44
DISCUSSIONE	45
FIGURE.....	53
BIBLIOGRAFIA	61

SOMMARIO

L'epilessia è una patologia neurologica cronica, che colpisce circa il 3% della popolazione generale (Hauser et al.,1992). La terapia dell'epilessia è, in prima istanza, farmacologia. Tuttavia un terzo dei pazienti è refrattario al trattamento con più farmaci oppure presenta inaccettabili effetti collaterali. Tali pazienti sono quindi candidati a trattamenti non farmacologici, quali la resezione chirurgica del focolaio o la stimolazione del nervo vago (VNS). La resezione chirurgica del focolaio, non è attuabile nel 25-40% dei pazienti farmaco-resistenti (Kwan et al.,2000). In tali casi, la VNS è l'unica tecnica di neuro modulazione superficiale al momento riconosciuta come terapia palliativa nell'epilessia farmaco resistente (EPFR). A fronte di una documentata efficacia (40% di riduzione delle crisi nel 30-40% dei pazienti) (Ben-Menachem, 1994), esistono fattori limitanti a questo trattamento, quali i costi del materiale da impiantare a dimora e l'impossibilità alla stimolazione bilaterale a discapito di una maggiore inibizione, a causa del pattern di innervazione e di conseguenza degli effetti autonomici che ne conseguirebbero per via del controllo cardiaco e viscerale che il nervo esercita. Per questa ragione, l'uso di un altro nervo cranico sprovvisto della componente viscerale, tipica del vago, potrebbe essere efficace nella riduzione delle crisi epilettiche e si assocerebbe in minor misura a effetti collaterali.

È stato recentemente dimostrato, che la stimolazione unilaterale della diramazione infraorbitaria del nervo trigemino riduce la frequenza e la durata del burst di attività critica registrata a livello talamico e corticale in animali in cui sono state indotte le convulsioni sperimentalmente (Fanselow et al., 2000). Sulla base di questi dati sperimentali, il gruppo di

De Giorgio, (2003, 2006, 2009), ha proposto per la prima volta la stimolazione del nervo trigemino (TNS) in cronico come terapia alternativa non farmacologica nel trattamento dell'epilessia parziale farmaco-resistente. Tale proposta, venne effettuata a seguito di uno studio pilota che aveva dimostrato che la TNS induce in questi pazienti un miglioramento clinico con dimezzamento della frequenza delle crisi. Inoltre, in entrambi i lavori, sia quello sperimentale condotto sul modello animale che quello clinico, avevano evidenziato che la stimolazione bilaterale del nervo potenziava l'effetto anticonvulsivante della TNS.

Sulla base di questi dati si è indagato per la prima volta l'impatto EEG della TNS acuta sia in soggetti sani che in pazienti con epilessia parziale FR in fase intercritica, così da chiarire meglio i meccanismi d'azione della stimolazione trigeminale a livello corticale e spiegare gli effetti clinici anticonvulsivanti della metodica a favore di una sua eventuale applicazione terapeutica. Tale studio (Todesco et al., 2008) ha dimostrato che la TNS unilaterale incrementa la frequenza media e le attività rapide nei sani, riduce la potenza del theta e rinforza il ritmo beta nei pazienti. La similarità degli effetti EEG indotti dalla TNS con quelli indotti dalla VNS (Marrosu et al., 2005) farebbe supporre, come già suggerito dai risultati di studi condotti sull'animale da esperimento (Walker et al., 1999; Fanselow et al., 2000) una condivisione di strutture bersaglio, di vie e meccanismi tra le due metodiche di stimolazione. La TNS, avrebbe rispetto alla VNS, il vantaggio di essere una tecnica non invasiva, meno costosa, con effetti collaterali scarsi o assenti.

Questi risultati hanno incoraggiato il mio lavoro di ricerca, mirato a comprendere i meccanismi dell'effetto elettro-clinico osservato sia nell'animale da esperimento, che nell'uomo, a seguito della TNS mediante la determinazione immunohistochimica del marker di attivazione dei neuroni: la proteina c-Fos. L'esame è stato condotto in alcune strutture notoriamente coinvolte nella fisiopatogenesi dell'epilessia, quali la corteccia

somatosensitiva frontoparietale, l'amigdala ed il nucleo endopiriforme. Sono stati utilizzati due gruppi sperimentali: gli animali sottoposti a stimolazione e i controlli (Sham). Gli animali stimolati, previa operazione chirurgica, sono stati impiantati a livello del nervo infraorbitale con un elettrodo bipolare connesso ad un generatore di impulsi che consente la stimolazione elettrica a determinati parametri che appartengono al range di stimolazione terapeutica della stimolazione del nervo vago. Gli Sham invece sono stati sottoposti alla medesima operazione ma non hanno subito stimolazione. I risultati ottenuti, hanno mostrato che gli animali sottoposti a TNS presentano un incremento dell'espressione di c-Fos rispetto al gruppo di controllo Sham. Nella corteccia somatosensitiva, amigdala e nucleo endopiriforme dei ratti TNS l'incremento della proteina Fos rispetto al gruppo Sham è di 2.8, 4, 10.7 volte maggiore. Inoltre in tutte queste strutture un'altra differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nel lato controlaterale la stimolazione con un numero di cellule marcate di 6.6, 7.7, e 36.6 volte rispetto al lato ipsilaterale.

E' stato ottenuto anche un dato preliminare per quanto riguarda le cellule marcate a livello dei nuclei del complesso trigeminale. Il numero delle cellule positive alla proteina Fos mostrano un incremento nei nuclei ipsilaterali alla stimolazione ($p < 0,0094$) rispetto ai nuclei controlaterali. Questo è evidente in tutti i sub-nuclei spinali trigeminali ma non nel nucleo principale trigeminale.

Contemporaneamente all'analisi immunohistochimica, un gruppo di animali stimolati e non, è stato sottoposto a test comportamentale dopo iniezione di Pentilentetrazolo (PTZ).

Il protocollo per gli animali stimolati prevede la stimolazione mezzora prima dell'iniezione peritoneale di PTZ ad alta concentrazione (75mg/Kg) per un totale di 3 ore. Lo stesso viene eseguito per il gruppo di controllo.

I risultati ottenuti sui 4 ratti resi epilettici mostrano che gli animali stimolati hanno una ripresa di tutte le attività normali più rapida rispetto agli Sham ($P= 0,0172$). L'onset delle crisi si mostra prima nei TNS, ma con una gravità del tipo di crisi minore. Infatti, mentre le prime crisi che si manifestano negli animali stimolati sono di tipo lieve e tardivamente sono più severe, negli Sham si manifestano precocemente quelle di tipo severo rispetto alle crisi di entità più lieve. Inoltre la media della durata delle crisi gravi nei TNS è minore rispetto agli Sham. I risultati di questo studio hanno dimostrato che la stimolazione effettuata a livello del nervo infraorbitario agisce nelle aree di interesse, modificando l'attività cellulare inducendo l'espressione di c-Fos. L'attivazione di queste strutture potrebbe giocare un ruolo essenziale nell'effetto antiepilettico della TNS che potrebbe essere usata nella terapia nel trattamento dell'epilessia farmaco resistente.

INTRODUZIONE

Proteina c-Fos

La proteina c-Fos è un proto-oncogene in quanto omologo dell'oncogene v-Fos e del complesso virale FBJ-MSV. C-Fos è costituito da 380 amminoacidi, è localizzato nel nucleo e fa parte della famiglia dei geni a rapida induzione (IEG). Ad oggi sono state identificate 4 proteine della famiglia Fos: C-Fos, Fos B, Fra-1 e Fra-2. Queste proteine sono codificate da geni contenenti quattro esoni e tre introni (Van Straaten et al., 1983) e posseggono il motivo a cerniera di leucina che promuove l'eterodimerizzazione con un altro membro dei IEG, la famiglia Jun (c-Jun, Jun-B, e Jun-D). L'eterodimero induce l'attivazione della proteina-1, AP-1, che a sua volta attiva geni che determinano cambiamenti nel fenotipo cellulare, come crescita e sviluppo (Franza et al., 1988; Sheng and Greenberg., 1990; Morgan and Curran., 1991). Entrambe le famiglie, Fos e Jun, cooperano nel legame con il DNA in diversi siti grazie alle diverse combinazioni tra i componenti delle due famiglie. Le diverse combinazioni possono portare sia ad un'attivazione (C-Fos/C-Jun) che un'inibizione (c-Fos/Jun-B) dell'espressione genica (Schuttle et al., 1989; Sheng and Greenberg., 1990).

In condizioni basali il c-Fos è presente in concentrazioni molto basse e la sua inducibilità è data da un vasto range di stimolazione transinaptica/trascrizionale. L'inducibilità stereotipica rende i geni IEG il più ampio e diffuso strumento di mappaggio per identificare cellule che vengono attivate in risposta a vari stimoli.

Dopo uno stimolo acuto, l'mRNA di c-Fos viene trascritto maggiormente tra la prima e la terza ora con dei picchi tra i 30 e i 60 minuti, e dopo 4-6 ore la sua espressione viene degradato (Sonnenberg et al., 1999a; Chan et al., 1993; Ding et al., 1994; Cullinan et al., 1995; Kovacs and Sawchenko, 1996). Inoltre hanno mostrato l'espressione bifasica del gene Fos dopo cambiamenti sistemici dei livelli di interleukina (Ericsson et al., 1994) ed un'induzione ancora più precoce dopo adrenalectomia (Kovacs and Sawchenko, 1997).

In generale è stato dimostrato che l'induzione di c-Fos riflette l'attività funzionale dei neuroni (Sagar et al., 1988; Duncan et al., 1993). In contrasto, le aree con alti livelli di attività neuronale, come la corteccia visiva (Kaczmarek and Chaudhuri, 1997) non mostrano significativa espressione di c-Fos, come se la normale attività elettrica da sola non fosse sufficiente ad indurre la risposta del c-Fos. In accordo con questa ipotesi, recenti studi hanno mostrato che l'espressione di Fos dipende dalle caratteristiche temporali del potenziale d'azione. In culture cellulari del ganglio della radice dorsale l'incremento sostanziale di Ca^{2+} intracellulare separato da lunghi intervalli di scarica del potenziale d'azione induce una minima espressione di c-Fos, deducendo che l'espressione del gene ad induzione precoce sia inversamente correlato con gli intervalli di scarica del potenziale d'azione (Fields et al., 1997). A livelli normali, uno stimolo comune all'attività di una determinata regione cerebrale, con una normale intensità non induce l'espressione di Fos: la stimolazione sensoriale della corteccia visiva induce l'espressione del gene di c-Fos solo dopo un periodo di deprivazione dello stimolo, e quando gli animali vengono a contatto con nuovi oggetti. La stimolazione dell'udito a differenti intensità del rumore non induce espressione di Fos in una situazione in cui è presente rumore di fondo ma viene attivato dipendentemente dall'intensità nelle strutture correlate all'udito (Campeau and Watson, 1997). È probabile inoltre che esista una differente "soglia" di attivazione per l'espressione

di Fos nelle diverse strutture. Infatti, aree come i nuclei dell'amigdala (nuclei basolaterali, mediali e corticali), talamo ventroanteriore e dorso mediale, come anche la corteccia cingolata, infralimbica e piriforme esprimono c-Fos mediante stimoli moderati, come l'esplorazione di un nuovo ambiente.

Anche se il c-Fos è stato ampiamente studiato ancora non si conosce con esattezza il meccanismo molecolare alla base della sua indicibilità spaziale tra le varie aree.

I cambiamenti che inducono l'espressione di Fos sono vari: fattori neurotrofici, neurotrasmettitori, depolarizzazione, influsso del Ca^{2+} ed il suo aumento intracellulare/intranucleare (Greenberg and Ziff., 1984; Morgan and Curran, 1989; Doucet et al., 1990; Sheng et al., 1990; Gaiddon et al., 1996).

Infatti, la regione regolatoria del gene Fos contiene alcuni elementi (Ca^{2+} /CRE, SRE, SIS e AP-1) che conferiscono una varietà di segnali trans-sinaptici comunemente mediati da vie di trasduzione del segnale interdipendenti, PKA, PKC, CAM chinasi e MAP chinasi.

L'incremento dell'AMP ciclico induce attivazione di Fos mediante la via CRE attraverso fosforilazione di CREB mediante la PKA. CREB viene attivato anche da cambiamenti della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare indotto dai canali voltaggio dipendenti del Ca^{2+} . Quest'ultimo inoltre induce l'espressione di c-Fos attraverso l'incremento della sua concentrazione intracellulare mediato dal recettore NMDA, che attiva la via di trasduzione del segnale MAPK che ha come target la regione SRE. (Bading et al., 1993; Ghosh et al., 1994). Anche i fattori di crescita, inoltre, inducono l'espressione di Fos attraverso SRE, ma attivando la via di trasduzione del segnale mediata da PKC questo elemento cis-acting lega SRF associato con TCF (ternary complex factor) che contiene Elk-1 o SAP-1 che vengono fosforilati anche dal complesso ras/MAPK (ERK) (Treisman., 1992; Hill and Treisman, 1995).

Inoltre il sito AP-1, nel promotore del gene Fos, adiacente alla sequenza SRE, lega il fattore di trascrizione eterodimerico Fos/Jun con una probabile funzione di autofeedback negativo per la trascrizione di c-Fos (Sassone-Corsi et al., 1998) oltre quella di regolare la trascrizione di un diverso range di geni coinvolti tra le varie funzioni nella proliferazione e differenziazione come difesa al danneggiamento cellulare.

Nel campo delle neuroscienze, data la vasta azione cellulare, il c-Fos è considerato come marker indiretto dell'attività neuronale, in quanto è spesso espresso durante i potenziali d'azione dei neuroni.

Stimolazione vagale ed epilessia

La stimolazione del nervo vago è riconosciuta come unica tecnica di neuro modulazione palliativa, non farmacologica, nel trattamento dell'epilessia parziale farmaco resistente. Benché la VNS sia stata ampiamente introdotta nel trattamento dell'epilessia già da 15 anni, il meccanismo di azione è ancora sconosciuto. Sono stati sinora descritti i suoi effetti di riduzione sulla frequenza e/o sulla severità delle crisi parziali complesse (Ben-Menachem et al., 1994; George et al., 1994; McLachlan, 1997; Handforth et al., 1998; Labar et al., 1998; Schachter and Saper, 1998; Boon et al., 1999; Camfield and Camfield, 1999; Fisher and Handforth, 1999; Vonck et al., 1999; Boon et al., 2001). Più recentemente è stata riportata l'efficacia sulle crisi generalizzate quali il piccolo male o le crisi toniche o miocloniche resistenti (Lundgren et al., 1998; Labar et al., 1999).

Per il trattamento di pazienti affetti da epilessia refrattaria è disponibile in Europa dal 1994 e negli Stati Uniti dal 1997 la VNS Therapy Sistem (Cyberonics Inc., Houston, TX). Oltre 30000 pazienti hanno ricevuto la terapia VNS, sono stati condotti, infatti, numerosi studi che hanno messo in evidenza come essa agisca a livello di aree implicate in questa patologia, come il talamo e le strutture limbiche. L'efficacia del trattamento VNS è stata accertata nelle crisi epilettiche parziali e in pazienti refrattari che non rispondono al trattamento chirurgico dell'epilessia, ma ci sono dati che suggeriscono come tale terapia sia efficace anche in altri tipi di crisi epilettiche.

Il dispositivo per la stimolazione VNS è costituito da un generatore di impulsi connesso a 2 elettrodi bipolari che trasmettono, a bassa frequenza, dei segnali elettrici intermittenti al

nervo vago sinistro; esso non viene mai applicato al nervo vago destro in quanto diversi esperimenti effettuati sui cani hanno messo in evidenza come la stimolazione del vago destro causa bradicardia e aritmie cardiache in maniera molto più marcata rispetto a quanto si possa osservare in seguito a stimolazione del vago sinistro.

