



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA  
IN SCIENZE BIOMEDICHE

---

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

---

XXII CICLO

*Effetti indotti dalla stimolazione elettrica  
trigemiale transcutanea sull'attività EEG  
di soggetti sani e di pazienti con epilessia  
farmacoresistente*

Relatore:

Prof.ssa Franca Deriu

Tesi di dottorato di:

Dr.ssa Sara Todesco

Direttore :

Prof. Eusebio Tolu

Anno Accademico

2008 - 2009

## **INDICE**

SOMMARIO	3
INTRODUZIONE	7
Sistema trigeminale sensitivo	7
Risposte trigeminali nel sano	10
Epilessia Farmacoresistente	13
Stimolazione Vagale ed Epilessia	21
– <i>Bersagli anatomici</i>	22
– <i>Modulazione neurotrasmettitoriale</i>	23
– <i>Modulazione del flusso ematico cerebrale</i>	23
– <i>Modulazione dell'espressione dei fattori di crescita e recettoriale</i>	24
– <i>Modulazione dei ritmi EEG</i>	25
Stimolazione Trigeminal e Epilessia	27
OBIETTIVI	31
MATERIALI	32
METODI	33
Stimolazione trigeminale	33
Registrazione EEG	34
Analisi dei dati	34
Analisi topografica	35
Esperimenti di controllo	36
RISULTATI	37
Gruppo dei soggetti sani	37
Gruppo dei pazienti con EPFR	37
– <i>Stimolazione unilaterale</i>	37
– <i>Stimolazione bilaterale</i>	38
– <i>Analisi topografica</i>	39
– <i>Esperimenti di controllo</i>	40

DISCUSSIONE	41
Effetti EEG TNS- indotti nel sano	41
Effetti EEG TNS-indotti nel malato di EPFR	44
CONCLUSIONI	51
PROSPETTIVE FUTURE	53
RINGRAZIAMENTI	55
TABELLE	57
GRAFICI	82
BIBLIOGRAFIA	99

## Sommario

Si considera attualmente che le Epilessie Parziali (EP), legate o meno alla presenza di una lesione cerebrale, rappresentino circa il 60% di tutte le sindromi epilettiche, e che fra tutti i pazienti sofferenti di un'EP, circa il 30% sia Farmaco-Resistente (FR). Un 20% di questi è candidabile alla terapia chirurgica dell'epilessia mentre in un 10% circa, è praticabile la stimolazione nervosa vagale o VNS. E' questa l'unica tecnica di neuromodulazione superficiale al momento riconosciuta come terapia palliativa nell'epilessia FR. A fronte di una documentata efficacia (40% di riduzione delle crisi nel 30-40% dei pazienti), vari sono i limiti di questo trattamento, quali i costi del materiale da impiantare a dimora e l'impossibilità alla stimolazione bilaterale a discapito di un maggior effetto inibitorio, a causa degli effetti autonomici che ne conseguirebbero per via del controllo cardiaco e viscerale che il nervo esercita. Recenti studi clinici (De Giorgio, 2003, 2006, 2009) suggeriscono per la prima volta l'uso della stimolazione trigeminale (TNS) come terapia alternativa non farmacologica nei pazienti con EPFR, in particolare in sostituzione alla VNS, con cui si presume vi sia una condivisione di meccanismi di azione e di vie anatomiche, e rispetto alla quale la TNS vanterebbe minori costi, invasività, effetti collaterali e una possibile applicazione bilaterale. In questi studi di De Giorgio è riportato un dimezzamento della frequenza delle crisi al seguito di TNS eseguita cronicamente per un periodo variabile da uno a 12 mesi. Il meccanismo antiepilettico presunto è quello di un arousal indotto dall'attivazione della formazione reticolare ascendente. Studi su animale (Fanselow, 2000) con epilessia sperimentalmente indotta mostrano, infatti, che lo stimolo desincronizza la scarica critica con conseguente soppressione delle manifestazioni cliniche. Sinora non sono riportati in letteratura dati relativi agli effetti EEG della TNS nell'uomo,

né sul ritmo di fondo né sulle anomalie epilettiformi interctitiche o sull'attività critica. Sulla scorta di questi dati, nel nostro lavoro ci siamo proposti di indagare 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 di azione della stimolazione trigeminale a livello corticale e spiegare gli effetti clinici anticonvulsivanti della metodica a favore di una sua eventuale applicazione terapeutica. Nello specifico il nostro lavoro è stato mirato alla quantificazione di variazioni di frequenze EEG TNS-indotte, alla misurazione di differenze tra stimolazione bilaterale e unilaterale, alla valutazione della distribuzione spaziale degli effetti EEG della TNS sullo scalpo, e a definire la specificità della risposta ottenuta rispetto a quella di altri nervi superficiali periferici mediante confronto della TNS con la stimolazione del nervo mediano. Sono stati reclutati 5 soggetti sani e 10 pazienti affetti da EPFR, con anamnesi negativa per patologie cardiache e nevralgia trigeminale. Ciascun soggetto è stato sottoposto, in corso di registrazione EEG digitale, a stimolazione elettrica transcutanea non dolorosa della branca sopra o infraorbitaria del nervo trigemino, uni e bilateralmente in due separate sedute. È stata usata una stimolazione intermittente di 10 minuti costante di dieci blocchi di stimolo con time off di 30 sec. Le acquisizioni EEG sono state fatte sia in condizioni basali che in corso e dopo stimolazione. I tracciati sono stati quindi processati con analisi quantitativa nel dominio della frequenza mediante la trasformata veloce di Fourier, applicata a segmenti della durata di due secondi in cui sono state ripartite le 18 derivazioni bipolari considerate per ogni tracciato. Le epoche sono state suddivise nella condizione basale (pre-stimolo) e nel periodo post-stimolo costante di tre segmenti consecutivi di 10 secondi l'uno. Per ciascuna di queste quattro classi è stato valutato lo spettro per ogni derivazione, di ogni

tracciato. Sono stati quindi calcolati i seguenti parametri spettrali: potenza assoluta delle bande delta, teta, alfa e beta e frequenza media. Per analizzare statisticamente l'effetto della stimolazione è stata applicata l'analisi di varianza per misure ripetute. La spaziatura della risposta sullo scalpo è stata fatta con mappe topografiche spettrali della potenza assoluta/relativa delle singole bande e della frequenza media. I risultati preliminari dello studio mostrano nei pazienti, nell'immediato post-stimolo, una riduzione della potenza dello spettro medio nella zona delle basse frequenze e un rinforzo del ritmo di fondo, in particolare un incremento ( $p < 0.01$ ) della frequenza media e delle attività più rapide ( $p < 0.05$ ) e una riduzione ( $p < 0.01$ ) della potenza della banda teta. Nei sani si è registrato un incremento significativo parallelo del beta e della frequenza media senza tuttavia variazioni a carico del teta. In entrambi i gruppi la stimolazione bilaterale ha ulteriormente aumentato le significatività trovate. Una prima analisi della distribuzione spaziale della risposta ha mostrato sia nel sano che nel malato una localizzazione dei cambiamenti EEG sulle regioni anteriori. Nel sano l'aumento del beta e della frequenza media si localizzava in sede frontale. Nel malato sia la riduzione del teta che l'aumento della frequenza media si distribuiva sulle derivazioni fronto-temporali, seguendo l'andamento regionale dei focus epilettogeni ( $p < 0.005$ ). Le mappe topografiche spettrali hanno esaltato queste significative interazioni tra stadio e regione sia per la frequenza media ( $p < 0.0002$ ) che per la banda teta ( $p < 0.0001$ ).

In conclusione, sulla base di questi risultati, possiamo affermare che la TNS in acuto è capace di desincronizzare la traccia EEG sia nel sano che nel malato, e questo potrebbe essere il meccanismo di azione alla base dei documentati benefici clinici della metodica. L'analogia di questi effetti EEG con quelli ottenuti con la stimolazione vagale fa pensare a

una condivisione di meccanismi di azione tra le due tecniche di neurostimolazione e a una loro possibile futura caodiuvazione.

La maggior efficacia della stimolazione bilaterale conferma nell'uomo il dato segnalato nell'animale e promette un vantaggio rispetto alla VNS che si presta alla sola applicazione unilaterale. La prevalenza della risposta sulle regioni anteriori in co-locazione con i focolai epilettogeni del nostro campione è verosimilmente indice di una partecipazione selettiva di alcune aree ma non esclude un azione antagonista specifica della TNS con l'attività epilettogena. Possiamo quindi dire che per quanto preliminari i nostri risultati rinforzano l'uso della TNS come terapia alternativa nell'epilessia FR sia in sostituzione che in eventuale combinazione con la VNS.

# Introduzione

## Sistema trigeminale sensitivo

Il sistema trigeminale sensitivo è rappresentato dalle tre branche (I branca oftalmica, II branca mascellare e III branca mandibolare) del V paio dei nervi cranici, e da un gruppo di nuclei sensitivi, il nucleo principale e il nucleo spinale trigeminale. Per mezzo di essi provvede all'innervazione sensitiva della cute della faccia, della congiuntiva, del globo oculare inclusa la cornea, delle meningi della fossa cranica anteriore e media, del tentorio del cervelletto, delle pareti dei vasi del poligono di Willis, della mucosa buccale, dei due terzi anteriori della lingua, della mucosa dei seni frontali e mascellari, dei denti e della mucosa nasale. Di questi tre rami, il ramo oftalmico e mandibolare sono nervi sensitivi puri, mentre il ramo mandibolare contiene sia fibre sensitive che fibre motrici. I corpi cellulari della maggior parte delle fibre sensitive si localizzano nel ganglio semilunare del Gasser. Fanno eccezione i neuroni propriocettivi che si trovano nel nucleo mesencefalico del V. Il complesso nucleare sensitivo del trigemino è formato da tre nuclei costituenti la colonna afferente somatica generale, che si estende dalla parte rostrale del midollo spinale fino al mesencefalo: 1) nucleo spinale del trigemino, 2) nucleo sensitivo principale, 3) nucleo mesencefalico o Me5. I rami centrali delle fibre dei neuroni sensitivi primari localizzati nel ganglio di Gasser penetrano nel tronco dell'encefalo a livello del ponte e molte di esse si biforcano in rami ascendenti e discendenti, che proiettano a regioni circoscritte del nucleo sensitivo principale e del nucleo spinale del V.