Il sistema per la terapia VNS, viene impiantato sotto cute, nella parete anteriore del torace, con un intervento chirurgico molto simile a quello dell'impianto di un pacemaker cardiaco. Attraverso un'incisione nel collo il chirurgo avvolge gli elettrodi bipolari che stimoleranno intorno al nervo vago cervicale sinistro. Successivamente gli elettrodi vengono connessi al generatore impiantato attraverso una procedura di tunneling sotto cute (George et al., 2004; Matthews and Eljamel., 2003). Dopo l'intervento la VNS può essere attivata attraverso l'utilizzo di un computer palmare digitale e i vari parametri della stimolazione possono essere modificati in maniera non invasiva grazie all'utilizzo di una bacchetta telemetria collegata a tale palmare. I parametri di stimolazione che sono generalmente utilizzati in pazienti affetti da epilessia farmaco-resistente sono 30 Hz, 0,1-1,5 mA, 30s on: 5 min off e 500 μ s, che vengono modificati poi dopo diversi mesi di trattamento (1.0-3.0 mA, 30 s on: 1,1 min off).

I parametri di stimolazione ottimale non sono però ancora conosciuti e generalmente dipendono dalla situazione clinica dei diversi pazienti e dalle loro caratteristiche individuali.

Gli effetti collaterali quali dispnea, raucedine, disfagia, non sono mai tali da sospendere il trattamento e sono ben tollerati ed intensità dipendenti. Dopo 12 mesi di trattamento si registra una riduzione media della frequenza delle crisi inferiore al 50% nel 45% dei pazienti, maggiore del 50% in un 35% dei casi e addirittura superiore del 75% nei restanti

(DeGiorgio et al., 2000). Tale percentuale tende ad aumentare negli anni successivi all'attivazione dell'impianto di stimolazione (Uthman et al., 2004).

Possibili meccanismi di azione anticonvulsiva

I meccanismi alla base dell'efficacia terapeutica della stimolazione del nervo vago nell'epilessia farmaco-resistente non sono stati ancora chiariti con precisione, in parte perché la stessa patofisiologia dell'epilessia è ancora parzialmente incompresa; infatti l'epilessia, così come anche i disturbi dell'umore possono essere determinati da cause diverse, ed esistono sottotipi diversi di queste patologie, ognuno dei quali è caratterizzato da una distinta fisiopatologia.

Le convulsioni sono caratterizzate da un *firing* sincrono di popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale e, questa osservazione ha condotto all'ipotesi che la terapia della stimolazione vagale sia in grado di desincronizzare l'attività corticale sincronizzata.

Alcuni esperimenti su animali hanno dimostrato che un'alta frequenza e intensità di stimolazione vagale producono una sorta di desincronizzazione (Zanchetti et al., 1952; Chase et al., 1967) mentre una stimolazione a bassa intensità e frequenza indurrebbe una sincronizzazione (Magnes et al., 1967; Rojas et al., 2008) del tracciato. Uno studio su ratti di McLachlan (1993) dimostra come anche l'attività epilettiforme interictale si riduca significativamente durante e immediatamente dopo stimolazione. Solo più recentemente sono stati studiati gli effetti a lungo termine della VNS sull'EEG nell'uomo (Koo, 2001). Gli effetti consistevano in una riduzione progressiva nel tempo del clustering e spiking della traccia, con riduzione della frequenza e della durata dei parossismi e aumento degli intervalli liberi fra questi. In contrasto Hammond et al., (1992) hanno verificato che la

stimolazione acuta del nervo vago non riduce lo *spiking* focale sull'EEG durante i periodi interictali. Tuttavia, la stimolazione durante l'aura o subito dopo l'insorgenza di un episodio ictale era associata con una riduzione delle scariche sincrone (*spiking*), che, come ipotizzato dagli autori, ha prevenuto o interrotto le crisi epilettiche. La diversità delle frequenze di stimolazione e dell'accuratezza della metodologia utilizzata nell'analisi delle tracce EEG può rendere ragione della diversità dei risultati. Inoltre studi di risonanza funzionale (Bohning et al., 2001) hanno inoltre evidenziato aree di significativa attivazione nella corteccia orbito-frontale bilaterale, parieto-occipitale, temporale e nell'amigdala in corso di VNS con incremento diffuso dell'attività cerebrale e alterazione del pattern EEG.

Mentre l'analisi sistematica dei meccanismi attraverso i quali la stimolazione vagale sopprime le convulsioni non è ancora stata capita, diverse considerazioni supportano l'ipotesi che le convulsioni vengano controllate mediante la regolazione del *firing* delle diffuse proiezioni afferenti al prosencefalo, come per esempio le proiezioni serotoniniche o noradrenergiche provenienti dal nucleo dorsale del raphe (DRN) e dal *locus coeruleus* (LC), rispettivamente (Dorr et Debonell, 2006). Più specificatamente si è supposto che la stimolazione vagale induca un diffuso arousal corticale secondario all'attivazione della formazione reticolare ascendente, da parte del LC, e del DRN a cui il nervo vago proietta direttamente od indirettamente attraverso il nucleo del tratto solitario (NTS) il principale sito terminale delle afferenze viscerali colinergiche del nervo vago (Kalia and Sullivan, 1982; Kosel and Schlaepfer, 2003; Rutecki, 1990; Schachter and Saper, 1998).

Inoltre si è proposto che il NTS e il LC agiscano come siti di controllo della diffusione delle crisi (Walker et al., 1999) ed è stato dimostrato che l'estrinsecarsi dell'effetto antiepilettico della VNS richiede l'integrità anatomica e funzionale di questi nuclei (Krahl

et al., 1998), quella delle vie che li interconnettono (Naritoku et al., 1995) e che li collegano al nucleo parabrachiale e all'ippocampo (Castle et al., 2005).

Considerando l'estesa diffusione delle connessioni del NTS (Saper, 1995), la VNS media effetti elettrici e neurochimici attraverso molteplici meccanismi. È stato dimostrato che un incremento del GABA o un decremento del glutamato nel NTS riduce la suscibilità del sistema limbico alle crisi (Magdaleno- Madrigal et al., 2002).

Studi sul liquor nell'uomo e nel ratto, hanno mostrato, in corso di VNS, cambiamenti nella concentrazione di diversi aminoacidi e neurotrasmettitori che potrebbero giocare un ruolo nella sua azione antiepilettica (Giorgi et al., 2004). È stato dimostrato ad esempio un aumento significativo della concentrazione totale e libera di GABA (Marrosu et al., 2003), della noradrenalina e serotonina (Carpenter et al., 2004), di acido 5-idrossiindolacetico ed etanolamina (Ben Menachem et al., 1995) mentre diminuisce quella di glutammato e aspartato (Hammond et al., 1992). Uno studio recente ha inoltre dimostrato l'aumento di fattori neurotrofici come il fattore neurotrofico prodotto dal cervello (BDNF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) a livello dell'ippocampo e della corteccia del cervello di ratto (Follesa et al., 2007) dimostrando che la VNS in acuto influenza il trofismo neuronale. Queste modificazioni dell'espressione di neurotrasmettitori e fattori di crescita determinano altrettante modificazioni morfologiche, funzionali e sinaptiche a livello corticale, e hanno un'azione plastica e trofica cerebrale, con conseguente azione neuroprotettiva e riparativa e innalzamento della soglia convulsiva (Marrosu et al., 2003).

La VNS causa aumento del flusso ematico entro 18 ore dall'inizio della stimolazione a livello dell'ipotalamo, talamo, corteccia dell'insula e cervelletto mentre a livello dell'ippocampo, amigdala e giro del cingolo si osserva una riduzione del flusso sanguigno;

anche queste osservazioni sono in accordo con l'ipotesi dei diffusi effetti della stimolazione vagale sull'attività neuronale (Henry et al., 1998). L'incremento acuto del flusso sanguigno al talamo durante la stimolazione vagale é correlata con le riduzioni croniche nella frequenza delle crisi convulsive (Henry et al., 1999). Da studi effettuati mediante tomografia a emissione di positroni (PET) si è potuto constatare che, dopo la terapia cronica, la stimolazione del nervo vago ha continuato ad aumentare il flusso sanguigno nelle stesse regioni subcorticali che venivano attivate in acuto, ma le regioni corticali manifestavano un'attivazione molto inferiore (Henry et al., 2004). L'aumento del flusso sanguigno a livello corticale sembrerebbe una spia della precoce espressione del gene c-Fos e dell'attivazione neurochimica della sintesi di neurotrofine che poi nel tempo causerebbero l'aumento della densità recettoriale GABA_A (Marrosu et al., 2003).

Espressione della proteina c-Fos dopo stimolazione del nervo vago

Alcuni studi hanno esaminato la capacità della VNS di attivare regioni del cervello usando l'incremento della proteina c-Fos (Carrant and Morgan., 1995; Herdegen and Leah., 1998) come misura di attivazione neuronale (Gieroba and Biessing., 1994; Naritoku et al., 1995; Osharina et al., 2006). Questi studi hanno misurato la capacità della VNS, per un periodo di circa 30-180 minuti, di incrementare la proteina c-Fos sia nei ratti che nei conigli. Cunningham e colleghi (2008) hanno esaminato, a differenza dei lavori precedenti, l'effetto della stimolazione vagale in ratti svegli, in modo tale da evitare qualsiasi coinvolgimento dell'effetto dell'anestetico che può incrementare l'espressione di c-Fos nel cervello (Takayama et al., 1994) mascherando di conseguenza l'effetto della VNS in quanto potrebbe alterare la soglia di attivazione dei differenti tipi di fibre che costituiscono

il nervo vago (Woodbury and Woodbury., 1990). Dato l'uso sperimentale e clinico a breve e lungo termine della VNS, si è studiato l'effetto della VNS sia in acuto (2 ore) che in cronico (3 settimane) utilizzando rispettivamente come marker di attivazione c-Fos e delta-FosB. L'utilizzo dell'uno o dell'altro marcatore neuronale in acuto ed in cronico è dovuto al tempo di attivazione e permanenza nella cellula della proteina Fos. Il picco di attivazione della proteina c-Fos è contenuto tra la prima e la terza ora dalla stimolazione (Kovaks., 1998) mentre FosB viene attivato tardivamente e la sua attivazione persiste più a lungo suggerendo che l'espressione di questa molecola possa essere utilizzata come marcatore dell'attivazione neuronale cronica (Nestler., 2004).

La VNS acuta, usando parametri meno invasivi utilizzati nella terapia clinica (20 Hz, ampiezza dello stimolo di 500 μ sec, 0.25 mA, 30 sec on, 5 min off) incrementa l'espressione di c-Fos nel nucleo del tratto solitario, nucleo parabrachiale, locus ceruleus, BST ventrale, e nucleo paraventricolare dell'ipotalamo. Non sono stati rilevati però incrementi a livello delle aree sub-corticali e corticali come registrato in studi di imaging (Barnes et al., 2003; Henry et al., 1998, 2004). Forse questo è dovuto ai parametri di stimolazione utilizzati, non sufficienti per attivare determinate strutture, oppure è possibile che in alcune regioni come l'amigdala od il nucleo supraottico, la VNS sia associata a qualche meccanismo inibitorio che potrebbe riflettersi in cambiamenti dell'espressione di c-Fos (Cunningham et al., 2008). Questi sono dati da interpretare con cautela in quanto altri lavori hanno dimostrato che utilizzando sostanziali parametri di stimolazione in acuto (30 Hz, durata dell'impulso 500 μ sec, 1 mA) si induce un'elevata espressione di c-Fos anche in strutture limbiche come i nuclei posteromediali corticali dell'amigdala, nella corteccia cingolata e corteccia cerebrale retro spleniale e una moderata espressione anche nella corteccia peririnale, e nel diencefalo sono state rilevate strutture attivate come

l'abenula, nucleo posteromediale del talamo e nucleo ventromediale ipotalamico ed arcuato. Nel tronco encefalico il LC, nucleo A5, nucleo cocleare e paratrigeminale e per quanto riguarda i nuclei vagali: Nucleo solitario e nucleo motore dorsale del vago, mentre non è stata rilevata alcuna marcatura nell'ippocampo, corteccia piriforme e corteccia entorinale, nucleo del rafe e nella substantia nigra (Naritoku et al., 1995). Per quanto riguarda la stimolazione in cronico, Cunningham et al., 2008, hanno mostrato che la VNS induce l'attivazione della proteina FosB in misura minore nelle regioni attivate dalla proteina c-Fos durante stimolazione acuta, sebbene vada ad attivare regioni non attivate dalla stimolazione in acuto come il nucleo dorsale del rafe e corteccia cingolata. La proteina c-Fos è associata all'attivazione di vari recettori come N-metil-D-aspartato (Herrera, 1990), muscarinici (Hughes et al., 1993) recettori noradrenergici e anche canali del calcio voltaggio dipendenti (Murphy et al., 1991). La differente espressione della proteina Fos a diversi parametri potrebbe essere dovuto alla differente scarica dei neuroni dei diversi nuclei che modulano l'incremento di differenti neurotrasmettitori implicati nell'attivazione neuronale.

Nervo trigemino

Il nervo Trigemino è il quinto dei nervi cranici, origina dalla superficie laterale del tronco encefalico ed emerge dalla porzione centrale del ponte. Esso trasmette la maggior parte delle informazioni sensoriali provenienti, dalla cute della faccia, dalla congiuntiva, dal globo oculare inclusa la cornea, dalle meningi della fossa cranica anteriore e media, dal tentorio del cervelletto, dalle pareti dei vasi del poligono di Willis, dalla mucosa buccale, dai due terzi anteriori della lingua, dalla mucosa dei seni frontali e mascellari, dai denti e dalla mucosa nasale e fornisce l'innervazione motoria dei muscoli della mandibola e nell'animale innerva anche le vibrissae. Nel sistema trigeminale sono presenti fibre che ritrasmettono informazioni sensoriali di modalità diversa che proiettano a nuclei distinti del tronco dell'encefalo. A livello periferico si divide in tre rami principali: oftalmico, mandibolare e mascellare. I rami oftalmico e mascellare sono nervi sensoriali puri, mentre il ramo mandibolare contiene sia fibre sensoriali che motrici.

Il trigemino è quindi un nervo misto che dal punto di vista funzionale è l'equivalente di un nervo spinale. A pari di quanto avviene a livello spinale, i rami centrali delle fibre sensoriali e gli assoni motori penetrano ed escono dal tronco dell'encefalo da punti distinti come radici sensoriale (afferente) e motoria (efferente). Le fibre somatosensitive hanno

origine dai protonucleroni localizzati nel ganglio semilunare (di Gasser) e penetrano, accanto all'emergenza della radice motoria del nervo, nella superficie ventrolaterale del ponte, per terminare nel nucleo somatosensitivo del trigemino. A questa organizzazione anatomica non si uniformano i corpi cellulari di una classe funzionale dei neuroni sensoriali trigeminali, i neuroni propriocettivi, che si trovano all'interno del sistema nervoso centrale, a livello del nucleo mesencefalico del trigemino (Me5). Questo nucleo è l'unica formazione del sistema nervoso centrale in cui sono presenti i corpi cellulari di neuroni afferenti primari. I corpi cellulari delle fibre motorie formano il nucleo motore del trigemino che si trovano a livello del ponte.