Al nucleo principale del trigemino giungono le fibre afferenti che mediano la sensibilità tattile della faccia. Tali fibre si dividono in un ramo più breve, a decorso ascendente, che



raggiunge il nucleo sensitivo principale ipsilaterale ed un ramo discendente, più lungo, che decorre nel tratto spinale del trigemino e termina nel nucleo spinale ipsilaterale.

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 dorso mediale del nucleo sensitivo principale danno origine ad un piccolo tratto che termina a livello del nucleo ventrale posteriore ipsilaterale del talamo.

Rostralmente il nucleo spinale è contiguo con il nucleo sensitivo principale mentre, in direzione caudale, si estende attraverso il bulbo fino al segmento C2 del midollo spinale. Al nucleo spinale pervengono le fibre afferenti che mediano la sensibilità dolorifica e termica. Tali fibre decorrono nel tratto spinale del trigemino e terminano nel nucleo omonimo. Le fibre trigeminali che discendono nel tratto spinale sono organizzate in maniera somatotopica: le fibre della divisione oftalmica si trovano in posizione ventrolaterale; le fibre della divisione mandibolare sono disposte dorso lateralmente e quelle della divisione mascellare si trovano tra le prime due. Nel tratto spinale del trigemino si distingue dunque una rappresentazione invertita della metà ipsilaterale della faccia. Il nucleo spinale, in direzione rostro-caudale, si suddivide morfologicamente in tre sub-nuclei: 1) il nucleo caudale, posto più caudalmente ed in continuità con il corno dorsale del midollo spinale cervicale; 2) il nucleo interpolare; 3) il nucleo orale, che si estende fino al nucleo sensitivo principale. Mentre il sub-nucleo caudale svolge un ruolo essenziale nel meccanismo di ritrasmissione della sensibilità cosciente termica e dolorifica, i due sub-nuclei orale ed interpolare possono essere considerati prevalentemente un

aggregato di interneuroni intercalati tra le fibre afferenti primarie e i nuclei motori del trigemino e di altri nervi cranici.

Una parte dei neuroni del nucleo spinale proietta al nucleo ventrale postero-mediale e ai nuclei intralaminari del talamo. Gli assoni di questi neuroni emettono collaterali che raggiungono anche la formazione reticolare. La maggior parte degli assoni che ascendono verso il talamo si decussano ed entrano a far parte del sistema anterolaterale controlaterale, che media le sensazioni somatiche dolorifiche e termiche. Un piccolo numero di fibre ascende nel sistema anterolaterale ipsilaterale.

Il nucleo mesencefalico del trigemino (Me5) si estende dal margine rostrale del nucleo sensitivo principale al collicolo superiore del mesencefalo. 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.

## **Risposte trigeminali nel sano**

Gli studi condotti sinora sull'attività EEG dopo stimolazione trigeminale nel sano sono per lo più mirati alla conoscenza della fisiopatologia del dolore trigeminale e consistono nella registrazione delle risposte corticali evocate dall'applicazione di stimoli esteroceettivi standardizzati (Chudler e Dong, 1983, Kimura et al, 1994). In particolare la via nocicettiva trigeminale è stata studiata mediante i potenziali evocati laser LEP (Romaniello, 2003 Cruccu et al. 2001; Ploner et al. 2002; Iannetti et al. 2003) che constano per le fibre a delta di un complesso N2-P2, con massima ampiezza al vertice e di una componente precoce N1. I LEP correlati con le fibre C a causa della differenza minima di latenza e dell'alta interferenza, sono mascherati dai delta LEP. Per via dell'alta densità recettoriale e della corta distanza di conduzione i LEP sono a bassa soglia e ad alta ampiezza. I LEP trigeminali sono sensibilmente alterati in diverse patologie (Romaniello, 2003; Truini et al 2004): nei pazienti con neuropatia diabetica hanno una più lunga latenza e una minore ampiezza, nei pazienti con nevralgia postherpetica, sclerosi multipla, tumori dell'angolo ponto-cerebellare sono sempre anormali; in caso di disfunzione temporo-mandibolare presentano un'ampiezza notevolmente ridotta; nei soggetti con emicrania la latenza è normale ma la soglia è ridotta, probabilmente a causa del deficit inibitorio centrale sui circuiti trigeminali.

La soglia percettiva e dolorifica è individuale e a seconda della regione stimolata cambia la popolazione recettoriale e la sensibilità (Romaniello et al, 2003; Agostino et al, 2000), come anche osservato in uno studio di Svensson (1998) in cui stimolazioni dolorose sulla regione periorale generano un accorciamento della latenza e della durata del periodo silente nei muscoli masticatori con un cambiamento della risposta a seconda che si stimoli il

labbro superiore o inferiore e che ci si sposti quindi dal territorio del mandibolare a quello del mascellare.

Anche i parametri di stimolazione sembrano incidere sulla latenza e sull'ampiezza dei LEP, ossia uno stimolo di più breve durata correla con una latenza più corta di N1 e N2, e determina un'incremento di ampiezza di N1.

Un'analisi (Tarkka, 1993) delle sorgenti neurali dei potenziali evocati laser mostra che la componente più precoce N1 viene generata dall'attività corticale controlaterale su entrambe le corteccie somatosensitive primaria e secondaria, in particolare dalla corteccia opercolo-insulare e si lateralizza sulla scissura perisilviana. La componente tardiva N2 originerebbe dall'attività bilaterale della corteccia somatosensitiva secondaria mentre l'onda positiva P2 dovrebbe essere prodotta dalle strutture profonde della linea mediana, più precisamente dall'area cingolata anteriore. N1 viene letta sulle regioni temporali di entrambe gli emisferi con ampiezza maggiore e latenza più corta sull'emisfero controlaterale a quello di stimolazione mentre il complesso negativo-positivo N2-P2 viene letto al vertice Fz-Cz-Pz, sulla linea mediana quindi.

L'organizzazione corticale del sistema trigeminale somatosensitivo è stato studiato nell'uomo con diverse tecniche quali la stimolazione corticale diretta (Penfield and Jasper, 1954), la magnetoencefalografia (MEG) (Karhu et al., 1991; Mogilner et al., 1994; Nakamura et al., 1998; Maeda et al., 1999; Suzuki et al., 2002), la tomografia ad emissione di positroni (PET) (Fox et al., 1987; Bittar et al., 1999), e la risonanza magnetica funzionale (fMRI) (Servos et al., 1999; Stippich et al., 1999; Vincent et al., 2001). Iannetti (2003) riporta dopo stimolazione tattile del territorio della prima e terza divisione trigeminale l'attivazione biemisferica della corteccia somatosensitiva primaria e secondaria

per stimoli lateralizzati della branca oftalmica, mentre la stimolazione della metà inferiore del viso e quindi della branca mandibolare evoca risposte corticali solo controlaterali.

In una recente indagine condotta in pazienti con nevralgia trigeminale, è stato osservato che la carbamazepina (CBZ), cioè un antiepilettico usato come farmaco di prima scelta per lenire il dolore parossistico della nevralgia trigeminale, produce una depressione dei LEP, con una correlazione altamente significativa tra dosaggio di CBZ e latenza dei LEP (Cruccu et al. 2001). L'efficacia della CBZ nel controllo della nevralgia trigeminale è generalmente attribuito alla sua azione di blocco voltaggio-dipendente dei canali sodio a livello della membrana di fibre nervose trigeminali ipereccitabili che danno luogo ad attività ectopica (Cruccu et al. 1990, 2001; Fromm and Sessle 1991); tuttavia, questo meccanismo non giustifica l'inibizione dei LEP. E' stato pertanto proposto che l'effetto potesse essere diretta conseguenza dell'azione inibitoria di CBZ sui recettori colinergici di tipo nicotinico nella stessa corteccia del giro del cingolo (Bertrand et al. 1998; Picard et al. 1999), cioè del generatore dei potenziali evocati laser e del dolore percepito.

## **Epilessia Farmacoresistente**

Si considera attualmente che il 30% dei pazienti affetti da epilessia sia farmacoresistente FR. Le forme farmacoresistenti sono lesionali in un 60% dei casi e in un 40% sono inquadrabili come idiopatiche o criptogenetiche (senza causa identificabile). Le Epilessie Parziali (EP) (legate o meno alla presenza di una lesione cerebrale) rappresentano circa il 60% di tutte le sindromi epilettiche, e fra tutti i pazienti sofferenti di un'EP, circa il 25% (12-40% a seconda delle casistiche) è Farmaco-Resistente. Nella maggior parte dei pazienti con epilessia refrattaria al trattamento farmacologico, le crisi sono resistenti non solo ad uno ma a più farmaci antiepilettici AED (Perucca, 2001; Walker et Sander, 1996). Tuttavia affinché si possa parlare di FR, la presenza di crisi nonostante la terapia con AED non appare un criterio sufficiente. Occorre infatti escludere la presenza di una falsa FR determinata da: errori diagnostici con conseguente terapia non adatta, presenza di pseudocrisi, errori terapeutici per cui l'AED è corretto per il tipo di crisi ma viene somministrato in maniera inadeguata (livelli sub-ottimali, frequenza di somministrazione inappropriata), e scarsa *compliance* del paziente. La definizione di FR appare "elusiva" (Regesta et al, 1999). Secondo Hauser (1992) tutte le epilessie sarebbero, in teoria, da considerare resistenti alla terapia poiché l'azione degli AED è solo palliativa ed influente sulla patobiologia causale. Cascino (1990) ha proposto una definizione più operativa sul piano clinico, indicando quale indice di FR la persistenza di crisi negli anni nonostante mono- o politerapia appropriata ed alla massima dose tollerabile. Schachter (1993) infine associa il concetto di FR a quello di qualità di vita: il soggetto con FR è quello incapace di condurre uno stile di vita adeguato alle proprie capacità a causa della persistenza delle crisi oppure degli effetti collaterali degli AED e dei problemi psico-sociali. Numerosi sono gli

interrogativi non del tutto risolti relativamente alla FR (Regesta et al, 1999). Ci si chiede infatti quanti AED debbano essere usati prima di considerare un'epilessia farmacoresistente. Una risposta è fornita dal “*grading system*” di Perucca (1998), in base al quale la probabilità di ottenere libertà dalle crisi è del 30% dopo il fallimento del primo AED, si riduce al 10–15% dopo il fallimento di due AED (in successione o combinazione) ed al 5% dopo il fallimento di tre AED (in successione o combinazione). Secondo Kwan e Brodie (2000) il fallimento della prima monoterapia è già da considerarsi indice di cattiva prognosi, specie se esso è dovuto ad inefficacia dell'AED (solo 11% di probabilità di ottenere il controllo delle crisi con un secondo AED). Se invece il fallimento è dovuto a scarsa tollerabilità, la probabilità di successo con un secondo AED sale al 50%. Ci si chiede poi se la recidiva di crisi dopo anni di remissione possa essere predittiva di FR.

Secondo Goodridge e Shorvon (1983) tale ricomparsa si verifica in circa il 10% dei soggetti. La revisione della letteratura indica che tale fenomeno rientra in uno dei tre possibili *pattern* della FR (Schmidt D e Löscher W, 2005). Il primo *pattern* è quello delle FR *ab initio*. Il secondo è quello dello sviluppo tardivo di FR dopo un periodo iniziale di controllo. Il terzo *pattern*, infine, è quello di tipo intermittente nel quale a fasi di remissione seguono fasi di scarso controllo. Circa la frequenza delle crisi, secondo Camfield e Camfield (1996) sono resistenti i pazienti che presentano almeno 1 crisi/2 mesi nei primi 5 anni di terapia.

La revisione di studi prospettici a lungo termine (Sander JW, 1993) indica quali fattori predittivi di FR, oltre alla risposta al primo trattamento, l'età precoce di insorgenza dell'epilessia, la prolungata durata dell'epilessia attiva prima dell'inizio del trattamento, l'elevata frequenza delle crisi e la presenza di danno cerebrale (epilessie sintomatiche). In

particolare, alto rischio di FR è legato alla presenza di displasia corticale, di sclerosi ippocampale associata (*dual pathology*) o meno a patologie extra-ippocampali, di tumori cerebrali (gangliogliomi, tumori disembrionoplastici), di facomatosi (Sturge-Weber, sclerosi tuberosa).

Il processo di epilettogenesi e di refrattarietà alla terapia sono quindi eventi complessi che probabilmente sono mediati da fattori diversi nelle diverse condizioni clinico patologiche. Anche se alcune evidenze suggeriscono che la farmacoresistenza possa essere associata ad un fattore congenito (Zimprich et al., 2004), la maggiore parte degli studi propongono che essa sia un fenomeno acquisito, secondario al processo patologico di epilettogenesi (Pitkanen et al, 2002).

L'ipotesi più probabile è che il fenomeno della resistenza alla terapia farmacologica sia dovuto a più fattori biologici convergenti e sinergici, largamente sconosciuti, che determinano una condizione di ipereccitabilità non controllabile (Elger, 2003). Le forme di epilessia refrattarie alla terapia più frequenti e più studiate sono le epilessie parziali del lobo temporale e le epilessie associate ad alterazioni della maturazione corticale. Circa il 20% dei pazienti con epilessia farmacoresistente sono candidabili in base a criteri clinici, anatomici ed elettrofisiologici ad una terapia chirurgica dell'epilessia. La rimozione della regione epilettogena nelle epilessie del lobo temporale e in quelle secondarie a displasie corticali è nella maggior parte dei casi risolutiva e determina una remissione completa delle crisi (Engel, 1994; Tassi et al, 2002). Il tessuto cerebrale umano asportato durante la chirurgia dell'epilessia è stato ampiamente utilizzato per studi sperimentali mirati ad analizzare le caratteristiche neuropatologiche e di eccitabilità della regione epilettogena e per esaminare i meccanismi di FR (Elger, 2003, Avoli et al, 1996).



Nell'epilessia del lobo temporale associata a sclerosi ippocampale (Engel, 1996), e nei relativi modelli animali sperimentali (Loscher, 2002) indotti da stimolazione ripetitiva (modello del *kindling*) o dall'induzione di uno stato di male convulsivo (modello della pilocarpina e dell'acido cainico), si evidenziano peculiari alterazioni strutturali della regione paraippocampale, caratterizzate da depauperamento neuronale a carico della corteccia entorinale e della regione CA1/CA3 dell'ippocampo; dispersione neuronale del giro dentato; alterazione e riorganizzazione sinaptica del giro dentato; gliosi diffusa dell'ippocampo (Falconer, 1964; Blumcke et al, 2002). L'insieme di queste alterazioni determinerebbe una condizione di ipereccitabilità patologica che non è controllabile dalla terapia farmacologica. In questo caso la farmacoresistenza non sembrerebbe essere dovuta ad un solo fattore, ma alla coesistenza di alterazioni strutturali a carico dei neuroni, della glia e probabilmente dei vasi cerebrali, che contribuirebbero in modo sinergico alla progressione del danno epilettogeno ed allo sviluppo di una refrattarietà alla terapia convenzionale (Pitkanen et al, 2002). La cooperazione tra alterazioni e riorganizzazioni circuitali ed anomalie di vascolarizzazione potrebbero contribuire a determinare una condizione complessa di ipereccitabilità anche nelle displasie corticali (Palmini et al, 2004), come dimostrato da studi effettuati su campioni di tessuto umano ed in modelli sperimentali animali (Copp et al, 1999; Russo et al, 2003).

In queste due condizioni patologiche, quindi, appare difficile ricondurre il fenomeno della FR ad un solo meccanismo causale biologico. Nonostante queste premesse, è stato postulato in anni recenti che la FR nell'epilessia del lobo temporale con sclerosi ippocampale e nelle displasie corticali possa essere dovuta ad un aumento dell'espressione di alcune proteine di membrana responsabili dell'eliminazione dei farmaci (Kwan e

Brodie, 2005; Loscher, 2002). Gli studi sperimentali sono stati focalizzati sul ruolo della P-glicoproteina e delle proteine codificate dai geni *multidrug-resistance* (MDR), responsabili della resistenza alla terapia farmacologica antitumorale (Petraccia et al., 2003). Queste proteine sono espresse sulla superficie luminale dell'endotelio cerebrale e sono deputate all'estruzione dei farmaci dal parenchima cerebrale verso il torrente circolatorio in seguito al loro ingresso nell'interstizio cerebrale per diffusione (Kwan,2005; Abbott, 2002; Potschka et al. 2001; Sisodiya et al, 2002). Se la loro funzione/espressione fosse aumentata nel tessuto epilettico, l'eliminazione dei farmaci antiepilettici sarebbe aumentata e, di conseguenza, la loro concentrazione intracerebrale verrebbe ridotta nella regione epilettogena, rendendone inefficace l'effetto. La P-glicoproteina e le proteine MDR sono responsabili del trasporto dal parenchima cerebrale al sangue della maggior parte degli AED classici e di nuova generazione (Elger, 2003). Diversi studi hanno dimostrato un aumento di espressione delle proteine MDR (MDR1 e MDR7) nelle cellule endoteliali di tessuto cerebrale epilettogeno ottenuto da pazienti con epilessia farmacoresistente (epilessia del lobo temporale, displasie corticali (Sisodiya, 2002) e tumori benigni disembrionogenetici Aronica, 2003) e da modelli sperimentali di epilessia temporale (Loscher, 2002; Potschka, 2001). È stato inoltre dimostrato che l'induzione di una singola crisi epilettica è in grado di determinare un aumento transitorio di espressione delle proteine MDR (Rizzi et al, 2002) in animali trattati acutamente con sostanze epilettogene, mentre il trattamento cronico con farmaci antiepilettici ne aumenterebbe l'espressione endoteliale. Questi risultati dimostrerebbero che i farmaci antiepilettici vengono eliminati in modo estremamente (eccessivamente) efficiente dal tessuto epilettogeno. Questo meccanismo potrebbe impedire il loro accumulo nel tessuto cerebrale interessato