Sistema trigeminale sensitivo

I nuclei sensitivi trigeminali si estendono dal mesencefalo sino agli ultimi segmenti del midollo spinale e sono divisi in 3 gruppi principali: nucleo mesencefalico (Me5), nucleo sensitivo principale (Pr5) ed il nucleo spinale trigeminale (Sp5). Il nucleo Sp5 a sua volta è diviso a sua volta nelle parti orale (Sp5O), interpolare (Sp5I) e caudale (Sp5C). Il complesso trigeminale contiene ulteriormente il nucleo motorio trigeminale (Mo5) mediale al Pr5, il nucleo supratrigeminale (Su5) situato nel bordo dorsomediale del Pr5 e il nucleo intertrigeminale che si trova nella superficie laterale della medulla, parzialmente inserito nel tratto spinale trigeminale. Mo5, Su5 ed il nucleo intertrigeminale sono associati con i riflessi masticatori ed al controllo dei movimenti mascellari. La funzione del nucleo paratrigeminale non è stata ancora stabilita, esso riceve input da afferenze primarie dalla cornea e da strutture intraorali e potrebbe giocare un ruolo nei riflessi nocicettivi viscerali.

Le afferenze che arrivano ai nuclei sensitivi trigeminali entrano nel tronco encefalico attraverso la radice sensitiva trigeminale, adiacente alla radice trigeminale motoria e le afferenze con il soma centrale passano rostralmente al Me5. Tutte le altre afferenze entrano nel tratto trigeminale a livello laterale del ponte, alcune biforcano per dare una branca dorsale al Pr5 e una branca discendente lungo il tratto spinale; le rimanenti afferenze discendono semplicemente nel tratto. Tutte emettono un numero di collaterali dirette medialmente che sinaptano con i nuclei trigeminali adiacenti.

Le afferenze presentano un'organizzazione somatotopica, le proiezioni mandibolari terminano dorsalmente e quelle oftalmiche ventralmente; In Sp5C le terminazioni mandibolari sono più dorsomediali rispetto a quelle oftalmiche che sono posizionate ventrolateralmente. Inoltre è presente un'organizzazione mediolaterale nei nuclei Pr5, Sp5O e Sp5I che ricevono nella regione laterale proiezioni dalla regione caudale della pelle e del naso e terminano medialmente nella regione rostrale della faccia. Tuttavia in Sp5C questo pattern è modificato. Infatti il nucleo caudale presenta al suo interno una distribuzione rostrale delle afferenze dal naso e dalla faccia e, gli input provenienti dalla regione posteriore della faccia terminano all'interno del nucleo a livelli sempre più caudali. Per Sp5C, come nel corno dorsale, differenti recettori e tipi di fibre afferenti terminano in lamine differenti.

Le afferenze trigeminali proiettano anche ad altre aree come il nucleo del tratto solitario, la formazione reticolare parvocellulare ed il midollo spinale rostrale (Jacquin et al., 1983 b; Marfurt and Rajchert, 1991). Le terminazioni delle proiezioni trigeminali sono principalmente ipsilaterali, benchè qualche collaterale sia presente per Sp5C, in particolare dalle afferenze mandibolari ed oftalmiche attraverso campi recettivi mediani (Jacquin et al., 1990 b; Marfurt and Rajchert, 1991; Panneton et al., 1991). Nei roditori

l'organizzazione delle terminazioni nei nuclei spinali trigeminali è chiaramente visibile nelle afferenze delle vibrisse (Nord, 1967; Arvidsson, 1982). Nel ratto ogni vibrissa è associata ad un territorio denominato "bariletto". Sono state osservate 3 rappresentazioni delle vibrisse in Pr5, Sp5I ed Sp5C (Belford and Killackey, 1979; Durham and Woolsey 1984; Ma, 1991); e sebbene Sp5O riceve terminazioni dalla vibrisse, non è evidente nessun territorio o barilotto. Nelle sezioni orizzontali le terminazioni dei baffi sono osservabili come lunghe colonne rostro caudali lungo i nuclei (Bates and Killackey, 1979; Ma, 1991). Le singole afferenze dalla vibrissa, dalla pelle o dalle strutture orali spesso forniscono collaterali a tutti i subnuclei (Hayashi, 1980, 1985). Inoltre le afferenze delle vibrisse proiettano a tutti i quattro nuclei, più densamente a livello di Pr5, nel Sp5O e nel Sp5I rostralmente e nel Sp5C specialmente nella lamina 1 e 2 (Marfurt and Turner, 1984). A livelli ultrastrutturali, le terminazioni afferenti primarie in tutti i nuclei sono spesso circondati da un numero di dentriti formando un complesso sinaptico conosciuto come glomerulo (Ide and Killackey, 1985; Falls, 1986).

Nucleo trigeminale mesencefalico

Me5 forma una banda ristretta di cellule che si estendono dal margine rostrale del nucleo sensitivo principale al collicolo superiore del mesencefalo rostralmente al nucleo motorio trigeminale. I rami periferici dei neuroni del nucleo mesencefalico del trigemino innervano i recettori da stiramento dei muscoli della mandibola e i meccanocettori del legamento periodontale. La maggior parte delle fibre periferiche dei neuroni del nucleo mesencefalico decorre nella branca mandibolare del trigemino. Un ramo collaterale delle fibre di questi neuroni proietta direttamente, attraverso il tratto mesencefalico del trigemino, al nucleo

motore del trigemino. Da quest'arco riflesso origina il riflesso masseterino che determina la contrazione dei muscoli masseteri in risposta ad una pressione esercitata sui denti dall'arcata mandibolare o all'abbassamento della mandibola. Nel ratto la maggior parte delle cellule sono pseudounipolari ma contrariamente alle altre afferenze primarie le cellule ricevono sinapsi serotoninergiche e probabilmente anche quelle dopaminergiche. I loro assoni biforcando proiettando perifericamente nella radice trigeminale e centralmente alle regioni come il nucleo motore trigeminale e nucleo ipoglosso, i nuclei trigeminali sensitivi Pr5 e Sp5O, il nucleo del tratto solitario, nucleo supratrigeminale e al nucleo parvocellulare (PCRt).

Nucleo principale sensitivo

A questo nucleo giungono le fibre che mediano la sensibilità tattile della faccia. Il Pr5 è situato lateralmente al ponte. Rostralmente ha inizio a livello del polo rostrale del Mo5 e si estende caudalmente a livello del polo rostrale del nucleo facciale dove presenta contiguità con Sp5O. Il Pr5 contiene un'alta densità di neuroni di media e piccola dimensione.

La maggior parte di questi neuroni contengono parvalbumina o GABA inoltre ci sono anche neuroni di grandi dimensioni, soprattutto dorsalmente, immunoreattivi alla calbindina.

I neuroni di secondo ordine del nucleo sensitivo principale proiettano al talamo. La maggior parte delle fibre che originano da questo nucleo decorre nel lemnisco trigeminale, che, dopo essersi decussato, si congiunge con il lemnisco mediale e raggiunge il nucleo ventrale posteriore controlaterale del talamo. Alcuni neuroni della regione dorsomediale del nucleo sensitivo principale danno origine ad un piccolo tratto che termina a livello del

nucleo ventrale posteriore ipsilaterale del talamo (VPM). Oltre alle connessioni talamiche, il Pr5 proietta in modo sparso anche al cervelletto, Mo5, collicolo superiore, zona incerta e al nucleo ipoglosso.

Subnucleo Orale

Rostralmente e' contiguo con il Pr5. Contiene cellule di grandi dimensioni (30-50 micron) come anche cellule di media e piccola grandezza, alcune contengono parvalbumina, calbindina, o glutammato. Tipicamente le cellule del subnucleo orale presentano campi dendritici diffusi: una caratteristica che accomuna i nuclei spinali in quanto sono considerati prevalentemente un aggregato di interneuroni intercalati tra le fibre afferenti primarie ed i nuclei motori del trigemino e di altri nervi cranici. Sp5O fornisce la maggior parte delle sue proiezioni al nucleo facciale (Erzurumlu e Killackey, 1979). Altre proiezioni giungono al VPM, al Pr5, al midollo spinale, zona incerta e al nucleo pretectale anteriore.

Subnucleo Interpolare

Il nucleo interpolare rostralmente è contiguo con Sp5O e caudalmente è in continuità con il nucleo caudale spinale. È il più ampio dei nuclei trigeminali sensitivi e contiene neuroni di varia dimensione. Molte cellule contengono parvalbumina, calbindina, o GABA, e qualche neurone è glutammatergico. Sono comuni in questo nucleo risposte a basse soglie dovuti ad input, come i movimenti della vibrissa nei ratti, e inoltre sono state riportate risposte nocicettive dopo stimolazione della cornea nel Sp5I caudale. Come in Sp5O ma non nel Pr5, i campi dendritici delle cellule nel Sp5I sono tipicamente diffusi (Jacquin et al.,

1988b). Le principali proiezioni dal nucleo si dirigono direttamente e/o indirettamente verso il cervelletto, attraverso il nucleo olivare e al collicolo superiore. Inoltre, esistono proiezioni verso il VPMe, nucleo posteriore talamico (Po), zona incerta, e nucleo prectetale anteriore. Alcune cellule del nucleo proiettano contralateralmente al talamo e al collicolo superiore ed al cervelletto.

Subnucleo caudale

Si estende fino ai primi segmenti del midollo spinale con il quale è in continuum. Come il corno dorsale, possiede un arrangiamento laminare, con uno strato marginale (Lamina 1) sostanza gelatinosa (lamina2) e una lamina magnocellulare (lamina 3 e 4). La lamina 1 contiene una grande varietà cellulare con poche cellule di grandi dimensioni multipolari allineate parallele al tratto spinale. La lamina 2 presenta principalmente piccole cellule, ovali e fusiformi; Le cellule contengono GABA, glutamato, o aspartato in tutte le lamine e in particolare le cellule nelle lamine 1 e 2 sono parvalbumina o calbindina- positive. La lamina 1 proietta al VPM, al nucleo gelatinoso, e ai nuclei intralaminare e posteriore. I neuroni della lamina 1 e 2 proiettano al nucleo del tratto solitario e la zona incerta. Lo strato magnocellulare proietta al nucleo facciale, e anche ai nuclei trigeminali rostrali. Tradizionalmente la proiezione che lega il nucleo caudale con il talamo è stata reputata responsabile della sensibilità termica e nocicettiva proveniente da input del cranio, analogamente al corno dorsale e alla via spinotalamica nel midollo spinale. Sp5C fornisce proiezioni intranucleari a tutti gli altri nuclei trigeminali, importanti nella modulazione delle risposte dei nuclei più rostrali.

Stimolazione trigeminale ed epilessia

Recenti studi hanno dimostrato che la stimolazione del nervo trigemino e le strutture ad esso connesse diminuisce, attraverso un meccanismo di inibizione, la frequenza delle crisi epilettiche. (Fanselow et al., 2000; Magdaleno-Madrigal et al., 2002; Walker et al., 1999; Sasa et al., 1995; Hoskin et al., 2001). Le connessioni che potrebbero giocare un ruolo importante nell'inibizione del firing neuronale sono quelle che interconnettono i nuclei trigeminali al nucleo del tratto solitario (NTS), locus ceruleus (LC) e la formazione reticolare (FR). Nel gatto La stimolazione del nucleo del tratto solitario ritarda l'inizio delle crisi indotte dalla stimolazione cronica dell'amigdala (Magdaleno-Madrigal et al., 2002). Inoltre, i nuclei trigeminali hanno estese proiezioni al LC e a strutture del mesencefalo implicate nella produzione di neurotrasmettitori catecolaminergici epinefrina e norepinefrina (Sasa et al., 1995; Hoskin et al., 2001). La stimolazione del locus ceruleus è implicato nell'effetto anticonvulsivante della stimolazione del nervo vago, in quanto sopprime la scarica epilettica indotta da agenti che inducono le crisi come il cobalto e la penicillina (Weiss et al., 1990).

Il Locus ceruleus potrebbe essere implicato nella stessa azione antiepilettica che associa la VNS con la TNS. Sulla base di questi studi, Fanselow e colleghi hanno usato la stimolazione del nervo trigemino nel ratto con crisi indotte con iniezione di pentilentetrazolo e De Giorgio e colleghi hanno iniziato un trial clinico sulla stimolazione del nervo infraorbitario e nervo sovraorbitario in pazienti affetti da epilessia parziale farmaco resistente.

Stimolazione del nervo nell'animale

Il gruppo di Fanselow et al., (2000) ha effettuato la stimolazione trigeminale su ratti in cui sono state indotte sperimentalmente le convulsioni tramite l'agente convulsivante pentilentetrazolo (PTZ). I ratti sono stati impiantati chirurgicamente con una serie di elettrodi nello strato V della corteccia somatosensitiva e nel talamo somatosensoriale per registrare l'attività elettrica in 16 siti distinti di queste aree. L'iniezione intraperitoneale di PTZ (40mg/Kg) ha indotto crisi toniche-cloniche generalizzate con una durata di circa 4 secondi e una frequenza di 4 per minuto per 2 ore circa. Per attivare correttamente il nervo trigemino è stato impiantato attorno alla branca infraorbitaria del V nervo un elettrodo a cuffia. Questa branca trigeminale trasporta gli input somatosensoriali dai baffi del ratto al ganglio trigeminale il quale proietta ai nuclei trigeminali tronco encefalici. Questi nuclei proiettano al nucleo mediale ventroposteriore e posteriore del talamo, le cui afferenze raggiungono la corteccia somatosensitiva primaria. In questo studio il nervo trigemino è stato stimolato a diversi treni di impulso al variare della frequenza e della corrente. I parametri di stimolazione sono stati liberati con un ciclo continuo di 1 minuto on ed un minuto off. Le crisi registrate sono state quantificate in 3 modi: Numero di crisi, durata e integrazione dell'attività della crisi. Quest'ultima quantificazione è stata ottenuta mediante la misura di tutte le attività delle crisi calcolate attraverso l'integrazione del valore assoluto dei segnali dei potenziali locali registrati a livello di ogni singolo elettrodo a livello talamico e corticale.

Durante la stimolazione del nervo si è osservata una riduzione dell'attività delle crisi nel talamo e nella neocorteccia. Tra gli animali è stata osservata una diminuzione dell'attività elettrica convulsiva del 78% usando una frequenza di stimolo di 100 Hz ed un'intensità di 11 mA, facendo presupporre che l'effetto anticonvulsivo sia dipendente sia dalla frequenza

che dell'intensità dello stimolo. Inoltre anche il comportamento convulsivo dell'animale ha mostrato un miglioramento concomitante al miglioramento elettrografico. L'incremento dello stimolo a frequenze maggiori di 100 Hz non migliora l'effetto anticonvulsivante e con frequenze minori di 50Hz, soprattutto a 10 Hz si è riscontrato un incremento della durata delle crisi, con un picco massimo registrato a 10 Hz. Inoltre si è dimostrato che la riduzione delle crisi è in funzione dell'aumento dell'intensità dello stimolo, presumibilmente in quanto elevati livelli di corrente attiva più fibre nel nervo stimolato. Per quanto riguarda gli effetti collaterali, gli animali non hanno subito alterazioni a livello cardiaco e non hanno mostrato fastidio dovuto alla stimolazione.

Efficacia della stimolazione bilaterale

A differenza della VNS, nella quale viene stimolato solo il vago di sinistra per evitare effetti collaterali cardiaci, la TNS può essere applicata ad entrambi i nervi trigeminali simultaneamente (DeGiorgio et al., 2000; Handforth et al., 1998; De Giorgio et al., 2006, 2009). Tuttavia ancora non si conosce se questo può migliorare l'efficacia della TNS o se la stimolazione unilaterale è sufficiente da sola ad ottenere il massimo effetto terapeutico.