dall'attività epilettogena e quindi potrebbe sostenere un meccanismo di FR. L'ipotesi potrà essere testata definitivamente valutando la possibilità di rendere farmacosensibili animali affetti da un'epilessia cronica FR, mediante il trattamento prolungato con sostanze inibitrici della funzione delle proteine MDR. Un'altra condizione mediante la quale l'azione degli AED potrebbe essere ridotta si verificherebbe se il sito specifico d'azione dell'effetto dei farmaci fosse alterato nel tessuto cerebrale epilettico. Questa ipotesi è stata verificata. È noto che la densità e l'espressione di molecole della membrana neuronale, come i canali ionici ed i recettori per diversi neurotrasmettitori, è modificata dal processo di epilettogenesi (Avanzini et al, 2003;. Kohling, 2002). In alcuni casi è stata dimostrata nel tessuto epilettico un'alterata funzione di queste strutture di membrana. In particolare, i canali ionici del sodio voltaggio dipendenti, responsabili della generazione del potenziale d'azione e di fenomeni di depolarizzazione persistente, svolgono un ruolo centrale nella generazione dell'attività epilettica parossistica e sono numericamente e funzionalmente alterati nel tessuto epilettico (Kohling, 2002; Ragsdale et Avoli, 1998). A confermare il ruolo rilevante dei canali del sodio nell'epilettogenesi, recentemente sono state identificate più forme di epilessia idiopatica umana e di epilessia sperimentale murina associate a mutazioni a carico di diverse subunità del canale del sodio (Yamakawa, 2005). In una recente serie di studi è stato proposto che il canale del sodio viene funzionalmente alterato durante il processo di epilettogenesi sperimentale e nelle epilessie del lobo temporale umane (tessuto cerebrale post-operatorio). Questa modifica funzionale determina la perdita di uno dei meccanismi che mediano l'azione degli AED, e quindi impedisce a questi farmaci di svolgere il loro ruolo di contenimento della scarica neuronale epilettica (Remy et al, 2003-2003). La perdita di sensibilità agli AED, da parte dei canali del sodio alterati,

potrebbe costituire un nuovo meccanismo responsabile della farmacoresistenza in una condizione epilettica cronica.

Anche i recettori GABAA costituiscono un importante bersaglio dell'azione di molti AED (Jones et al, 2002). Numerosi dati ottenuti nell'uomo ed in modelli sperimentali indicano che il ripetersi delle crisi si accompagna a progressive modificazioni plastiche del recettore GABAA con conseguente riduzione della sensibilità ad alcuni AED GABAergici. Tale meccanismo potrebbe contribuire alla comparsa di FR tardiva. Riduzione del numero dei recettori GABAA e modificazioni circuitali GABAergiche potrebbero, invece, spiegare la FR *ab initio* in soggetti con displasie corticali.

Nonostante i progressi sopra descritti, la comprensione dei meccanismi biologici che determinano farmacoresistenza nelle epilessie è ancora superficiale ed incerta. È in corso una revisione dei criteri per definire i modelli sperimentali utilizzati per lo studio della resistenza ai farmaci, che renda più efficace le strategie sperimentali di ricerca.

Quest'analisi ha evidenziato la necessità di un approccio sperimentale che tenga conto del fatto che il fenomeno della farmacoresistenza, come il processo stesso di epilettogenesi, non può essere ricondotto ad un solo meccanismo, ma deve essere affrontato cercando di analizzare l'insieme di alterazioni che avvengono simultaneamente e sinergicamente nel tessuto epilettico (Dudek et al., 2002).

Concludendo possiamo dire che lo studio della FR ha un enorme interesse non solo sul piano clinico ma anche su quello dei meccanismi di base dell'epilettogenesi e dell'azione degli AED. Emerge il ruolo rilevante della farmacogenomica (Gatti e Perucca, 2002) al fine di individuare nel singolo paziente i fattori predittivi di resistenza agli AED e la

conseguente strategia terapeutica ottimale. La speranza è quella di riuscire a progettare il trattamento mirato ottimale capace di contrastare la FR o addirittura di prevenirla. Possono essere presi in considerazione, ad es., l'uso di AED che non siano substrato di trasportatori oppure la sintesi di nuovi AED capaci di agire specificamente sui bersagli (canali ionici e recettori), modificati per via acquisita o genetica, o sui trasportatori sovraespressi (vedi Mutani, 2006 ed M.de Curtis, 2005).

## **Stimolazione Vagale ed Epilessia**

La stimolazione vagale (VNS) è un trattamento terapeutico alternativo non farmacologico nei pazienti con epilessia farmaco-resistente, applicato da circa 10 anni dietro approvazione dal 1997 della FDA. 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; Ben-Menachem et al., 1999; Boon et al., 1999; Camfield and Camfield, 1999; Fisher and Handforth, 1999; Vonck et al., 1999; George et al., 2000; Ben-Menachem, 2001; Boon et al., 2001).

Più recentemente n'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).

Il sistema di stimolazione vagale (Cyberonics Inc, Houston, TX, USA) è composto da un elettrocatteter, posizionato nella porzione inferiore del nervo vago di sinistra, in quanto il destro innerva il nodo seno atriale, connesso ad un generatore d'impulsi (pace-maker) posto al di sotto della clavicola. La stimolazione è permanente e ciclica. Il sistema si attiva ogni 5 minuti per 30 secondi con parametri di stimolazione variabili, settati su una durata di impulso di 250-500 microsecondi, una frequenza di 20-30 Hz, un'intensità di 1-2.5 mA. Gli effetti avversi quali dispnea, raucedine, disfagia, non sono mai tali da sospendere il trattamento e son ben tollerati e intensità dipendenti. Dopo 12 mesi di trattamento si registra una riduzione 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).

### ***Bersagli anatomici***

Risultati sperimentali hanno dimostrato che la VNS può ridurre gli attacchi epilettici inducendo una modificazione dei ritmi del cervello seguendo la via del tratto del nucleo 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). Considerando l'estesa diffusione delle connessioni del NTS ( Saper, 1995), la VNS media effetti elettrici e neurochimici attraverso molteplici meccanismi Il NTS proietta infatti al nucleo parabrachiale responsabile della modulazione del respiro, al grigio periacqueduttale che modula il dolore, al cervelletto con azione di coordinazione motoria e antiepilettica, all'ipotalamo, al nucleo accumbens, all'amigdala, al talamo (Saper, 1995), al locus coeruleus (LC) (Krahl et al, 1998; Van Bockstaele, 1999;) che è la principale sorgente di proiezioni noradrenergiche e al nucleo dorsale del rafe (DRN) (Dorr et Debonnel 2006; Baraban, 1980;) da cui proiettano le fibre serotonergiche. I dati sperimentali disponibili suggeriscono 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). Si pensa che le proiezioni noradrenergiche e serotonergiche possano mediare l'effetto anticonvulsivo della VNS attraverso la modulazione del sincronismo dei neuroni del relay talamo-corticale (Dorr et Debonell, 2006).

### ***Modulazione neurotrasmettitoriale***

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). E' 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). Tuttavia la miscellanea di neurotrasmettitori e neuromodulatori del liquor, metabolizzati nell'intero cervello, non consente di localizzarne le variazioni in aree di potenziale interesse per la VNS e di poter discernere tra l'effetto della stimolazione vagale e quello dei farmaci AED o l'avvento delle crisi, sebbene sperimentalmente le variazioni in acuto possano avere un significato più specifico (Carpenter et al, 2004). Studi di neurochimica hanno invece evidenziato un incremento di norepinefrina nella corteccia prefrontale dopo VNS acuta (Follesa et al, 1997).

### ***Modulazione del flusso ematico cerebrale***

Diverse sono le aree attivate dalla VNS come documentato da studi di neuroimaging: studi SPECT (Van Laere et al, 2000; 2002, Barnes et al, 2003) hanno mostrato che la VNS causa un aumento del flusso ematico cerebrale a livello del talamo, dell'insula anteriore, del lobulo parietale inferiore e del giro frontale inferiore ed orbito-frontale; studi PET (Henry et al, 1998, 1999; 2004) hanno marcato un aumento del flusso nell'ipotalamo, nel talamo, nel bulbo dorso-centrale-rostrale ed una riduzione nell'ippocampo, nell'amigdala e nel giro cingolato posteriore; studi fMRI (Narayanan et al., 2002; Sucholeiki et al, 2002; Bohning et al 2001) un aumento nel lobo temporale, nell'ippocampo, nell'amigdala, nella corteccia



orbito-frontale bilaterale e parieto-occipitale e nell'area del cingolo. La VNS acuta è responsabile di un incremento iniziale del flusso regionale cerebrale (Henry 99, 2004) che sembrerebbe una spia della precoce espressione del gene cfos e attivazione neurochimica della sintesi di neurotrofine che poi nel tempo causerebbero l'aumento della densità recettoriale GABA A (Marrosu et al, 2003)

### ***Modulazione dell'espressione dei fattori di crescita e recettoriale***

La VNS acuta aumenta l'espressione di neurotrofine ossia di fattori di crescita quali il fattore neurotrofico prodotto dal cervello (BDNF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) e riduce la trascrizione del fattore di crescita del nervo (NGF), a livello dell'ippocampo e della corteccia del cervello di ratto (Follesa P et al, 2007;). La VNS cronica invece induce l'immunoreattività regionale del gene fos che è un marker di alta attività neuronale, associato a vari sistemi recettoriali, implicato nella trascrizione del BDNF (Hayes et al., 1997). L'aumento del fos è stato quantificato in: amigdala, abenuola del talamo, cingolo, corteccia occipitale, ippotalamo ventromediale, nucleo cocleare, nucleo solitario, nucleo motore dorsale del vago, locus coeruleus e in minima parte anche nel nucleo paratrigeminale (Naritoku DK, 1995). Il BDNF a sua volta aumenta l'up-regulation e la densità del recettore GABA A e quindi l'inibizione gabaergica neuronale che potrebbe essere alla base del meccanismo anticonvulsivo della VNS (Marrosu et al, 2003). 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).