Nell'animale, in cui entrambi i nervi infraorbitali sono stati stimolati, prima individualmente e poi simultaneamente, si è dimostrato che nella stimolazione bilaterale è sufficiente un'intensità di corrente di 7mA per ottenere un decremento della frequenza delle crisi al 75%, mentre con la stimolazione unilaterale lo stesso grado di riduzione delle crisi è accompagnato ad una corrente di 11 mA (Fanselow et al., 2000). Questo risultato ha suggerito che gli effetti della TNS incrementano attraverso la stimolazione di siti multipli. Gli effetti elettrografici (e comportamentali) sono stati identici per ogni sito stimolato. In

ultimo Fanselow ha proposto un nuovo protocollo di stimolazione in tempo reale dopo rilevazione automatica delle crisi capace di sopprimere l'attività ictale sul nascere, risultando più efficace della stimolazione periodica. Un paradigma che se trasferito all'uomo, consentirebbe di raggiungere un alto grado di controllo delle crisi per di più con una riduzione dell'apporto globale di stimolazione rispetto ad esempio alla VNS continua e intermittente. Un modello simile è quello della stimolazione cerebrale profonda, implementata con un rilevatore di attività critica con un algoritmo di predizione di diversi minuti/secondi prima dell'inizio comportamentale della crisi, metodica ancora sperimentale e con scarsa casistica. La possibilità di una soluzione analoga di stimolazione automatica con trigger di un nervo superficiale come il trigemino potrebbe, considerata la minore invasività, rendere questa nuova proposta terapeutica più accettabile e fruibile.

Studi sull'uomo

Sulla scorta di modelli sperimentali animali, recenti studi di De Giorgio (2003, 2006, 2009) propongono per la prima volta la TNS nell'uomo, come trattamento di neurostimolazione sostitutivo della VNS, in quanto applicabile bilateralmente e meno invasivo. Gli studi sono stati condotti a partire, dal 2001, su 30 soggetti affetti da crisi parziali complesse (CPS), farmacoresistenti, con frequenza di 3 crisi mensili, in buone condizioni mediche e cardiache, con anamnesi negativa per nevralgia trigeminale, in politerapia con AED. Sui pazienti si è proceduto alla stimolazione esterna del nervo infraorbitale e sovraorbitale con

un neurostimolatore manuale, con impulsi della durata di 250 microsecondi, a una frequenza di 120 Hz, con fasi on e off di 20-30 secondi l'una. Nel primo studio si è stimolata solo la branca infraorbitaria (De Giorgio et al., 2003), nel secondo anche quella sovraorbitaria (De Giorgio et al., 2006). Gli studi iniziali si sono basati principalmente sulla sicurezza e sulla praticabilità, come anche sull'intensità dello stimolo che è stata adattata alla soglia del dolore del paziente. In questi casi sono stati tollerati senza disagio stimoli ≤ 25 mA. La percezione del dolore veniva valutata con una scala di intensità da 1 a 10. La pressione arteriosa e la frequenza cardiaca sono state monitorate nella prima ora di stimolazione e dopo 24 ore dall'inizio, senza modificazioni significative. La durata del trattamento, unilaterale con alternanza di lato ogni 24 ore, variava da 3 a 6 mesi. A 12 mesi dalla stimolazione ciò che si è ottenuto è un dimezzamento della frequenza media delle crisi del 50%. Nello studio del 2009, sono stati testati tredici soggetti a 1, 3, 6, 12 mesi, la maggior parte con stimolazione sovraorbitaria bilaterale. Sette soggetti hanno completato il ciclo di stimolazione, e ben cinque di questi hanno riportato a 6 e 12 mesi una riduzione di oltre il 50 % della frequenza delle crisi. Un paziente ne ha sperimentato addirittura una riduzione del 90%. Gli elettrodi per la TNS in quanto esterni possono essere tolti e rimessi giornalmente, e la stimolazione può durare per anni e alcuni pazienti hanno usato il dispositivo per più di 5 anni.

Questi risultati tuttavia per quanto incoraggianti sono da considerarsi con cautela a causa del numero ridotto dei pazienti stimolati, di un possibile effetto placebo del trattamento, non scartato con stimolazioni sham, e del mancato monitoraggio elettroencefalografico dei pazienti che ha impedito di correlare il miglioramento clinico a quello elettrico, sia attraverso una quantificazione dei ritmi EEG che un conteggio automatico o manuale delle

anomalie epilettiformi intercritiche, prima e dopo stimolazione cronica. Inoltre quasi la metà dei pazienti ha abbandonato lo studio a 1 o 3 mesi, per il disagio e imbarazzo degli elettrodi a vista, per quanto camuffati da un berrettino, pur senza riferire effetti collaterali. Problema tuttavia superabile in caso di riconoscimento della metodica come terapia antiepilettica allorché si provvederà a un impianto chirurgico sottocutaneo e cronico degli elettrodi. Il pregio di questi studi di De Giorgio è stato comunque quello di dimostrare l'applicabilità della TNS in cronico, di provarne l'efficacia nelle forme di epilessia focale dopo il modello di crisi generalizzate degli studi animali di Fanselow, di testarne l'efficacia anche per stimolazioni non dolorifiche, di rilevarne la tollerabilità a lungo termine anche per stimolazioni bilaterali, senza la comparsa di effetti collaterali autonomici né di dolore nevralgico facciale. Inoltre il gruppo di De Giorgio sta completando studi PET, per andare a valutare quali siano le strutture che vengono attivate durante la stimolazione trigeminale. Questo lavoro andrà a vantaggio nella comprensione del meccanismo attraverso il quale la nuova terapia di neuro modulazione agisce. I dati clinici degli studi americani di De Giorgio, a favore di un effetto antiepilettico della TNS cronica, non sono supportati da altrettanti dati EEG nell'uomo.

Sulla base di questi studi, Todesco e colleghi (2008) hanno analizzato l'effetto della TNS sul tracciato elettroencefalografico in pazienti epilettici farmacoresistenti. È stata effettuata stimolazione trigeminale elettrica transcutanea a breve termine del nervo infra o sovraorbitario, uni e bilateralmente, in due separate sedute. Gli stimoli sono stati erogati con un neurostimolatore alimentato a batterie. Ogni stimolazione constava di 10 treni

intermittenti di stimolo erogati a una frequenza di 120Hz e durata d'impulso di 250 μ s, con forma d'onda quadra bifasica, per un periodo on di stimolazione di 30s ogni minuto di registrazione, ad un'intensità individuale alla soglia del dolore. Il protocollo osservato, è quello adottato negli studi clinici americani di De Giorgio (2003, 2006, 2009). Nella fase di applicazione ogni soggetto era tenuto a informare di disagi legati allo stimolo e a segnalare la comparsa di crisi quando in grado di farlo. Si è presa nota inoltre di ogni interferenza ambientale esterna alla registrazione, della data e ora dell'ultima crisi, e di ogni recente revisione terapeutica nonché assunzione di psicofarmaci quali ipnoinducenti o ansiolitici, prima della seduta sperimentale. Nello specifico nello studio si sono valutate eventuali modificazioni sia nel ritmo di fondo che dell'attività epilettica intercritica, con particolare attenzione a reazioni di sincronizzazione e de sincronizzazione del tracciato. Ogni registrazione EEG è stata eseguita sia in condizioni basali sia in corso che dopo stimolazione trigeminale. I dati di questo studio pilota indicano che la stimolazione elettrica transcutanea della branca sovra e infraorbitaria del nervo trigemino desincronizza l'attività EEG. Sia nei sani che nei pazienti con EPFR si è riscontrato un incremento delle attività rapide e della frequenza media. Nei malati in aggiunta si è osservata una riduzione della potenza della banda teta, maggiore sulle regioni anteriori frontotemporali in coincidenza con la localizzazione dei focolai epilettogeni. La risposta ottenuta si è potenziata con la stimolazione bilaterale in entrambi i gruppi. Ciò significa che la stimolazione unilaterale della branca sia sovra che infraorbitaria, come anche dimostrato negli studi animali di Fanselow (2000), ha effetti biemisferici e che la stimolazione bilaterale non può che rafforzarli.

Meccanismo d'azione della TNS

Il meccanismo attraverso il quale i nervi cranici riducono l'attività delle crisi non è ancora del tutto conosciuto. Alcuni studi hanno suggerito il coinvolgimento di neuromodulatori rilasciati da nuclei del tronco encefalico. Per esempio, Krahl e colleghi (1998) hanno mostrato che lesioni del LC, nucleo noradrenergico del tronco encefalico, blocca gli effetti anticonvulsivi della VNS. Recenti studi (Raedt et al., 2001) hanno mostrato che la VNS aumenta i livelli di norepinefrina nell'ippocampo. Non si conosce se lo stesso effetto potrebbe essere indotto dalla TNS. Inoltre il sistema di attivazione reticolare, inclusa la formazione reticolare del tronco encefalico, è implicato nel ridurre l'attività delle crisi, principalmente in quanto la stimolazione di questa regione è conosciuta per il suo firing desincronizzante nella neocorteccia (Moruzzi and Magoun, 1949). È probabile che gli effetti indotti dalla stimolazione dei nervi cranici, inclusa la TNS, siano dovuti a meccanismi multipli. La prova di ciò nasce dalle differenti scale temporali attraverso il quale la stimolazione diventa efficace. Per esempio, Fanselow, (2000), ha mostrato che la TNS ha un immediato effetto sull'attività delle crisi se lo stimolo viene liberato proprio quando la crisi è sul nascere. Inoltre si sono manifestati degli effetti a lungo termine dovuti alla stimolazione dei nervi cranici, in quanto sono state osservate diminuzioni della frequenza e della severità delle crisi nella stimolazione in cronico (De Giorgio et al., 2000; Morris et al., 1999; Uthman et al., 2004; Revesz et al., 2008). Questi dati suggeriscono che la TNS potrebbe causare alterazioni dell'attività elettrica a lungo termine che potrebbero

dipendere da cambiamenti mediati geneticamente nelle funzioni del cervello come mostrato nella VNS (Morris et al., 1999; Uthman et al., 2004; Revesz et al., 2008). Nessuno di questi meccanismi implicati nella riduzione delle crisi sono mutuamente esclusivi ma potrebbero operare simultaneamente per ridurre la frequenza delle crisi.

OBIETTIVI

I dati in letteratura sugli effetti della stimolazione elettrica trigeminale hanno dimostrato un possibile effetto desincronizzante sia nell'animale che nell'uomo. Nessuna analisi però ha ancora evidenziato quali siano le aree coinvolte nell'azione anticonvulsiva benchè si conoscano quali siano le proiezioni che dal nervo infraorbitale innervano i nuclei trigeminali e da qui afferiscono a diversi nuclei tronco encefalici e centrali.

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto quello di indagare, per la prima volta nell'animale, gli effetti della TNS acuta sull'attività cellulare di aree coinvolte nella fisiopatologia dell'epilessia a determinati parametri di stimolazione che sono all'interno di un ampio range di parametri ritenuti efficaci nell'azione anticonvulsiva della VNS.

Nello specifico lo studio è stato finalizzato a:

- Valutare una differenza dell'espressione di c-Fos tra animali TNS e Sham nella corteccia frontoparietale nell'area somatosensitiva, amigdala e nucleo endopiriforme.
- Misurare differenze significative tra la regione controlaterale ed ipsilaterale la stimolazione all'interno dello stesso gruppo sperimentale TNS.
- Verificare l'espressione di c-Fos a livello del complesso sensitivo trigeminale, per visualizzare una possibile attivazione maggiore in certi nuclei rispetto ad altri a causa del diverso calibro delle fibre che afferiscono ad ogni nucleo.
- Effettuare uno studio comportamentale dopo induzione delle convulsioni seguito di somministrazione di Pentilentetrazolo sia nei TNS che negli Sham .

MATERIALI E METODI

Animali e operazione chirurgica

Lo studio sugli animali è stato condotto nel rispetto della normativa europea in materia di sperimentazione animale (86/609/EEC) ed è stato approvato dal comitato etico locale e sono state prese misure adeguate per minimizzare dolore.

Ratti maschi Sprague-Dawley (250-300 gr), sono stati mantenuti in condizioni di laboratorio standard e sono stati anestetizzati attraverso un'iniezione intraperitoneale dell'anestetico Equithesine (Rawlins, 1996) con una dose di 1 ml/300-g per ratto. Nei ratti è stato impiantato un elettrodo bipolare attorno al nervo infraorbitale di sinistra precedentemente esposto attraverso operazione chirurgica effettuata pochi millimetri dai baffi nella regione dorsoventrale del muso. L'elettrodo è stato successivamente connesso, attraverso una procedura di tunneling sotto cute, ad un generatore di impulsi impiantato sottocute nel dorso dell'animale. Poco prima di suturare, è stata misurata l'impedenza degli elettrodi attraverso l'utilizzo di un computer palmare digitale connesso via wireless al generatore di impulsi. Ogni operazione si è conclusa dopo aver verificato un'impedenza tra i 1000 e i 1600 Ohm. Un gruppo di controllo Sham è stato sottoposto alla stessa operazione chirurgica con gli elettrodi e un generatore di impulsi non funzionante.

Dopo 2-3 giorni dall'operazione, il generatore di impulsi è stato attivato per una stimolazione acuta di 3 ore utilizzando parametri che sono vicini al range terapeutico della VNS: 30 secondi on, 5 minuti off; ciclo continuo; 30 Hz, tempo dell'impulso di 500 μ s; ampiezza dell'impulso 3,5mA.

Gli animali sono stati stabulati individualmente per tutta la durata dell'esperimento ed hanno avuto libero accesso a cibo e acqua, la quantità di cibo consumato e il peso corporeo sono stati monitorati quotidianamente per tutta la durata dell'esperimento.

Dopo 3 ore di stimolazione, gli animali sono stati anestetizzati e i cervelli perfusi con 200 ml di tampone fosfato seguito da 250 ml di paraformaldeide al 4% (pH 7.4). I cervelli sono stati rimossi e conservati in paraformaldeide per 24 ore e successivamente in soluzioni crescenti di saccarosio (10, 20 e 30 %) per 3 giorni e conservati a 4°C.

Perfusione ed immunohistochimica

Ogni cervello è stato sezionato in sezioni coronali dello spessore di 30 µm con il criostato (Bio-Optica Microm, HM 560), e conservate in anticongelante a -20°C fino all'analisi immunohistochimica. La regione sezionata comprende le aree di indagine: corteccia prefrontale somatosensitiva, amigdala e nucleo endopiriforme, aree situate tra le coordinate dell'atlante stereotassico di Paxinos e Watson (1988): interneural 6.7 mm - 4.2 mm e bregma -2.3 mm - / -4.8 mm. Inoltre sono state effettuate sezioni coronali dell'area troncoencefalica in cui sono presenti i nuclei trigeminali (interneural -5.3 mm / 0.8 mm; bregma -14.3 mm - 9.8 mm).