## ***Modulazione dei ritmi EEG***

Diversi studi sono stati condotti per determinare l'impatto della VNS sull'EEG, sia su animali che sull'uomo, così da scoprirne i possibili meccanismi. 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., 1966) mentre una stimolazione a bassa intensità e frequenza indurrebbe una sincronizzazione (Bailey and Bremer,1938; Magnes et al.,1961; Rojas et al., 1964) 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.

Contrastanti sono i dati riportati sugli effetti indotti dalla VNS acuta sull'EEG nell'uomo, per alcuni non significativi (Hammond et al.,1992; Salinsky and Burchiel, 1993), per altri sì ( Kuba et al., 2002). La diversità delle frequenze di stimolazione e dell'accuratezza della metodologia utilizzata nell'analisi delle tracce EEG può rendere ragione della diversità dei risultati. Nello studio di Kuba (2002) in particolare si è osservata una riduzione significativa delle anomalie epilettiformi intercritiche, indipendentemente dal tipo di epilessia temporale o extratemporale, focale o generalizzata, o dall'eziologia, criptogenetica o sintomatica/lesionale, senza tuttavia modificazioni a carico del ritmo di fondo.

Anche nell'uomo come nell'animale è importante la frequenza di stimolazione.

A tal proposito, interessante è il case report di Olejniczak, (2001), relativo a un paziente farmacoresistente con epilessia temporale, sottoposto a valutazione prechirurgica con elettrodi intraippocampali, portatore di stimolatore vagale, il cui EEG mostrava per stimolazioni ad alta frequenza (30Hz), una riduzione delle anomalie intercritiche, e al contrario, per stimolazioni a bassa frequenza (5 Hz), un aumento della loro occorrenza, verosimilmente secondario a una sincronizzazione del tracciato.

## **Stimolazione Trigemiale ed Epilessia**

Il primo studio sulla Stimolazione Nervosa Trigemiale (TNS) è stato condotto da Fanselow (2000) su ratti con crisi indotte con iniezione intraperitoneale di pentilenetetrazolo, nei quali la stimolazione elettrica periodica unilaterale del nervo infraorbitario, con stimoli di alta frequenza (100-333 Hz), è risultata efficace nella riduzione della frequenza e durata delle burst di attività critica, registrata a livello talamico e corticale. L'effetto desincronizzante ottenuto è stato imputato a un arousal diffuso corticale secondario all'attivazione della formazione reticolare ascendente da parte di nuclei del tronco encefalico quali il locus coeruleus LC e il nucleo del rafe NR su cui il nervo trigemino proietta attraverso la via del nucleo del tratto solitario NTS. La condivisione degli effetti eegrafici e delle strutture anatomiche con la stimolazione vagale ha suggerito dei meccanismi di azione in comune, al momento non ancora indagati. Fanselow ha inoltre dimostrato come la stimolazione bilaterale della stessa branca possa potenziare la risposta corticale consentendo tra l'altro di ridurre l'apporto di corrente per ciascun sito di applicazione minimizzando così il rischio di danno strutturale del nervo. Questa scoperta aggiungerebbe un vantaggio rispetto alla stimolazione vagale che dati gli effetti collaterali cardiovascolari, non si presta a una stimolazione bilaterale, a discapito di una maggiore efficacia. Il nervo trigemino è sprovvisto infatti di componente viscerale e la sua stimolazione multisito è risultata ben tollerata. 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.

Sulla scorta di questi risultati su modelli sperimentali animali, recenti studi di DeGiorgio (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 su soggetti affetti da crisi parziali complesse (CPS) con o senza secondaria generalizzazione, farmacoresistenti, con frequenza mensile delle crisi, in buone condizioni mediche e cardiache, con anamnesi negativa per nevralgia trigeminale, in politerapia con AED. Nel primo studio (2003) sono stati reclutati solo due pazienti e nel secondo 7 (2006). Su questi si è proceduto alla TNS 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, nel secondo anche quella sovraorbitaria.

L'intensità dello stimolo, gradualmente crescente, è stata adattata alla soglia del dolore del paziente. In questi casi sono stati tollerati senza disagio stimoli  $\leq 25$  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. Ciò che si è ottenuto è un dimezzamento della frequenza delle crisi in oltre il 50% dei pazienti. Nell'ultimo 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 un riduzione di oltre il 50 % della frequenza delle crisi. Un paziente ne ha sperimentato addirittura una riduzione del 90%.

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 DeGiorgio 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 faciale, quest'ultimo a riprova dell'adeguatezza dei parametri usati nel rispetto dell'integrità strutturale del nervo.

## Obiettivi

I dati in letteratura sugli effetti EEG della TNS nel sano sono relativi ai soli potenziali evocati. 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 e non escludono un effetto placebo. L'unico effetto desincronizzante EEG documentato dopo stimolazione trigeminale, è quello ottenuto in modelli animali, con stimolazione periodica cronica o erogata in tempo reale alla rilevazione automatica della scarica epilettica, e con solo riferimento all'attività critica, senza informazioni relative al ritmo di fondo.

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto quello di indagare, per la prima volta nell'uomo, gli effetti a breve termine della TNS acuta sull'attività elettroencefalografica in:

- soggetti sani così da chiarire meglio i meccanismi di azione della stimolazione trigeminale a livello corticale.
- malati di epilessia parziale farmaco-resistente in fase intercritica così da spiegare gli effetti clinici anticonvulsivanti della metodica a favore di una sua eventuale applicazione terapeutica.

**Nello specifico lo studio è stato finalizzato a:**

- 1) Valutare la comparsa di una variazione di frequenza della traccia EEG dopo TNS.
- 2) Misurare differenze significative tra la TNS unilaterale e bilaterale.
- 3) Definire topograficamente la risposta EEG alla TNS e la sua eventuale co-localizzazione con i focolai epilettogeni.
- 4) Confrontare gli effetti eegrafici della TNS con quelli secondari alla stimolazione di altri nervi superficiali periferici quali il nervo mediano, per valutarne la specificità.



## Materiali

Sono stati reclutati dieci pazienti affetti da epilessia parziale farmaco-resistente (3M-7F), di età compresa tra i 31 e 57 anni, afferenti all'Istituto di Clinica Neurologica, dell'Università di Sassari e cinque soggetti sani (3F, 2 M) di età compresa tra i 20 e 40 anni. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato dopo la descrizione delle procedure di studio e dei rischi implicati. I criteri di inclusione prevedevano per tutti l'assenza di disturbi cardiaci e nevralgia trigeminale e per i pazienti in particolare: 4 o più crisi parziali complesse mensili con o senza secondaria generalizzazione, la dimostrazione di un'attività focale epilettogena all'EEG, l'assunzione di una politerapia costante di due o più farmaci. Otto soggetti erano affetti da epilessia sintomatica e due da epilessia criptogenetica. Nelle forme secondarie, si è giunti a definizione della zona epilettogena ZE sulla base dei dati anamnestici, neuroradiologici e degli EEG storici, e nei casi più difficili dopo monitoraggio VideoEEG. Cinque tra questi sono stati sottoposti in passato a valutazione prechirurgica presso il Centro Munari dell'Ospedale Niguarda di Milano, ottenendo conferma del dato. Alla RMN encefalo, tre presentavano una sclerosi mesiale-temporale, gli altri, singolarmente, una displasia corticale bilaterale, un'eterotopia nodulare subcorticale, una cisti epidermoide, un linfoma non Hodgkin, una sofferenza ipossico-ischemica cerebrale perinatale. La ZE era temporale in sei pazienti, frontale in uno, e multifocale in sede parieto-occipitale e frontale nell'ultimo, lateralizzata a sinistra in 3 casi, a destra in uno, e bilateralmente nei restanti.

## Metodi

### Stimolazione trigeminale

Gli esperimenti sono stati condotti presso il laboratorio di elettroencefalografia della clinica neurologica di Sassari. Ciascuno dei soggetti reclutati è stato sottoposto in corso di registrazione EEG digitale, dopo un' acquisizione basale, a 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 (Winner Fisioline) con programma automatico, usando elettrodi di argento anallergici posizionati, dopo sgrassamento della cute, in corrispondenza del forame sovra o infraorbitario e qui tenuti adesi (figura 1). Ogni stimolazione constava di 10 treni intermittenti di stimolo erogati a una frequenza di 120Hz e durata d'impulso di 250 $\mu$ s, con forma d'onda quadra bifasica, per un time on di 30s ogni minuto di registrazione, a un'intensità individuale subliminale alla soglia del dolore. La corrente veniva incrementata gradualmente secondo i tempi di adattamento del soggetto, stabilendo una soglia percettiva, una dolorifica, e tra i due valori una intensità media di stimolazione espressa in mA. 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 ipnoinducanti o ansiolitici, prima della seduta sperimentale.

## **Registrazione EEG**

Ogni registrazione EEG è stata eseguita sia in condizioni basali sia in corso che dopo stimolazione trigeminale. Le acquisizioni sono state fatte con sistema Brain Quick (Micromed), con 19 elettrodi (F1, F2, F3, F4, C3, C4, P3, P4, 01, 02, F7, F8, T3, T4, T5, T6, Fz, CZ, Pz) posizionati sullo scalpo secondo il sistema internazionale 10-20 (figura n.2), con montaggio bipolare e uscita analogica su 18 canali. Sono stati settati un filtro taglia alto di 70 Hz, una costante di tempo  $\tau$  di 0.5 Hz, una sensibilità a 70 microV/mm, un filtro notch allo stato on, e una frequenza di campionamento di 256 Hz. Ogni registrazione è stata implementata con monitoraggio elettro-oculografico EOG ( $\tau$  0.3 s, filtro taglia alto 30 Hz) ed elettrocardiografico ECG ( $\tau$  0.01s, 30 Hz). Gli esperimenti sono stati condotti in ambiente silenzioso, su una sedia confortevole, al buio, in condizioni di riposo psico-sensoriale. I soggetti sono stati istruiti a tenere gli occhi chiusi, talora bendati per minimizzare i movimenti oculari, e a prestare attenzione a ogni sintomo ictale.

## **Analisi dei dati**

Le elaborazioni delle tracce sono state fatte in collaborazione con il CNR di Genova. I tracciati acquisiti sono stati sottoposti ad analisi quantitativa EEG nel dominio della frequenza mediante applicazione della Trasformata veloce di Fourier, con finestra di Hamming, per epoche ossia intervalli di tempo di 2 secondi (figura n.3). Il campionamento della traccia è stato fatto manualmente per escludere il più possibile l'attività artefattuale, con rilettura dei patterns bioelettrici e rigetto delle epoche più sporche. Lo spettro di potenza è stato calcolato entro un campo di frequenza di 1,5-32 Hz, suddiviso nelle 4 bande delta (1.5-3.5 Hz), teta (4-7.5 Hz), alpha (8-12.5 Hz), beta (13-32 Hz), con limiti impostati in accordo con i criteri standard, in ciascun soggetto, per ogni singola

localizzazione di elettrodo, in condizioni basali e nel post-stimolo suddiviso in 3 segmenti consecutivi di 10 secondi, da noi denominati S1, S2, S3. Si è elaborata la frequenza media e la potenza assoluta di ciascuna banda misurando la media complessiva dell'attività EEG in ogni banda indipendentemente dalle altre. Lo spettro medio è stato calcolato facendo la media fra tutte le condizioni e derivazioni e soggetti esaminati.

E' stata quindi fatta un'analisi statistica multivariata per misure ripetute, dei dati prima e dopo stimolazione, sia concernenti il gruppo dei pazienti che quello dei sani, mettendo a confronto la potenza delle bande dopo elaborazione logaritmica e la frequenza media nei due stadi, in condizione di stimolazione uni e bilaterale.

### **Analisi topografica**

Nei sani le significatività delle variazioni delle potenze assolute nel post-stimolo rispetto al basale sono state rappresentate in mappe di frequenza per vederne la prevalenza regionale.

Nei pazienti è stata condotta un' analisi preliminare della distribuzione spaziale della risposta ossia della variazione della frequenza media e del teta articolata per derivazioni bipolari, nel post stimolo rispetto al basale, sia uni che bilaterale, mediante ANOVA per misure ripetute. Le interazioni tra regione e condizione e regione e lateralità dello stimolo sono state poi rappresentate topograficamente sotto forma di mappe di potenza relativa di banda e mappe spettrali di frequenza media, lavorando su derivazioni monopolari ossia in referenza media, sui tracciati accorpati delle stimolazioni unilaterali e bilaterali. Il risultato è stato espresso in termini di parametro F (di Fisher) e di significatività delle differenze regionali fra le medie delle varie condizioni.

## **Esperimenti di controllo**

Per verificare la specificità dei nostri risultati abbiamo proceduto alla stimolazione di un altro nervo superficiale periferico quale il nervo mediano. Abbiamo reclutato 5 soggetti sani e 5 pazienti affetti da EPFR, tra quelli già testati con la TNS. Ciascuno di questi è stato sottoposto, in una sola seduta sperimentale, a stimolazione elettrica intermittente transcutanea del nervo mediano al polso (MNS) bilateralmente. Gli stimoli son stati erogati con neurostimolatore manuale, secondo il protocollo usato per lo studio dei potenziali evocati somatosensitivi del nervo mediano (frequenza di 5 HZ, durata di impulso di 250 microsecondi). L'intensità usata era subliminale alla soglia del dolore e sopra soglia di risposta motoria, rappresentata dalla flessione del primo dito della mano per contrazione dell'eminenza tenar. La durata della stimolazione era di dieci minuti, la stessa della TNS, comprendente dieci blocchi di stimolo con un time on e un time off di 30 secondi ciascuno. L'acquisizione EEG è stata fatta sia nel basale (per dieci minuti) che in corso e dopo stimolazione, implementata da monitoraggio EMG elettromiografico dei potenziali del muscolo tenar. Il segnale EEG è stato di seguito processato con analisi quantitativa. Si è estrapolata la frequenza media e la potenza assoluta per ciascuna banda di frequenza per ogni soggetto, condizione e derivazione. Si è calcolato lo spettro medio su tutti i tracciati, e applicata una analisi ANOVA dei dati pre e post MNS. L'analisi è stata condotta separatamente sia nel gruppo dei sani che dei malati.

## **Risultati**

### **Gruppo dei soggetti sani**

Nel gruppo dei soggetti sani abbiamo riscontrato dopo TNS, nell'immediato post-stimolo, un aumento della potenza dello spettro medio EEG, e in particolare un incremento delle attività rapide (12-32 Hz) e della frequenza media (1-32 Hz), senza modificazioni a carico dell'alfa o del ritmo teta. L'attività beta ( $p < 0.01$ ) passa dal valore medio di 4.35 nel basale (valore minimo 2.28 – valore massimo 6.53; DS 1.28) al valore medio di 5.28 (valore minimo 1.93 - valore massimo 13.57; DS 2.67) nel segmento S1 ossia nei primi 10 secondi di post-stimolo. La frequenza media passa a sua volta da un valore medio di 9.32 (range 8.8-10.45; DS 0.69) del basale al valore medio di 9.75 (range 9.17-10.99; DS 0.73) con un  $p < 0.001$ . Le significatività aumentano con la stimolazione bilaterale.

Alle mappe di frequenza, si è visto che la significatività sia del beta (figura n.4) che della frequenza media mappa sulle regioni anteriori frontali (figura n.5). Per quanto riguarda gli esperimenti di controllo con la MNS, si è visto un andamento analogo a quello della TNS con un aumento della potenza dello spettro medio nella zona delle alte frequenze con conseguente rinforzo del ritmo di fondo, senza modificazioni apparenti a carico delle altre bande (figura n.6). Tuttavia l'effetto stavolta non è risultato significativo.

### **Gruppo dei pazienti con EPFR**

#### ***Stimolazione unilaterale***

L'analisi finale è stata condotta su un gruppo di 16 tracciati di 8 pazienti con stimolazioni uni e bilaterali. Due pazienti sono stati esclusi dallo studio in quanto le tracce erano

inficiate da artefatti, fasi di sonnolenza o con un trend di desincronizzazione a partire dal basale.

Abbiamo riscontrato dopo TNS unilaterale, nel segmento S1 ossia nell'immediato post-stimolo, una riduzione della potenza dello spettro medio nella zona del teta e un suo incremento spostandoci verso le frequenze più rapide, sia dopo stimolazione unilaterale che bilaterale (figura n.7 - n.8).

Più specificamente si è visto nel post-stimolo (figura n.9):

- un aumento significativo della frequenza media  $F_m$  ( $p < 0.01$ ), che rappresenta il baricentro della distribuzione spettrale, il punto di equilibrio fra le differenti frequenze, con passaggio dal valore medio di 7.95 (range 4.17 – 12.37; DS 1.71) del basale a 8.64 (range 3.72- 17.71; DS 2.50) in S1 con esaurimento graduale verso S2 (8.46) ed S3 (8.24).
- un decremento significativo ( $p < 0.01$ ) della potenza assoluta della banda teta da un valore di 8.23 (range 1.00- 57.01; DS 7.65) nel basale a 6.00 (range 0.90- 37.55; DS 5.31) in S1 con un con recupero graduale in S2 (6.49) e in S3 (7.60).
- un incremento della banda beta con  $p < 0.05$ , da un valore di 6.86 nel basale a 10.26 (range 0.89- 97.12; DS 16.41) in S1 (S2: 8.52, S3: 8.32).

### ***Stimolazione bilaterale***

La stimolazione bilaterale ha rinforzato la risposta rispetto alla unilaterale ottenendo uno spostamento molto significativo dalle frequenze più basse a quelle più alte ( $p < 0.002$ ) (figura n.10). Nello specifico si è osservato:

1. un incremento della frequenza media da 9.25 nel pre-stimolo a 9.84 in S1, abbastanza sostenuto anche in S2 (9.74) e in S3 (9.72). Ciò che si è stranamente osservato è un aumento della Fm anche nel basale bilaterale rispetto a quello unilaterale (9.25 vs 7.95) come se ci fosse un miglioramento della traccia a lungo termine dopo la prima seduta sperimentale.
2. Una riduzione della potenza della banda teta con passaggio da 5.24 in pre-stimolo a 4.46 in S1. Anche in questo caso si è visto che il basale in bilaterale aveva meno lento rispetto a quello della prima seduta con stimolazione unilaterale.