L'espressione di c-Fos è stata caratterizzata attraverso la tecnica immunohistochimica in sezioni free-floating che sono state portate a temperatura ambiente in accordo con il seguente protocollo:

- idratazione mediante 3 lavaggi per 5 minuti in tampone fosfato 1X (PBS, pH 7.4)

- Incubazione per 10 minuti con la soluzione, allo 0.3% di H₂O₂ e 0.3% Normal Horse Serum in PBS, per disattivare le perossidasi endogene cellulari.
- 3 lavaggi in PBS 1X per 5 minuti
- Incubazione con la soluzione Blocking (2 % Normal Horse serum, 0.3% Triton X100 in PBS 1X) per 30 minuti.
- Incubazione per 3 giorni con l'anticorpo primario Sheep anti c-fos, (1:500; Chemicon, Millipore cat. No AB1584), Triton X100, 2% Normal Horse Serum, PBS 1X a 4°C.
- 3 lavaggi in PBS 1X per 5 minuti
- Incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario biotinitato anti-sheep IgG (concentrazione 5 µg/ml; Vector Labs, BA6000), 0.15% triton X100, PBS 1X, 2 % Normal Horse Serum.
- 3 lavaggi in PBS 1X per 5 minuti
- Incubazione per 30 minuti al buio con il complesso Avidina–Biotina perossidasi, Vectasain ABC Elite Kit (Vector Lab, PK-6100) in PBS 1X.
- 3 lavaggi in PBS 1X per 5 minuti
- Reazione visualizzata mediante, il Kit “peroxidase substrate Kit DAB (Vector Labs, SK-4100), per ogni 2,5 ml di acqua distillata sono state diluite 2 gocce del

cromogeno 3'3-Diaminobenzidina (DAB), 1 goccia di perossido di idrogeno, 1 goccia di buffer pH 7.5, 1 goccia della soluzione Nickel.

- 2 lavaggi con acqua distillata seguiti da 3 lavaggi in PBS 1X

Dopo i lavaggi le fettine sono state montate sui vetrini, asciugate a 50 °C per 20 minuti e deidratate a concentrazioni di etanolo crescenti: 2 minuti in etanolo 96% e 2 minuti in etanolo al 100% e successivamente le fettine sono state chiarificate mediante lo Xilene con 3 lavaggi di 3 minuti ciascuno. Le fettine sono state montate con il montante (Vecta Mount, Vector Labs, Peterborough, UK) e i vetrini lasciati asciugare.

Il numero delle cellule Fos positive sono state determinate in 24 sezioni coronali divise in 6 vetrini (30µm di spessore e separate da 120 µm). Per minimizzare l'errore si è effettuata la conta delle cellule con over-espressione di c-Fos, che al microscopio ottico (Nikon), sono apparse di colore nero intenso.

Stimolazione del nervo infraorbitale e somministrazione di Pentilentetrazolo.

Ad un gruppo di animali sono state indotte crisi convulsive mediante l'agente Pentilentetrazolo (Sigma Aldrich, P-6500) attraverso il seguente protocollo:

La concentrazione di Pentilentetrazolo utilizzata è di 70 mg/Kg/3ml. Gli animali sottoposti a TNS sono stati iniettati intraperitonealmente dopo 30 minuti l'inizio della stimolazione, con un intervallo di 10 minuti tra ogni animale stimolato, mentre gli sham sono stati iniettati in sessioni posticipate di 5 minuti rispetto ad ogni TNS. La durata totale della stimolazione, è stata di 3 ore. Dopodiché gli animali, previa anestesia sono stati sacrificati,

e diverse parti del cervello sono state prelevate come l'ippocampo, corteccia prefrontale e corteccia somatosensitiva e conservate immediatamente a -80° C. Le aree prelevate saranno oggetto di analisi future mediante estrazione dell'mRNA della subunità alfa dell'acido γ -amminobutirrico.

L'intero esperimento è stato registrato mediante una fotocamera digitale e i dati analizzati considerando l'onset, la durata e l'entità di ogni crisi nel corso delle 3 ore di stimolazione.

RISULTATI

Area somatosensitiva, amigdala e nucleo endopiriforme

Analisi statistica dei dati immunohistochimici dell'area somatosensitiva, amigdala e nucleo endopiriforme. I dati sono stati presentati come Standard Error Means (S.E.M) e analizzati con l'analisi t-tests mediante l'uso del software GraphPad, Prism 5. L'analisi è stata eseguita su un totale di 6 animali: 3 TNS e 3 Sham.

In tutte le aree di interesse l'espressione di c-Fos negli animali stimolati è maggiore rispetto ai controlli. In dettaglio nella corteccia frontoparietale, a livello dell'area somatosensitiva le cellule hanno subito un incremento di c-Fos negli animali TNS (980 ± 130 , $P < 0.437$) rispetto ai controlli (390 ± 190) (Fig. 1, 2, 3, 4, 5). Nell'amigdala l'espressione del marker neuronale è incrementata dopo stimolazione (995.7 ± 84.28 , $P < 0.0001$) rispetto agli animali non stimolati (247 ± 18.20), (Fig. 6, 7, 8, 9), e nel nucleo endopiriforme il numero delle cellule positive al c-Fos dopo stimolazione (107.2 ± 7.820 , $P < 0.0001$) è risultato essere nettamente maggiore rispetto allo Sham ($10,21 \pm 0.1$), (Fig. 6, 7, 8, 11).

Inoltre la stimolazione ha indotto un incremento di Fos controlateralmente al sito di stimolazione rispetto al lato ipsilaterale di ciascuna area presa in esame. Il numero di cellule nell'area somatosensitiva (Fig. 1), amigdala e nucleo endopiriforme (Fig. 6) controlaterale hanno subito un incremento dell'espressione di c-Fos (863.8 ± 133.1 ,

$P < 0.0007$; 940.7 ± 83.58 , $P < 0.0001$; 101.1 ± 7.868 , $P < 0.0001$) rispetto alla controparte ipsilaterale (Fig. 3, 8) (130.6 ± 38.55 ; 116.8 ± 12.02 ; 6.308 ± 2.648) (Fig. 5, 10, 12).

Nuclei trigeminali

I dati presentati sono stati sottoposti ad analisi della varianza ad una via (ANOVA) per comparare tra i diversi nuclei costituenti il complesso trigeminale sensitivo la diversa attivazione neuronale. I nuclei trigeminali suddivisi in nucleo principale, nucleo orale, interpolare e caudale hanno mostrato una differente espressione di c-Fos. Infatti il diverso numero di cellule attivate nel nucleo principale (143.6 ± 35.15), nucleo orale (78 ± 27.24), nucleo interpolare (126.2 ± 12.66) e caudale (95.6 ± 20.18) (Fig. 13) è risultato statisticamente significativo $P(0.0035)$. Inoltre mediante l'analisi della varianza a due vie (ANOVA) si è comparata la diversa espressione di c-Fos tra i nuclei trigeminali ipsilaterali e contro laterali la stimolazione (Fig. 14). La variazione calcolata tiene conto della diversa distribuzione delle cellule marcate in tutta la popolazione contro laterale che quella ipsilaterale e della variabilità dell'espressione di c-Fos tra i diversi nuclei ed i risultati ottenuti hanno mostrato che il numero di cellule positive al Fos varia significativamente $P(0.0094)$ con un incremento maggiore delle cellule marcate nel lato ipsilaterale la stimolazione.

Questo è evidente in due sub-nuclei spinali trigeminali, il nucleo spinale caudale ipsilaterale (70 ± 6.804 , $P < 0.0005$;) e contro laterale (25.60 ± 3.970) ed il nucleo interpolare ipsilaterale (88.60 ± 8.195 , $P < 0.0006$) e controlaterale: (37.60 ± 4.545) ma non nel nucleo orale e principale trigeminale di cui quest'ultimo pur essendoci un alto numero di cellule positive al Fos non è stata riscontrata una differenza con il nucleo contro laterale.

Analisi comportamentale

I risultati ottenuti sui 4 ratti resi epilettici mostrano che gli animali stimolati hanno una ripresa di tutte le attività normali più rapida rispetto agli Sham ($P = 0,0172$) (Fig. 15).

L'onset delle crisi si mostra prima nei TNS, ma con una gravità del tipo di crisi minore. La diversa tipologia delle crisi è stata suddivisa in 6 tipi, contrassegnate dai numeri da 1 a 6 a seconda dell'entità convulsiva:

- tipo 1: spasmi facciali
- tipo 2: da 1 a 20 convulsioni degli arti anteriori
- tipo 3: più di 20 convulsioni degli arti anteriori in 20 minuti
- tipo 4: convulsioni cloniche degli arti
- tipo 5: convulsioni cloniche generalizzate
- tipo 6: convulsioni generalizzate con episodi di estensioni toniche e stato epilettico.

Durante lo stato convulsivo gli animali stimolati hanno avuto crisi di tipo 3 di una durata maggiore (28.50 ± 2.5 , $P < 0.0082$) rispetto agli sham (0.5 ± 0.5) e una durata minore delle

crisi di entità più grave: quelle di tipo 5 ($12.50 \pm 0.5, P < 0.0479$) e di tipo 6 ($7.5 \pm 2.5, P < 0.0265$) rispetto allo Sham (61.00 ± 11.00 e 31.00 ± 3.0) rispettivamente (Fig. 16).

DISCUSSIONE

I dati di questo studio preliminare indicano che la stimolazione elettrica unilaterale della branca infraorbitaria del nervo trigemino nel ratto induce l'espressione della proteina c-Fos e la diminuzione delle convulsioni indotte sperimentalmente. In particolare si è riscontrato un incremento del marker neuronale a livello delle aree implicate nella fisiopatologia dell'epilessia come l'area somatosensitiva della corteccia frontoparietale, amigdala e nucleo endopiriforme. L'analisi immunostochimica dei cervelli dei due gruppi sperimentali, animali stimolati e i controlli, ha permesso di evidenziare la capacità della stimolazione di attivare i neuroni delle aree di interesse. La marcatura è stata rilevata controlateralmente nelle regioni superiori rispetto ai nuclei tronco encefalici trigeminali in cui l'aumento di c-Fos è stato marcato ipsilateralmente dopo la stimolazione. Questo indica che i parametri di stimolazione utilizzati sono sufficienti per far giungere il segnale dalla periferia verso i sistemi più profondi inducendo cambiamenti nell'espressione genica a livello nucleare. Questi cambiamenti molecolari potrebbero essere coinvolti nella diminuzione delle crisi convulsive dopo somministrazione di pentilentetrazolo mostrate in questo lavoro.

I parametri di stimolazione utilizzati per l'esperimento sono stati sufficienti per causare l'attivazione neuronale di queste aree e per indurre una diminuzione delle convulsioni nell'arco di 3 ore.

Il proto oncogene c-Fos grazie alla sua rapida induzione e alla sua bassa concentrazione basale nel SNC è ormai utilizzato da anni nella rilevazione dell'attività cellulare dopo qualsiasi stimolo indotto. Tra questi stimoli, la stimolazione del nervo trigemino contribuisce all'induzione di c-Fos in ratti svegli.

Il nervo infraorbitale è costituito da un largo fascio di circa 100-200 fibre (Rice et al., 1986) miste. A seconda della diversa velocità e del tipo di risposta dei diversi meccanorecettori che innervano le vibrisse, le fibre si suddividono in fibre C, A β and A δ .

Nell'animale la maggior parte dei neuroni del Ganglio di Gasser ricevono input sensitivi dalle vibrisse attraverso il nervo infraorbitale. I neuroni del ganglio a seconda del diverso stimolo che viene proiettato dalle vibrisse, vengono divisi in neuroni a lento adattamento (LA) e veloce adattamento (VL). (Fitzgerald, 1940; Kerr and Lysak, 1964; Lichtenstein et al., 1990; Leiser and Moxon, 2007) . In generale i neuroni del ganglio trigeminale ricevono input dal nervo infraorbitale che riesce ad attivare un vasto range di "soglie" di attivazione che variano principalmente in ampiezza e velocità ed anche a seconda del movimento del baffo. (Arabzadeh et al., 2005; Leiser and Moxon, 2007; Khatri et al., 2009; Gerdjikov et al., 2010). Non sono state effettuate fino ad ora analisi della rilevazione di c-Fos dopo stimolazione elettrica ad alte intensità del nervo infraorbitario ma altri tipi di studi hanno analizzato l'effetto della stimolazione del Ganglio di Gasser a basse ed alte intensità sull'espressione di c-Fos (Takemura et al., 2000), dimostrando che quest'ultima incrementa l'espressione di c-Fos nei nuclei trigeminali, Soprattutto nel lato ipsilaterale il sito di

stimolazione. Si è dimostrato che una bassa intensità di stimolazione elettrica del ganglio attiva principalmente fibre mieliniche, e una maggiore intensità attiva un numero maggiore di fibre come anche quelle sottili (Woolf e Wall, 1982; Nishimori et al., 1990). Presumibilmente, i parametri usati nella stimolazione del nervo infraorbitale attiva anche le fibre sottili a livello del Ganglio di Gasser e il diverso numero di cellule rilevato a livello di ogni singolo nucleo potrebbe derivare dal diverso adattamento di ogni singola fibra e dal numero totale della popolazione neuronale in ciascuno dei nuclei trigeminali. Al sistema trigeminale sensitivo infatti, proiettano fibre mieliniche, come nel nucleo principale trigeminale e fibre di tipo C come nel nucleo Spinale caudale. Inoltre esistono molte proiezioni internucleari all'interno del sistema trigeminale sensitivo (Furuta et al., 2008; Timofeeva et al., 2005; Lee et al., 2008a) in particolare i neuroni glutamatergici del Sp5C proiettano al Pr5, in questo modo il nucleo spinale potrebbe modulare la sensibilità del nucleo principale sensitivo agli input provenienti dal nervo infraorbitale. Questo potrebbe spiegare l'aumento di c-Fos contro laterale nel Pr5, mostrato in questo lavoro.

L'aumento dell'attività neuronale rilevata a livello della corteccia è dovuta agli input provenienti dai nuclei trigeminali. Esistono 6 vie con cui il segnale viene trasportato dai nuclei trigeminali sino alla corteccia e queste vie trasportano varie sensibilità (Yu et al., 2006). Il talamo è la principale via verso la corteccia cerebrale. è composto da alcuni nuclei, due dei quali sono critici nella trasmissione degli stimoli provenienti dal nervo infraorbitale verso la corteccia somatosensitiva: il VPM ed il Pom. Tra tutte le vie trigemino-talamico-corticali, la via del lemnisco è l'unica che maggiormente converge input da una singola vibrissa. Questa via di-sinaptica trasporta input dal Pr5 alla corteccia somatosensitiva attraverso il VPM (Erzurumlu et al., 1980; Williams et al., 1994). I principali target sono lo strato corticale 4 ma ci sono anche afferenze a livello degli strati 5 e 6. (Killackey, 1973;

Petreanu et al., 2009). Una seconda via è quella extralemniscale, che passa attraverso il VPM ventrolaterale. Gli input di questa via originano da più vibrisse che attraverso il Sp5I giungono nello strato 4 e 6 della corteccia somatosensitiva (Pierret et al., 2000). La proiezione di questa via giunge anche sul sistema limbico.