### ***Analisi topografica***

All'analisi topografica preliminare della distribuzione spaziale della risposta alla TNS, abbiamo riscontrato un effetto significativo della condizione post-stimolo rispetto al basale e della bilateralità dello stimolo rispetto a quello unilaterale. Si ha infatti una riduzione della potenza della banda teta maggiore sulle derivazioni anteriori fronto-centrali, fronto-temporali bilaterali e sul vertice anteriore ( $p < 0.005$ ) e meno significativamente sulle temporali medie a destra e posteriori a sinistra ( $p < 0.05$ ), per stimolazioni unilaterali eterogenee destre e sinistre (figura n.11), con rinforzo significativo con la stimolazione bilaterale ( $p < 0.002$ ) (figura n.12). Anche la frequenza media sembra aumentare maggiormente sulle regioni fronto-temporali bilaterali ( $p < 0.005$ ) con interessamento seppur meno significativo delle derivazioni parasagittali a sx sia frontali che centrali e parieto-occipitali ( $p < 0.05$ ) (figura n.13), e rinforzo dopo stimolazione bilaterale ( $p < 0.002$ ) (figura n.14). Le variazioni coincidono con le localizzazioni delle focalità epilettogene elettroencefalografiche del nostro campione in cui si ha una prevalenza di focalità a sinistra



( nei singoli pazienti: 1) F1/F7 - F1/F3 e T5/O1; 2) F3/C3 e F7/T3; 3) C3/P3 e T5/O1; 4) F4-C4; 5) F2/F4 e C3; 6) F7/T3 e T3/T5; 7) T5/O1 - P3/O1 e F2/F8; ).

L'andamento regionale di queste differenze significative tra regione e condizione nonché tra regione e lateralità dello stimolo sono state confermate con le mappe spettrali topografiche in referenza media. Infatti la mappa di potenza relativa della banda teta (2.5 - 6 Hz) ci mostra un effetto significativo dello stadio ( $F=6.21$ , gdl 3/39,  $p<0.002$ ) e dell'interazione stadio-regione (o stadio-elettrodo) ( $F=2.29$ , gdl 54/702  $p<0.0001$ ) con una riduzione più marcata sulle regioni fronto-temporali (figura n.15). Infine la mappa della frequenza media della banda 1-32 ha evidenziato, come atteso, un effetto medio dello stadio ( $F=8.92$ , gdl=3/39,  $p<0.0001$ ) e un'interazione stadio-regione ( $F=1.91$ , gdl 54/702  $p<0.0002$ ) molto significativi, con una distribuzione globale su tutto lo scalpo, maggiore a livello frontotemporale (figura n.16). L'asimmetria a sinistra dell'analisi spaziale preliminare non si è confermata.

### ***Esperimenti di controllo***

I risultati degli esperimenti di controllo con la MNS sono sovrapponibili a quelli della TNS. Anche in questo caso si ha una riduzione della potenza dello spettro medio nella zona dell'attività lenta delta e teta nei primi due segmenti di post-stimolo rispetto al basale e un rinforzo del ritmo di fondo per uno spostamento verso le frequenze più alte (figura n.17). Tuttavia, contrariamente alla TNS, i dati stavolta non sono significativi.

## **Discussione**

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. L'effetto TNS indotto, sebbene non specifico, è parso più significativo rispetto a quello secondario alla stimolazione di altri nervi periferici superficiali quale il nervo mediano.

### **Effetti EEG TNS- indotti nel sano**

Diversi studi neurofisiologici condotti negli ultimi decenni hanno dimostrato che la stimolazione dei nervi cranici o di aree del tronco encefalico possono causare desincronizzazione elettrica corticale (Moruzzi and Magoun, 1949; Zanchetti et al., 1952; Magnes et al., 1961; Chase et al., 1967). Un arousal EEG può essere ottenuto con l'attivazione di più modalità sensoriali. E' stata ad esempio descritta una riduzione dell'attività focale interictale e delle crisi di assenza con l'attività motoria o mentale (Jung, 1962; Ricci et al., 1972), con la stimolazione termica (McLachlan, 1993) o acustica (Rajna and Lona, 1989). Anche la stimolazione di nervi cutanei di grosso calibro nel gatto (Pompeiano and Sweet, 1962) sarebbe in grado di elicitarne una desincronizzazione corticale. Questi studi provano che la risposta di allerta da noi ottenuta con la TNS in acuto

non è specifica così come non lo è quella secondaria a VNS riportata in altri studi. Anche i nostri esperimenti di controllo con la MNS hanno evocato una risposta sovrapponibile a quella prodotta dalla TNS, anche se con minor significatività. Questa comunanza di effetti generalizzati sulla ritmicità eegrafica, fra nervi così diversi, può essere spiegata solo dalla condivisione di pari meccanismi di azione e strutture quali la FR ascendente. La maggior efficacia della TNS rispetto alla MNS potrebbe invece essere giustificata dal maggior campo recettivo del nervo trigemino e dalla sua brevità rispetto al mediano. Negli esperimenti di Pompeiano, si è dimostrato inoltre come la stimolazione di una stessa struttura nervosa, quale il nervo radiale, possa generare effetti diversi a seconda delle fibre coinvolte e frequenze utilizzate. Infatti l'attivazione delle fibre mieliniche di medio calibro ad alta soglia, ossia le fibre dolorifiche, causa un arousal sia a basse che ad alte frequenze di stimolo, mentre le afferenze tattili, a più bassa soglia, di più grosso calibro e ad alta velocità di conduzione, possono innescare una sincronizzazione EEG o una desincronizzazione rispettivamente per basse e alte frequenze di stimolazione. Allo stesso modo 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% (Foley e Dubois 1937) 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. Anche nel nostro studio abbiamo osservato lo stesso protocollo e usato stimoli trigeminali ad alta frequenza. Avendo usato basse intensità non dolorifiche, gli effetti EEG che ne sono conseguiti potrebbero quindi essere mediati più dalle fibre tattili che da quelle dolorifiche.

E' interessante che studi sulla VNS in modelli animali riportino per stimoli di alta frequenza effetti di desincronizzazione per alte intensità ma di sincronizzazione per basse intensità (Rutecki P. 1990). Nel nostro caso questo non è successo a vantaggio di una possibile stimolazione in cronico efficace seppur non dolorosa. Altro risultato importante è il potenziamento della risposta alla TNS in corso di stimolazione bilaterale. Riguardo questo punto, studi di RMN sulle proiezioni delle differenti branche trigeminali alla corteccia somatosensitiva primaria e secondaria, dimostrano che la metà superiore del viso ha una rappresentazione bilaterale, mentre la cute periorale principalmente controlaterale (Iannetti GD, 2003). 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, come da noi provato. Ultimo dato è quello relativo alla distribuzione della risposta alla TNS. Abbiamo infatti osservato che l' incremento sia della frequenza media che dell'attività beta si localizza sulle regioni anteriori. Questa sincronizzazione del beta frontale endogeno, è fisiologicamente spia di un' inibizione gabaergica, in questo caso verosimilmente facilitata dalla TNS. Non a caso la somministrazione di benzodiazepine e barbiturici Gaba agonisti provoca un aumento dell' attività rapida anteriore (Jensen et al , 2005). Si sa inoltre che dopo stimolazione trigeminale si ha attivazione oltre che della corteccia somatosensitiva primaria e secondaria, anche della corteccia anteriore del cingolo, dell'insula anteriore bilaterale, e per combinazione con stimoli meccanici e chimici, della corteccia prefrontale e premotoria, come dimostrato da studi di RMN funzionale (R. de Leeuw, 2006), per cui non stupisce un correlato elettrico post TNS su queste aree. Ci si è chiesti tuttavia se l'incremento del beta frontale non fosse associato ad attività mentale in corso di

stimolazione o fosse un possibile indice di stato di ansietà. La correlazione temporale con l'immediato post-stimolo (primi 10 secondi di time off) e il dato in letteratura di un decremento del beta frontale in soggetti sotto stress emotivo computazionale (Macaulay, 2004), porterebbero a scartare questa ipotesi.

## **Effetti EEG TNS-indotti nel malato di EPFR**

Gli effetti EEG della TNS nel malato di EPFR sono di difficile interpretazione in quanto non esistono dati certi in letteratura relativi al meccanismo di azione della stimolazione trigeminale sull'attività comiziale. Gli unici studi sperimentali su animale sono confondenti in quanto a fronte di una desincronizzazione eegrafica TNS-indotta dell'attività critica di ratti con epilessia provocata (Fanselow, 2000), si riportano dati sulla registrazione di attività epilettogena spontanea sulla corteccia somatosensitiva di ratti con nevralgia trigeminale sperimentalmente indotta (Kryzhanovskii, 1992, 1993; Dolgikh VG 1992), ipoteticamente secondaria alla formazione di un sistema algico patologico con generazione di abnorme eccitabilità anche in strutture a distanza da quelle insultate. Questa ipotesi è plausibile se si pensa che certe forme di epilessia e di dolore neuropatico sono sottese da cambiamenti molecolari analoghi (Jensen, 2002). A questo proposito sono descritte similitudini tra il kindling dell'epilessia sperimentale, il processo della sensibilizzazione centrale nel dolore neuropatico e, in aggiunta, la cortical spreading depression nell'emicrania con aura, di cui è nota la comorbidità con l'epilessia, aventi tutte in comune alterazioni dei canali del sodio (Post, 2002). Non a caso i farmaci antiepilettici che bloccano i canali del Na<sup>+</sup>, risultano efficaci nel dolore neuropatico grazie alla loro azione di blocco selettivo del firing dei potenziali di azione ad alta frequenza,