La terza via, del paralemnisco, nasce dal Sp5I, afferisce al Pom e sinapta con la corteccia somatosensitiva e motoria, ma anche nello striato (Alloway et al., 2006), cortex peririnale ed insulare. Esistono altre 3 vie, la prima trasporta informazione dalle cellule del Pr5, che attraverso il Pom giunge nella corteccia somatosensitiva (Furuta et al., 2009). La seconda coinvolge le proiezioni del nucleo Sp5i al nucleo laterodorsale del talamo (LD), il quale proietta alla corteccia cingolata e retrospleniale e sparsamente alla corteccia somatosensitiva. E infine viene rappresentata la sesta via come la meno caratterizzata, che origina dal Sp5O, proietta alle regioni talamiche incluso il VPM ed il Pom (Veinante et al., 2000a). Queste regioni talamiche ricevono input da differenti modalità sensitive e proiettano alla corteccia peririnale, striato e amigdala (Groenewegen and Witter, 2004). Quindi tutte queste vie potrebbero essere entrate in gioco nell'attivazione delle cellule della corteccia. Oltre le proiezioni contro laterali al talamo, il Pr5 a differenza degli altri nuclei del complesso trigeminale proietta debolmente al talamo ipsilaterale e di conseguenza alla corteccia somatosensitiva. La debole marcatura di c-Fos rilevata nella corteccia somatosensitiva ipsilaterale potrebbe essere dovuta all'attivazione di queste fibre. Se invece andiamo ad analizzare l'aumento di c-Fos rispetto ai suoi livelli basali nello Sham si osserva che anche lo Sham pur non avendo ricevuto stimolazione ha espresso la proteina Fos anche se in misura significativamente minore rispetto all'animale stimolato. Questo incremento potrebbe essere dovuto dalla stimolazione meccanica esercitata dell'elettrodo sul nervo in quanto nel lato ipsilaterale della stessa sezione della corteccia l'aumento non si

verifica. L'aumento di c-Fos a livello dell'amigdala e del nucleo endopiriforme negli animali stimolati rispetto ai controlli è risultato ancora più evidente rispetto alla corteccia. Oltre alla proiezione indiretta dal SpVo, che attraverso il VPM giunge all'amigdala la proiezione più rappresentativa origina dalla corteccia. Infatti la maggior risorsa di informazioni sensitive all'amigdala è la corteccia cerebrale (McDonald et al., 1998). La maggior parte delle afferenze dalla corteccia sono ipsilaterali ed entrano a livello dell'amigdala attraverso la capsula esterna (Mascagni et al., 1993). Le informazioni corticali che giungono all'amigdala derivano soprattutto dalla corteccia somatosensitiva. Inoltre le afferenze sensitive raggiungono l'amigdala attraverso il nucleo parabrachiale pontino, nuclei talamici, nucleo genicolato e nucleo internucleare posteriore (PIN) il quale si presume un suo coinvolgimento nella trasmissione nocicettiva. Il nucleo endopiriforme è associato strettamente con i nuclei amigdaloidi ipsilaterali, infatti insieme all'amigdala formano un complesso di proiezioni reciproche molto forti. L'attivazione del nucleo endopiriforme potrebbe essere dovuta sia alle vaste proiezioni con varie aree corticali tra cui anche l'area somatosensitiva e sia dal fitto scambio di proiezioni con l'amigdala. Il nucleo endopiriforme è considerato insieme al claustrum come sito di propagazione dell'attività epilettica dell'amigdala verso altre regioni della corteccia soprattutto quella motoria (Zhang et al., 2001). Il numero ridotto delle crisi indotte da pentilentetrazole nell'animale sottoposto a stimolazione del nervo trigemino potrebbe proprio agire su queste aree ed indirettamente anche ad altre strutture, presumibilmente alzando la soglia di attivazione sincrona della scarica epilettica e modificando la concentrazione molecolare di particolari neurotrasmettitori come il GABA. L'alta frequenza utilizzata potrebbe essere uno dei fattori di desincronizzazione in quanto si è ipotizzato che la desincronizzazione indotta dalla VNS ad alte frequenze sia nel ratto (Woodbury, 1990, Zabara, 1992, Takaya, 1996) che

nell'uomo (Mclachlan, 1997) possa essere mediata dalle afferenze dolorifiche C che costituiscono il 65-90% del contingente di fibre vagali. Per quanto riguarda la TNS sia gli effetti clinici anticonvulsivanti (De Giorgio, 2003, 2006, 2009) che la desincronizzazione eegrafica registrata nel ratto (Fanselow, 2000) si sono ottenuti con stimoli ad alta frequenza. Attraverso quali strutture la stimolazione possa esplicare la propria funzione è ad oggi sconosciuto ma sono note le connessioni tra il sistema trigeminale e il nucleo del tratto solitario, il locus coeruleus, il nucleo dorsale del rafe e il nucleo reticolare laterale (Zerari-Mailly et al., 2005) che non a caso sono implicati sia nella modulazione della soglia dolorifica che di quella convulsiva. Queste strutture sono le stesse che mediano l'effetto antiepilettico della stimolazione vagale (Neuman, 1986; Krahl, 1998; Walker 1999, Magdaleno, 2002), attraverso l'induzione di un diffuso arousal, secondario all'attivazione della formazione reticolare (FR) ascendente, e l'incremento globale corticale di norepinefrina, serotonina e gaba (Browning, 1991; Hammond, 1992; Ben-Menachem, 1995). Lo stesso meccanismo parrebbe plausibile per la TNS (Fanselow, 2000; De Giorgio 2003, 2006, 2009) che potrebbe influenzare il sincronismo delle proiezioni talamo-corticali attraverso la FR e aumentare la soglia convulsiva corticale grazie alla stessa liberazione neurotrasmettitoriale. L'interazione tra la VNS e il sistema trigeminale potrebbe essere di qualche aiuto nella comprensione del meccanismo di azione della TNS. La relazione trigemino e nervo vago è nota (Caous, 2001). Il nervo vago infatti proietta direttamente al nucleo paratriginale e al locus coeruleus e al nucleo del rafe che modulano le risposte sensitive del nucleo spinale trigeminale. A conferma di questa connessione è riportata sia la comparsa di dolore facciale sotto stimolazione vagale ciclica o intermittente ad alta frequenza che l'impiego analgesico della stimolazione vagale sul dolore trigeminale (Bossut e Maixner, 1996; Multon e Shoenen, 2005; Carius, 2005). Nei modelli animali dopo VNS si

è visto un aumento dell'inibizione gabaergica e un'attenuazione dell'espressione del gene Fos nel nucleo caudale trigeminale che potrebbero spiegare questi effetti analgesici (Bohotin, 2003). Anche il trigemino proietta a sua volta al vago come dimostrato dal riflesso trigemino-cardiaco che è un riflesso autonomo scatenato da intense stimolazioni meccaniche ed elettriche delle strutture perioculari, mediato dal nucleo paratrigeminale, con effetti depressogeni cardiaci (bradicardia, ipotensione arteriosa, apnea, ipomotilità gastrica) (Cha., 2002). Questa relazione tra i due nervi potrebbe essere alla base dell'azione antiepilettica delle due stimolazioni. Con il vantaggio nella TNS di poter essere applicata bilateralmente. La bilateralità delle proiezioni corticali di ogni singola branca trigeminale assicura, come per la VNS, un effetto biemisferico anche per stimoli lateralizzati e indipendente dalla localizzazione del focolaio epilettogeno. Per cui la stimolazione bilaterale non può che avere effetti aggiuntivi nell'ambito di ciascun emisfero. Questa consentirebbe inoltre di abbassare l'apporto di corrente per singola branca, minimizzando il danno potenziale a carico del nervo, senza perdere di efficacia rispetto a una stimolazione unilaterale a più alta intensità.

In conclusione la stimolazione del nervo trigemino a determinati parametri ci ha permesso di osservare l'attivazione dei neuroni nell'area somatosensitiva della corteccia frontoparietale, dell'amigdala e del nucleo endopiriforme. L'attivazione di queste aree, implicate nella fisiopatologia dell'epilessia, dimostra, nell'animale stimolato rispetto al controllo, che la stimolazione attiva le fibre afferenti del nervo infraorbitario fino alle aree di interesse. L'attivazione che ne comporta induce diminuzione delle crisi convulsive attraverso un meccanismo di azione ancora sconosciuto nonostante si sia dimostrato l'azione anticonvulsivante della TNS.

FIGURE

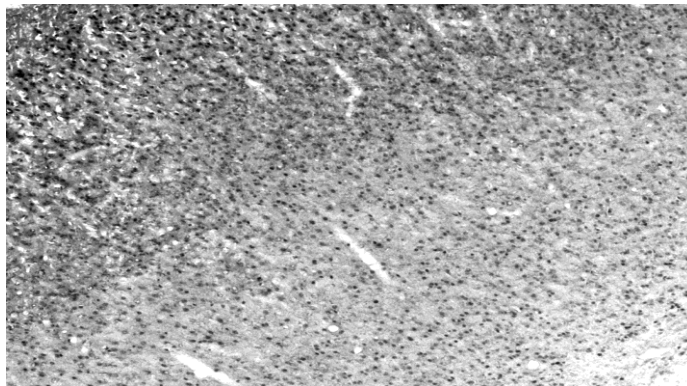


Figura 1: Immunoistochimica di c-Fos, sezione della corteccia somatosensitiva controlaterale la TNS

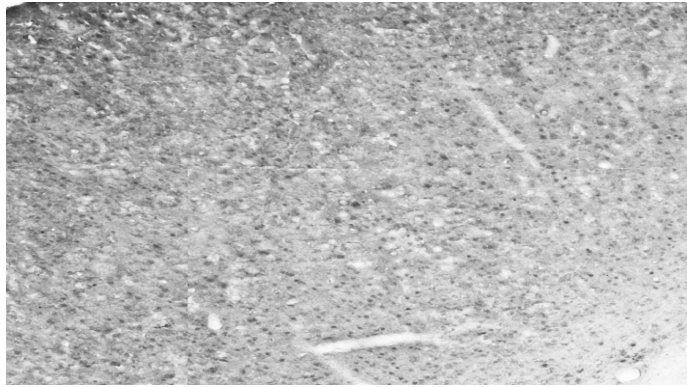


Figura 2: Immunoistochimica di c-Fos, sezione della corteccia Somatosensoriale controlaterale al sito dell'operazione chirurgica nello Sham.

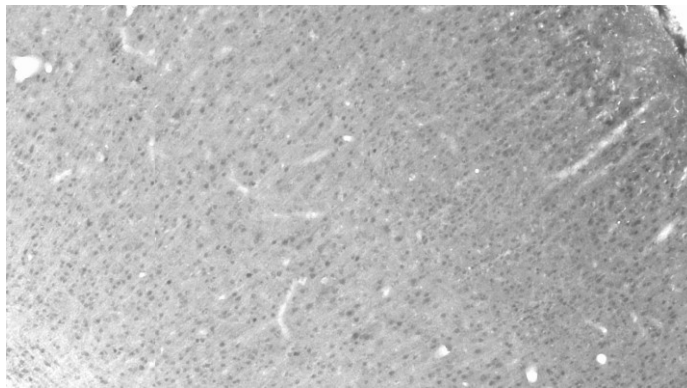


Fig.3: Immunoistochimica di c-Fos, sezione della corteccia somatosensitiva ipsilaterale la TNS.

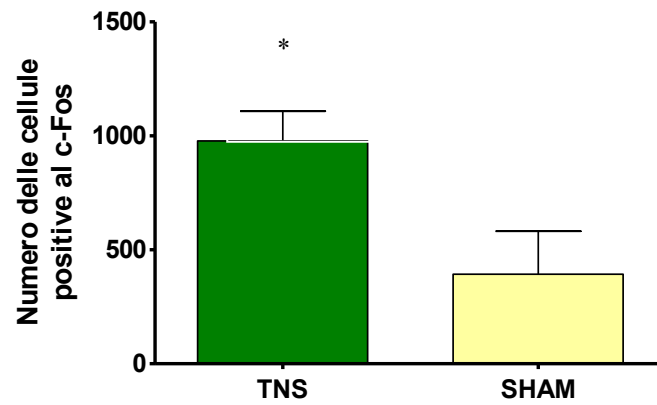


Figura 4: Rappresentazione dell'incremento di c-Fos nell'area somatosensitiva della corteccia frontoparietale nell'animale sottoposto a TNS rispetto allo Sham.

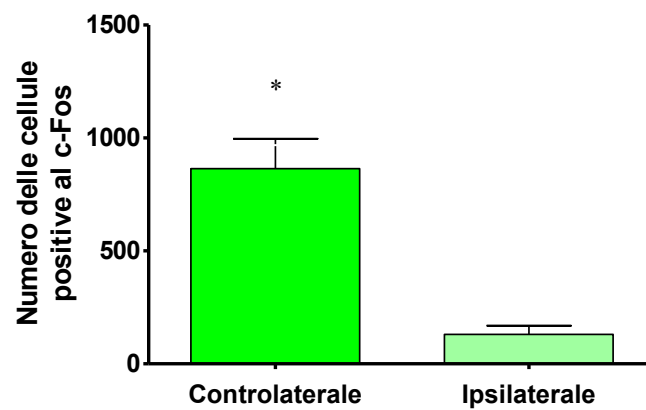


Figura 5: Incremento di c-Fos nell'area somatosensitiva della corteccia frontoparietale controlaterale al sito di stimolazione rispetto al lato ipsilaterale nel TNS.

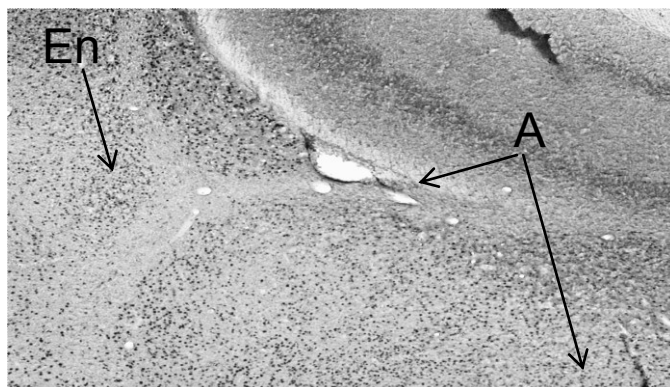


Figura 6: Immunoistochimica di c-Fos, sezione coronale del cervello a livello dell'Amigdala (A) e del nucleo endopiriforme (En) controlaterale la TNS.

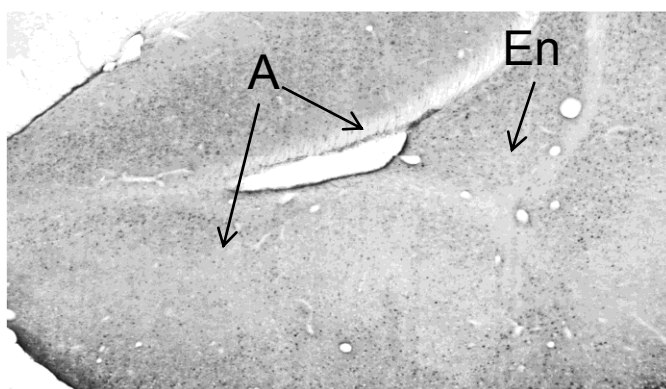


Figura 7: Immunoistochimica di c-Fos, sezione del cervello a livello dell'amigdala e del nucleo endopiriforme controlaterale al sito dell'operazione chirurgica nello Sham.

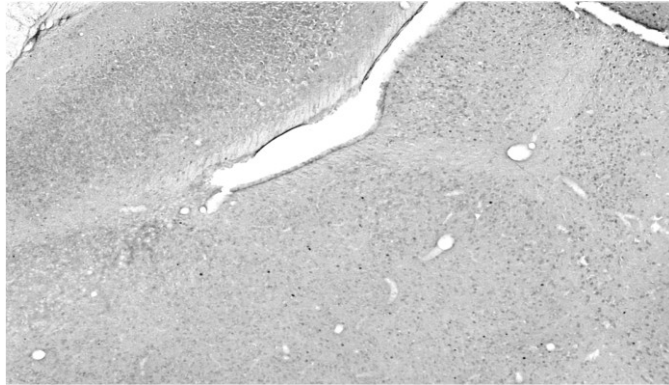


Figura 8 : Immunoistochimica di c-Fos, sezione del cervello a livello dell'amigdala e del nucleo endopiriforme ipsilaterale il sito della TNS

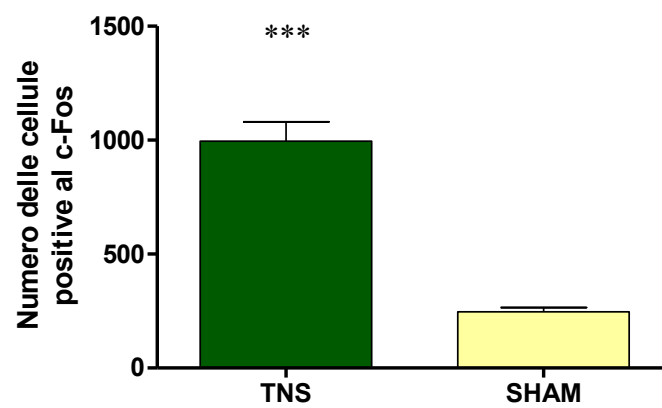


Figura 9: Espressione di c-Fos nell'amigdala degli animali stimolati rispetto ai controlli.

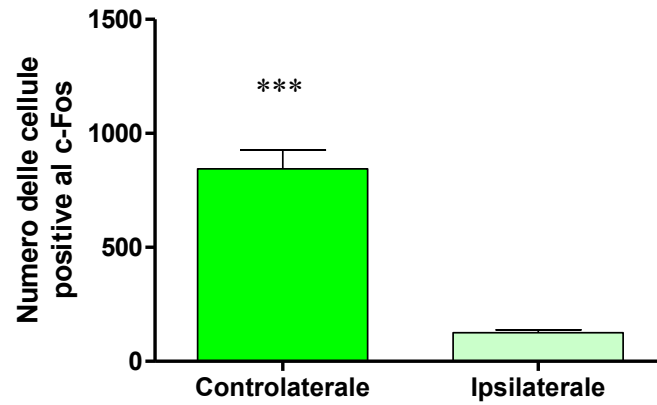


Figura 10: Aumento dell'espressione di c-Fos nell'amigdala controlaterale rispetto al lato ipsilaterale la TNS

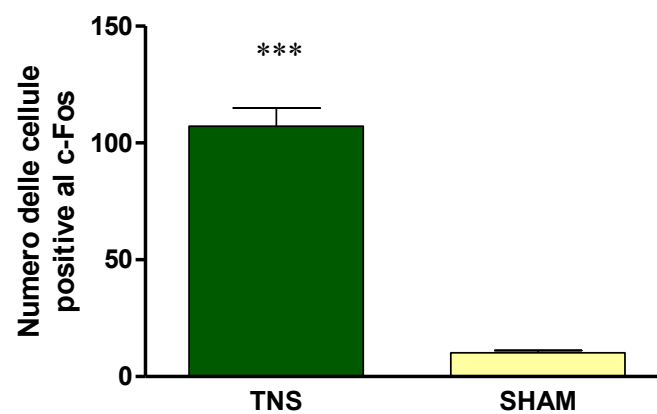


Figura 11: Aumento dell'espressione di c-Fos nel nucleo endopiriforme dopo stimolazione trigeminale rispetto ai controlli.

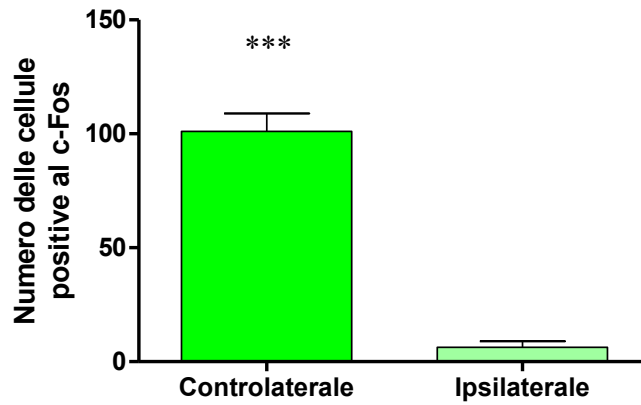


Figura 12: Incremento di c-Fos nel nucleo endopiriforme controlaterale rispetto al lato ipsilaterale laTNS

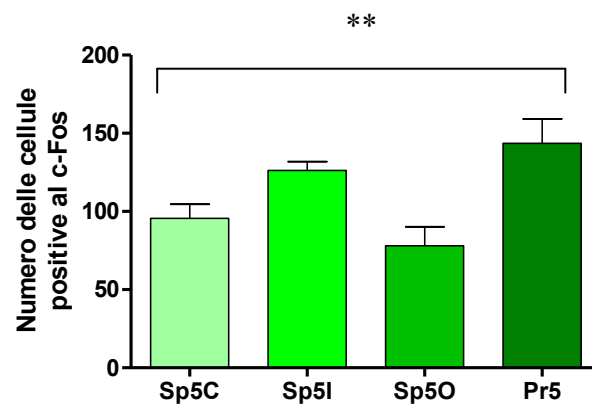


Figura 13: Distribuzione dell'espressione di c-Fos nei nuclei

trigeminali spinali (Sp5C, Sp5I, Sp5O) e nel nucleo principale trigeminale dopo stimolazione del nervo infraorbitario

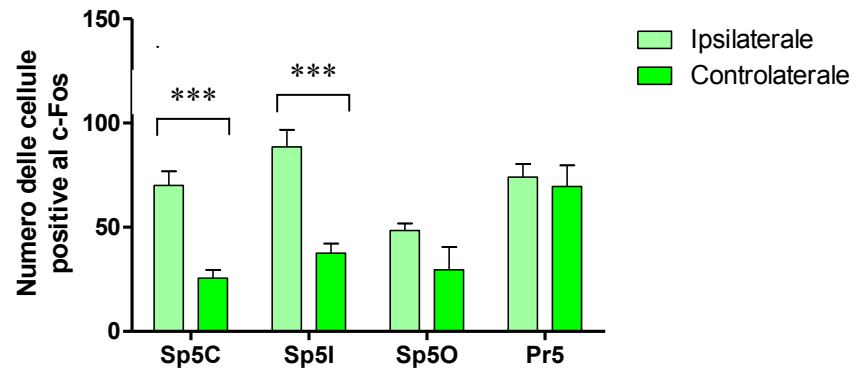


Figura 13: rappresentazione della diversa espressione di c-Fos nel complesso sensitivo del trigemino contro laterale che ipsilaterale la stimolazione del nervo infraorbitario

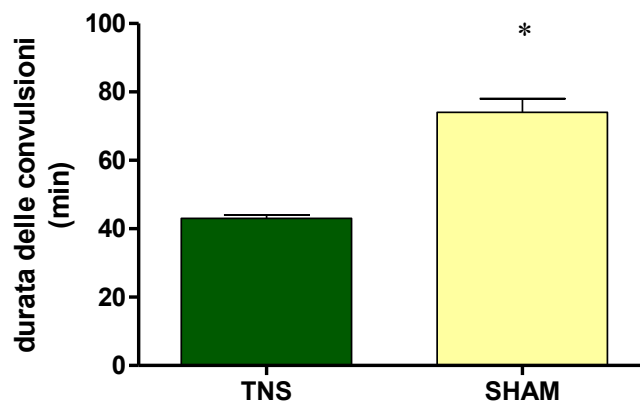


Figura 15: Rappresentazione dell'occorrenza media dell'ultima crisi tra animali stimolati e Sham.

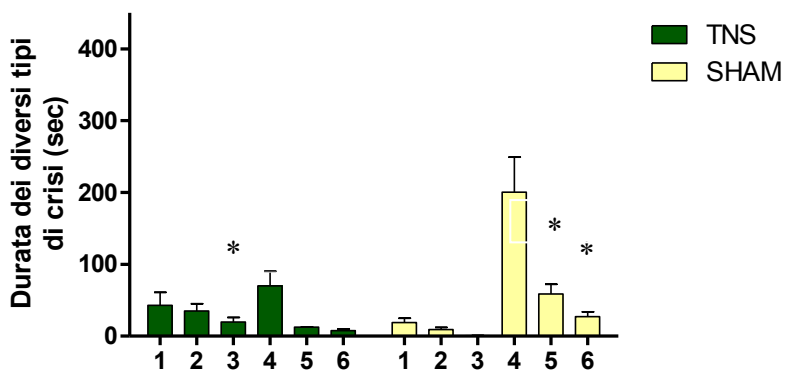


Figura 16: durata media dei 6 tipi di crisi convulsive indotte da PTZ negli animali stimolato rispetto ai controlli.

BIBLIOGRAFIA

Deriu Silvia, La stimolazione elettrica trigeminale modifica l'espressione genica di c-Fos e diminuisce le crisi epilettiche nel ratto, tesi di dottorato in scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari.

1. **Alloway, K. D.**, Mutic, J. J., Hoffer, Z. S., and Hoover, J. E. Overlapping corticostriatal projections from the rodent vibrissal representations in primary and secondary somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 428, 51–67. 2000
2. **Arabzadeh, E.**, Zorzin, E., and Diamond, M. E. Neuronal encoding of texture in the whisker sensory pathway. *PLoS Biol.* 2005
3. **Arvidsson B.** Somatotopic organization of vibrissae afferents in the trigeminal sensory nuclei of the rat studied by transganglionic transport of HRP. *J. Comp. Neurol.* 211, 84-92. 1982
4. **Bading H**, Ginty D.G, Greenberg M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signalling pathways. *Science* 260, 181-186, 1993.
5. **Barnes A**, Duncan R, Chisholm JA, Lindsay K, Patterson J, Wyper D Investigation into the mechanisms of vagus nerve stimulation for the treatment of intractable epilepsy, using ^{99m}Tc-HMPAO SPET brain images. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30: 301–305. 2003
6. **Belford, G. R.**, and Killackey, H. P. (1979). Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J. Comp. Neurol.* 183, 305–321.
7. **Ben-Menachem E**, Manon-Espaillet R, Ristanovic R, et al. Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. *Epilepsia* May;35:616-626, 1994.
8. **Bernard JF**, Peschanski M, Besson JM. A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neurosci Lett* 100: 83–88, 1989.

9. **Bohning DE**, Lomarev MP, Denslow S, Nahas Z, Shastri A, George MS. Feasibility of vagus nerve stimulation-synchronized blood oxygenation level-dependent functional MRI. *Invest Radiol* Aug;36:470-479, 2001.
10. **Boon P**, Vonk K, De Reuck J, Caemaert J: Vagus nerve stimulation for refractory epilepsy. *Seizure* 10: 456-8, 2001.
11. **Bordi F** and Ledoux JE. Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. II. Cells receiving convergent auditory and somatosensory inputs and cells antidromically activated by amygdala stimulation. *Exp Brain Res* 98: 275–286, 1994.
12. **Bohotin V**, Schoenen J. Vagus nerve stimulation in awake rats reduces formalin-induced nociceptive behaviour and fos-immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis. *Pain* Jan;101:3, 2003.
13. **Bossut DF**, Maixner W. Effects of cardiac vagal afferent electrostimulation on the responses of trigeminal and trigeminothalamic neurons to noxious orofacial stimulation. *Pain* Apr;65:101-109. 1996
14. **Camfield PR**, Camfield CS. Antiepileptic drug therapy: when is epilepsy truly intractable? *Epilepsia*; 37 Suppl 1:S60-S65, 1996.
15. **Campeau S**, Watson S.J. Neuroendocrine and behavioural responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *Journal of Neuroendocrinology*. 9, 577-588, 1997.
16. **Carius A**, Schulze-Bonhage A. Trigeminal pain under vagus nerve stimulation. *Pain Nov*; 118:271-273. 2005
17. **Castle M**, Comoli E, Loewy AD. Autonomic brainstem nuclei are linked to the hippocampus. *Neuroscience*; 134:657-669. 2005.
18. **Cha ST**, Eby JB, Katzen JT, Shahinian HK. Trigemino-cardiac reflex: a unique case of recurrent asystole during bilateral trigeminal sensory root rhizotomy. *J Craniomaxillofac Surg* Apr; 30:108-111. 2002.

19. **Chan R.K.W.** Brown E.R, Ericsson A, Kovacs K.J, Sawchenko P.E.. A comparison of two immediate-early genes c-fos and NGFI-B as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *Journal of Neuroscience* 13, 5126-5138, 1993.
20. **Chase MH**, Nakamura Y, Clemente CD, Serman MB. Afferent vagal stimulation: neurographic correlates of induced EEG synchronization and desynchronization. *Brain Res Jun*; 5:236-249. 1967.
21. **Cunningham Jr.E.T**, Sawchenko P.E. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*. 274.60-76, 1998.
22. **Cunningham JT**, Mifflin SW, Gould GG, Frazer A. Induction of c-Fos and DeltaFosB immunoreactivity in rat brain by Vagal nerve stimulation. *Neuropsychopharmacology* Jul;33:1884-1895. 2008
23. **Curran T**, Morgan JI. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26: 403–412.1999.
24. **DeGiorgio CM**, Schachter SC, Handforth A, et al. Prospective long-term study of vagus nerve stimulation for the treatment of refractory seizures. *Epilepsia*; 41:1195–1200. 2000.
25. **DeGiorgio CM**, Murray D, Markovic D, Whitehurst T. Trigeminal nerve stimulation for epilepsy: long-term feasibility and efficacy. *Neurology* Mar 10; 72:936-938, 2009.
26. **DeGiorgio CM**, Shewmon A, Murray D, Whitehurst T. Pilot study of trigeminal nerve stimulation (TNS) for epilepsy: a proof-of-concept trial. *Epilepsia* Jul ;47:1213-1215, 2006.
27. **DeGiorgio CM**, Shewmon DA, Whitehurst T. Trigeminal nerve stimulation for epilepsy. *Neurology* Aug 12; 61:421-422, 2003.

28. **Ding J.M.**, Carver W.C, Terracio L, Buggy J.. Proto-onco-gene c-fos and the regulation of vasopressin gene expression during dehydration. *Molecular Brain Research* 21, 245-255, 1994.
29. **Dorr AE, Debonnel G.** Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther*; 318:890-898. 2006.
30. **Doucet J.P**, Squinto S.P, Bazan N.G. Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system. *Molecular Neurobiology*. 27-55, 1990.
31. **Duncan G.E**, Johnson K.B, Breese G.R. Topographic patterns of brain activity in response to swim stress-assessment by 1-deoxyglucose and expression of Fos-like immunoreactivity. *Journal of Neuroscience*. 13, 3932-3943, 1993.
32. **Ericsson A**, Kovacs K.J, Sawchenko P.E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effect of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *Journal of Neuroscience* 14, 897-913, 1994.
33. **Erzurumlu R.S**, and Killackey H.P. Efferent connections of the brainstem trigeminal complex with the facial nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 188, 75–86. 1979.
34. **Erzurumlu R.S**, Bates C.A, Killackey H.P. Differential organization of thalamic projection cells in the brain stem trigeminal complex of the rat. *Brain Res.* 198, 427–433. 1980.
35. **Fanselow EE**, Reid AP, Nicoletti MA. Reduction of pentylentetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J Neurosci* Nov 1;20:8160-8168, 2000
36. **Fields R.D**, Eshete F, Stevens BK. Action potential dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca²⁺/cAMP-responsive element

binding proteins and mitogen-activated protein kinase signalling. *Journal of Neuroscience*.17, 7252-7266, 1997.

37. **Fisher RS**, Handforth A. Reassessment: vagus nerve stimulation for epilepsy: a report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* Sep 11; 53:666-669. 1999.

38. **Fitzgerald**, O. Discharges from the sensory organs of the cat's vibrissae and the modification in their activity by ions. *J. Physiol. (Lond.)* 98, 163–178, 1940.

39. **Follesa P**, Biggio F, Gorini G, et al. Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res* Nov 7;1179:28-34. 2007.

40. **Franza BR.Jr**, Rauscher, FJ III, Josephs SF and Curran T. The fos complex and Fos related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 sites. *Science* 239,1150-1153, 1988.

41. **Furuta, T.**, Timofeeva, E., Nakamura, K., Okamoto-Furuta, K., Togo, M., Kaneko, T., and Deschenes, M. Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *J. Neurosci.* 28, 1789–1797, 2008.

42. **Gaiddon C**, Loerer J.P, Larmet Y. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system. *Neurons. Journal of Neurochemistry*.66, 2279-2286, 1996.

43. **George M.S.**, Nahas Z., Bohning D.E., Mu Q., Kozel F.A., Borckhardt J. Mechanisms of action of vagus nerve stimulation (VNS). *Clin Neurosci Res* 4: 71–79, 2004.

44. **Gerdjikov, T. V.**, Bergner, C. G., Stüttgen, M. C., Waiblinger, C., and Schwarz, C. Discrimination of vibrotactile stimuli in the rat whisker system: behavior and neurometrics. *Neuron* 65, 530–540, 2010.
45. **Ghosh A**, Ginty D.G, Bading H, Greenberg M.E.. Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *Journal of Neurobiology*. 25, 294-303, 1994.
46. **Gieroba ZJ**, Blessing WW Fos-containing neurons in medulla and pons after unilateral stimulation of the afferent abdominal vagus in conscious rabbits. *Neuroscience* 59: 851–858, 1994.
47. **Giorgi FS**, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neurosci. Biobehav Rev* Sep; 28:507-524, 2004.
48. **Greenberg M.E**, Ziff E.B. Stimulation of 2T2 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 433-438, 1984.
49. **Groenewegen H.J**, and Witter, M.P. “Thalamus,” in *The Rat Nervous System*, ed. G. Paxinos, 3rd Edn (Sydney: Academic Press), 407–453, 2004.
50. **Hammond EJ**, Uthman BM, Reid SA, Wilder BJ. Electrophysiologic studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: II. Evoked potentials. *Epilepsia* Nov; 33:1021-1028, 1992.
51. **Handforth A**, DeGiorgio CM, Schachter SC, et al. Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology* Jul;51:48-55, 1998.
52. **Hauser WA**. The natural history of drug resistant epilepsy: epidemiologic considerations. *Epilepsy Res Suppl*, 5:25-28, 1992.
53. **Hayashi, H**. Distributions of vibrissae afferent fiber collaterals in the trigeminal nuclei as revealed by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Brain Res*. 183, 442–446. 1980.

54. **Henry TR**, Bakay RA, Pennell PB, Epstein CM, Votaw JR. Brain blood-flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: II. Prolonged effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia Sep*; 45:1064-1070. 2004
55. **Henry TR**, Bakay RA, Votaw JR, et al. Brain blood flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: I. Acute effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia Sep*; 39:983-990. 1998
56. **Henry TR**, Votaw JR, Pennell PB, et al. Acute blood flow changes and efficacy of vagus nerve stimulation in partial epilepsy. *Neurology Apr 12*; 52:1166-1173. 1999
57. **Herdegen T**, Leah JD Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev 28*: 370–490. 1998
58. **Herrera DG** and Harold A.R. Activation of c-Fos in the rat brain. *Prog. Neurobiology*, 50, 83-107, 1996.
59. **Hill C.S**, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals mechanisms and specificity. *Cell*. 80, 199-211, 1995.
60. **Hoskin K L**, Bulmer DC, Lasalandra M. Fos expression in the midbrain peri-aqueductal grey after trigeminalvascular stimulation. *J Anat*; 198:29-35. 2001.
61. **Jacquin M**, Rhoades R, Enfiejian H.L, Egger M.D. Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study. *J.Comp.Neurol.* 218, 239-256, 1983a.
62. **Jacquin, M. F.**, Golden, J., and Rhoades, R. W. (1988b). Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interparalis: III. Local circuit neurons. *J. Comp. Neurol.* 282, 24–44.

63. **Kalia M**, Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* Nov 1;211:248-265. 1982
64. **Kerr, F. W. L.**, and Lysak, W. R. Somatotopic organization of trigeminal-ganglion neurones. *Arch. Neurol.* 11, 593–602.1964
65. **Khatri, V.**, Bermejo, R., Brumberg, J. C., Keller, A., and Zeigler, H. P. Whisking in air: encoding of kinematics by trigeminal ganglion neurons in awake rats. *J. Neurophysiol.* 101, 1836–1846. 2009
66. **Killackey, H. P.** Anatomical evidence for cortical subdivisions based on vertically discrete thalamic projections from the ventral posterior nucleus to cortical barrels in the rat. *Brain Res.* 51, 326–331. 1973
67. **Koo B.** EEG changes with vagus nerve stimulation. *J Clin Neurophysiol* ;18:434-441. 2001.
68. **Kosel M**, Schlaepfer TE. Beyond the treatment of epilepsy: new applications of vagus nerve stimulation in psychiatry. *CNS Spectr* Jul;8:515-521, 2003.
69. **Kovacs K.J**, Sawchenko P.E.. Glucocorticoid negative feedback is exerted selectively on vasopressin gene transcription in parvocellular neurosecretory neurons. *Soc. Neurosci. Abstr* 27, 1997.
70. **Kovacs K.J**, Sawchenko P.E.Sequence of stress induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience* 16. 262-273, 1996.
71. **Kovacs KJ** c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287,1998
72. **Krahl SE**, Clark KB, Smith DC, Browning RA. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* Jul;39:709-714. 1998

73. **Krahl SE**, Clark KB, Smith DC, Browning RA. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* Jul;39:709-714. 1998
74. **Krahl SE**, Senanayake SS, Handforth A. Seizure suppression by systemic epinephrine is mediated by the vagus nerve. *Epilepsy Res* Feb;38:171-175. 2000
75. **Kwan P**, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* Feb 3;342:314-319, 2000.
76. **Labar D**. Effects of Vagal Nerve Stimulation on Cognition and Quality of Life. To the Editor. *Epilepsy Behav* Apr;2:161-162. 2001
77. **Ledoux JE**, Ruggiero DA, Foster R, Stornetta R, Reis DJ. Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 264: 123–146, 1987.
78. **Lee, S.**, Carvell, G. E., and Simons, D. J. Motor modulation of afferent somatosensory circuits. *Nat. Neurosci.* 11, 1430–1438. 2008a
79. **Leiser, S. C.**, and Moxon, K. A. Responses of trigeminal ganglion neurons during natural whisking behaviors in the awake rat. *Neuron* 53, 117–133. 2007
80. **Lichtenstein, S. H.**, Carvell, G. E., and Simons, D. J. Responses of rat trigeminal ganglion neurons to movements of vibrissae in different directions. *Somatosens. Mot. Res.* 7, 47–65. 1990
81. **Lundgren J**, Amark P, Blennow G, et al. Vagus nerve stimulation in 16 children with refractory epilepsy. *Epilepsia*; 39:809–813. 1998
82. **Ma, P. M.** The barrelettes – architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J. Comp. Neurol.* 309, 161–199, 1991.

83. **Magdaleno-Madrigal VM**, Valdes-Cruz A, Martinez-Varga S d, Martinez A, Almazan S, Fernandez-Mas R, Fernandez Guardiola A. Effect of electrical stimulation of the nucleus of the solitary tract on the development of electrical amygdaloid kindling in the cat. *Epilepsia*, 43, 964-969, 2002.
84. **Magnes J**, Allweis C, Abeles M. The metabolism of the perfused cat brain during EEG synchronization and arousal. *J Neurochem* Sep;14:859-871. 1967.
85. **Marfurt C.F** and Rajchert D.M. Trigeminal primary afferent projections to “non trigeminal” areas of the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 303, 489-511, 1991.
86. **Murphy JV**. Pediatric VNS study group. Left vagal nerve stimulation in children with medically refractory epilepsy. *J Pediatr*; 134:563-6. 1999.
87. **Marrosu F**, Santoni F, Puligheddu M, et al. Increase in 20-50 Hz (gamma frequencies) power spectrum and synchronization after chronic vagal nerve stimulation. *Clin Neurophysiol* Sep;116:2026-2036, 2005.
88. **Marrosu F**, Serra A, Maleci A, Puligheddu M, Biggio G, Piga M. Correlation between GABA(A) receptor density and vagus nerve stimulation in individuals with drug-resistant partial epilepsy. *Epilepsy Res* Jun;55:59-70, 2003.
89. **Mascagni F**, McDonald AJ, Coleman JR. Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study. *Neuroscience* 57: 697–715, 1993.
90. **Matthews K.**, Eljamel M.S. Vagus nerve stimulation and refractory depression. *Br. J. Psychiatr.* 183: 181–183. 2003.
91. **McDonald AJ**. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Brain Res* 55: 257–332, 1998.

92. **McLachlan RS**. Suppression of interictal spikes and seizures by stimulation of the vagus nerve. *Epilepsia* Sep;34:918-923. 1993.
93. **Morgan J and Carrant T**, Stimulus-transcription coupling in the nervous system : involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu.Rev. neurosci.*14, 421-451, 1991.
94. **Morris GL**, Mueller WM. Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01 -E05. *Neurology*;53: 1731-5. 1999.
95. **Moruzzi G**, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*; 1 :455-73. 1949.
96. **Naritoku DK**, Terry WJ, Helfert RH. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* Sep;22:53-62. 1995.
97. **Naritoku DK**, Terry WJ, Helfert RH. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* Sep;22:53-62. 1995.
98. **Nestler EJ** Molecular expression on the mechanism induction and mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1): 24,2004.
99. **Nishimori T**, Buzzi MG, Chudler EH, Poletti CE, Moskowitz MA, Uhl GR Preproenkephalin upregulation in nucleus caudalis: high and low intensity afferent stimulation differentially modulate early and late responses. *J Comp Neurol* 302: 1002–1018. 1990.
100. **Osharina V**, Bagaev V, Wallois F, Larnicol N. Autonomic response and Fos expression in the NTS following intermittent vagal stimulation: Importance of pulse frequency. *Auton Neurosci: Basic Clin* 126–127: 72–80. 2006.

101. **Penneton W.M**, Klein B.G, Jacquin M.F. Trigeminal projection to Contralateral dorsal horn originate in midline hairy skin. *Somat. Motor. Res.* 8, 165-173.
102. **Petreanu, L**, Huber, D, Sobczyk, A, Svoboda, K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat. Neurosci.* 10, 663–668. 2007.
103. **Pierret, T.**, Lavallée, P., and Deschênes, M. Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J. Neurosci.* 20, 7455–7462. 2000
104. **Raedt R**, Clinckers R, Mollet L, et al. Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *J Neurochem* 1;117:461-9. 2001
105. **Revesz D**, Tjernstrom M, Ben-Menachem E, et al. Effects of vagus nerve stimulation on rat hippocampal progenitor proliferation. *Exp Neurol*; 21 259-65, 2008.
106. **Rice, F. L.**, Mance, A., and Munger, B. L. A comparative light microscopic analysis of the sensory innervation of the mystacial pad. I. Innervation of vibrissal follicle-sinus complexes. *J. Comp. Neurol.* 252, 154–174. 1986.
107. **Rojas DC**, Maharajh K, Teale P, Rogers SJ. Reduced neural synchronization of gamma-band MEG oscillations in first-degree relatives of children with autism. *BMC Psychiatry*;8:66. 2008
108. **Rutecki P**. Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia*;31 Suppl 2:S1-S6. 1990

109. **Rutecki P.** Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia*;31 Suppl 2:S1-S6. 1990
110. **Sagar S.M,** Sharp F.R, Curran T. Expression of c-fos protein in brain metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240,1328-1331, 1988
111. **Sasa M,** Ohno Y, Nabatame H, et al. Effects of L-threo-dops, an L-noradrenaline precursor, on locus coeruleus originating neurons in spinal trigeminal nucleus. *Brain Res*;420:157-61. 1987
112. **Sassone-Corsi P,** Visvader J, Ferland L, Mellon P, Verma I.M.. Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway characterization of a cAMP-responsive element. *Genes and Development* 2, 1529-1538, 1998.
113. **Schachter SC,** Saper CB. Vagus nerve stimulation. *Epilepsia* Jul;39:677-686, 1998.
114. **Senba E,** Ueyama T Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 29: 183–207. 1997
115. **Sheng M** and Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4, 477-485. 1990
116. **Sonnenberg J,** Mitchelmore C, Macgregor-Leon PF, Hempstead J, Morgan JI, and Curran T.. Glutamaterceptor agonist increase the expression of Fos, FRA, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J. neurosci. Res* 24, 72-80, 1989.
117. **Takaya M,** Terry WJ, Naritoku DK. Vagus nerve stimulation induces a sustained anticonvulsant effect. *Epilepsia* Nov;37:1111-1116. 1996

118. **Takayama K**, Suzuki T, Miura M The comparison of effects of various anesthetics on expression of Fos protein in the rat brain. *Neurosci Lett* 176: 59–62. 1994.
119. **Takemura M**, Shimada T, Sugiyo S, Nokubi T, Shigenaga Y. Mapping of c-Fos in the trigeminal sensory nucleus following high and low-intensity afferent stimulation in the rat. *Exp Brain Res* 130:113–123. 2000.
120. **Timofeeva, E.**, Dufresne, C., Sik, A., Zhang, Z. W., and Deschênes, M. Cholinergic modulation of vibrissal receptive fields in trigeminal nuclei. *J. Neurosci.* 25, 9135–9143. 2005.
121. **Todesco S.**, De Carli F., Melis F, Tolu E., Deriu F. Transcutaneous electrical stimulation of trigeminal nerve afferents desynchronizes intercritical EEG. *Acta Physiologica* 194 (665):118, 2008.
122. **Todesco S.**, De Carli F., Tolu E., Deriu F. Study of the effects induced by transcutaneous electrical stimulation on EEG activity of patients with drug resistant epilepsy. *Neurological Sciences* 29: S58, 2008.
123. **Treisman R.** The serum response element. *TIBS* 17, 423-426, 1992.
124. **Uthman BM**, Reichl AM, Dean JC, et al. Effectiveness of vagus nerve stimulation in epilepsy patients: a 12-year observation. *Neurology* Sep 28;63:1124-1126. 2004.
125. **Van Straaten**, F Muller, R Curran, T Van Beveren, C Verma; Complete nucleotide sequence of a human c-fos gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3183-3187, 1983.
126. **Veinante, P.**, Jacquin, M. F., and Deschênes, M. (2000a). Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 420, 233–243.

127. **Vonck K**, De H, V, Boon P. Vagal nerve stimulation--a 15-year survey of an established treatment modality in epilepsy surgery. *Adv Tech Stand Neurosurg* ;34:111-146, 1999
128. **Walker BR**, Easton A, Gale K. Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia* Aug;40:1051-1057, 1999.
129. **Weiss GK**, Lewis J, Jimenez-Rivera C, et al. Antikindling effects of locus coeruleus stimulation: mediation by ascending noradrenergic projections. *Exp Neurol*; 108: 13&40. 1990
130. **Williams, M. N.**, Zahm, D. S., and Jacquin, M. F. Differential foci and synaptic organization of the principal and spinal trigeminal projections to the thalamus in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 6, 429–453. 1994.
131. **Woodbury DM**, Woodbury JW. Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. *Epilepsia* 31(Suppl 2): S7–S19.1990
132. **Woolf CJ**, Wall PD. Chronic peripheral nerve section diminishes the primary afferent A-fibre mediated inhibition of rat dorsal horn neurones. *Brain Res* 242:77–85 1982
133. Yu, C., Derdikman, D., Haidarliu, S., and Ahissar, E. Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat. *PLoS Biol.* 4, e124. doi: 2006.
134. Zabara J. Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia* 1992 Nov; 33:1005-1012.
135. Zanchetti A, Wang SC, Moruzzi G. The effect of vagal afferent stimulation on the EEG pattern of the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* Aug;4:357-361. 1952.

136. Zhang X, Hannesson DK, Saucier DM, Wallace AE, Howland J, Corcoran ME. Susceptibility to kindling and neuronal connections of the anterior claustrum. *J Neurosci* 21:3674-3687, 2001.