meccanismo che è alla base della loro azione protettiva nei confronti delle crisi epilettiche (Calabresi, 2006). Anche gli antiepilettici AEDs che modulano l'attività glutamatergica e gabaergica e inibiscono i canali del Ca voltaggio dipendenti a livello del complesso dei nuclei trigeminali, sono usati sia nella nevralgia trigeminale che nella profilassi dell'emicrania (Storer, 2004). Queste condizioni patologiche con elettrogenesi spontanea analoga, oltre che target di terapie farmacologiche comuni, sono consensualmente responsive alla neurostimolazione elettrica dei nervi cranici, già in uso nel trattamento della nevralgia trigeminale e nella profilassi dell'emicrania e delle cefalee trigeminali autonome, grazie a una modulazione del controllo inibitorio sulla via nocicettiva e all'aumento della soglia di attivazione della sensibilizzazione centrale (Akerman, 2005; Storer, 2004; Low, 2003; Ottman, 1994; Popeney, 2003; Goadsby, 2008; Slavin, 2006; Piovesan, 2007; Lenaerts, 2008). Tutte queste ragioni potrebbero spiegare come la stimolazione trigeminale, oltre che nel trattamento della nevralgia trigeminale (Slavin, 2006; Dirkwinkel 2008) e nella profilassi dell'emicrania (Ahmed HE et al., 2000, Allais G et al., 2003), possa trovare indicazione anche in altre condizioni di ipereccitabilità neurale craniale quale l'epilessia focale agendo su strutture anatomiche e alterazioni molecolari comuni a queste patologie. Sono infatti 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 (Menetrey 1987, Caous 2001, Couto, 2004; Zerari-Mailly et al., 2005) che non a caso sono implicati sia nella modulazione del 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; Stanton, 1992; Hammond, 1992; Ben-Menachem, 1995). Lo stesso meccanismo parrebbe plausibile per la TNS (Fanselow 2000, DeGiorgio 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 paratrigeminale 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 (Maixner, 1992; Bossut e Maixner, 1996; Multon e Shoenen, 2005; Carius, 2005;). Nei modelli animali dopo VNS si è visto un aumento dell'inibizione gabaergica e una attenuazione dell'espressione del gene cfos nel nucleo caudale trigeminale che potrebbero spiegare questi effetti analgesici (Fromm, 1993; Takeda, 1998; Bohotin, 2003). Anche il tgm 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) (Blanc, 1983. Schaller B, 1999, Sousa, 2001; Cha 2002). Questa relazione tra i due nervi potrebbe essere alla base non solo degli effetti collaterali o analgesici ma anche dell'azione antiepilettica dei due. A tale proposito i nostri dati EEG sono in perfetto accordo con quelli indotti dalla

stimolazione vagale (Chase, 1966; Woodbury, 1990; Thompson, 1999; Marrosu, 2005). Si è visto infatti su modelli animali che la VNS, dipendentemente dalla frequenza e dalla intensità di stimolo, può produrre una sincronizzazione (Bailey and Bremer, 1938; Rojas, 1964) o una desincronizzazione dell'attività EEG (Zanchetti et al., 1952; Chase et al., 1966) e una riduzione delle anomalie epilettiformi intercritiche IEA (Mclaclhan, 1993). Studi sull'uomo hanno mostrato sia in corso di VNS cronica che acuta una riduzione dello spiking e del clusterig delle IEA (Koo, 2001; Kuba, 2002) tuttavia senza effetti a breve termine sul ritmo di fondo (Kuba, 2002; Salinsky, 1993; Hammond, 1992). Contrariamente i nostri risultati mostrano dopo TNS acuta un rinforzo della frequenza media dovuta sia a una riduzione delle attività più lente che un aumento di quelle rapide. Un incremento analogo delle frequenze rapide gamma è stato descritto per la VNS da Marrosu (2005) ma solo conseguentemente a stimolazione cronica. Quest'ultimo è un aspetto interessante in quanto all' aumento dei ritmi rapidi si attribuisce un maggior stato di vigilanza, una minor occorrenza degli effetti sedativi degli AEDs, un rialzo del tono dell'umore e in ultima analisi un miglioramento della qualità della vita dei pazienti in trattamento con VNS, il che potrebbe ripetersi sotto TNS cronica, tanto più che le modificazioni EEG si hanno già in acuto.

Il nostro riscontro di un potenziamento della risposta in corso di stimolazione trigeminale bilaterale, sia in termini di riduzione della potenza della banda teta che di incremento della frequenza media, potrebbe rappresentare un altro vantaggio rispetto alla VNS. Infatti, il nervo trigemino essendo sprovvisto di componente vegetativa, si presta ad essere stimolato bilateralmente senza rischi cardiovascolari a differenza del nervo vago che è coinvolto nel controllo delle funzioni viscerali (Fanselow, 2000) e può essere stimolato solo a sinistra.



Nonostante la sua unilateralità, la VNS ha effetti biemisferici (Chase et al., 1966; Zabara, 1992; Henry et al., 1998, 1999), indipendenti dal lato di esordio delle crisi ( Manon-Espaillet, 1994; Ben-Menachem, 1994), come anche dimostrato da studi di RMN funzionale (Henry, 1998; Van Laere, 2002). 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. Il riscontro di un miglioramento della traccia in condizioni basali nella seduta con stimolazione bilaterale rispetto a quella con TNS unilaterale, ci ha in un primo momento illusi di un effetto a lungo termine della TNS, tanto più che non era imputabile a revisioni terapeutiche in quanto apportate in un solo paziente. Tuttavia, considerate le finestre di osservazione diverse per ogni paziente , talora molto lunghe fra la prima e la seconda sperimentazione, e data la breve durata della stimolazione (10 minuti), interpretiamo questo risultato come casuale.

La riduzione della potenza della banda teta, riscontrata nei soli pazienti e non nei sani, ci ha indotto a pensare che tale attività fosse patologica e a studiarne meglio la distribuzione spaziale. Si è trovata una corrispondenza di questa riduzione sulle regioni anteriori fronto-temporali dove si localizzano gran parte dei focolai epilettogeni dei pazienti studiati, il che potrebbe indicare o un antagonismo specifico della TNS con l'attività epilettogena o una partecipazione selettiva di alcune aree cerebrali alla TNS, con un indice di attivazione corticale superiore. Le regioni frontali e temporali sembrerebbero coinvolte anche nella

VNS che aumenta sia il flusso ematico corticale frontale e ippocampale, come documentato da studi SPECT (Van Laere K et al, 2000; 2002, Barnes A et al, 2003), PET (Henry TR et al, 1998, 1999; 2004) e di RMN funzionale (Narayanan JT et al., 2002; Sucholeiki R et al, 2002) sia l'immunoreattività del gene *cfos* e quindi la trascrizione di neurotrofine quali la BDNF, promotrice dell'espressione dei recettori GABA A, a livello temporale, sia la concentrazione di noradrenalina e la sintesi di fattori di crescita a livello della corteccia prefrontale (Follesa et al, 2007), svolgendo una azione plastica e trofica locale responsabile a lungo termine delle modificazioni sinaptiche e morfo-funzionali alla base dell'innalzamento della soglia convulsiva. E' quindi possibile che le modificazioni EEG indotte dalla TNS acuta, possano seguire l'andamento regionale di variazioni ematiche e neurotrasmettitoriali, condividendo meccanismi d'azione comuni con la VNS. Tuttavia in coincidenza con i nostri risultati, uno studio sulla VNS di Marrosu (2003) riporta in un gruppo di pazienti con epilessia lobare fronto-temporale, con stimolatore impiantato, un aumento intrafocale della densità recettoriale GABA A, quantificato con SPECT. Similmente anche la TNS potrebbe avere un'azione antiepilettogena specifica e la spaziatura della sua risposta dipendere da quella dei focolai.

Ci si è chiesti tuttavia se la riduzione del teta, nonché l'incremento della frequenza media in sede frontale non potessero essere espressione di un aumento del livello di attenzione e conseguenti all'attesa dello stimolo. Questa ipotesi è stata falsificata dal fatto che la risposta è confinata soprattutto ai primi 10 secondi di post- stimolo, suggerendo una relazione strettamente causale con lo stimolo stesso ed escludendo l'interferenza di altri fattori desincronizzanti che produrrebbero effetti transienti e casuali e meno localizzabili nel tempo. Inoltre vi sono studi che al contrario più che una riduzione, riportano la

comparsa di attività teta frontale durante compiti cognitivi che richiedono attenzione e memoria a breve termine (Burgess and Gruzelier, 1997; Inanaga, 1998; Ishihara and Yoshii, 1972; Laukka et al., 1995; Lazarev, 1998; Smith et al., 1999), o addirittura un suo incremento nella working memory (Gevins et al., 1997; Jensen and Tesche, 2002; Krause et al., 2000; Onton et al., 2005), suggerendo la localizzazione di un generatore di teta ritmico a livello del cingolo anteriore e della corteccia frontale media (Asada et al., 1999; Gevins et al., 1997; Ishii et al., 1999; Onton et al., 2005). Infine se il teta ridotto fosse fisiologico, non si spiegherebbe perché una riduzione analoga non si sia osservata nei soggetti sani.

Oltre all'asimmetria di segnale intraemisferica, si è riscontrata a una prima analisi topografica anche una asimmetria interemisferica con spostamento della risposta a sinistra, giustificabile dalla prevalenza nel campione di focolai epilettogeni a sinistra, e dal maggior numero di stimolazioni a random a sinistra e per di più ispilateralmente al focolaio. Tuttavia il dato non è stato confermato con le mappe di frequenza.

In ultimo la maggior efficacia della TNS, rispetto alla stimolazione del nervo mediano dimostrata in questo studio, potrebbe indicare l'esistenza di target anatomici più sensibili alla TNS, per quanto non specifici. Come nel sano, una minore refrattarietà neuronale nel complesso trigeminale, un tragitto di percorrenza dello stimolo più breve, e una popolazione recettoriale più densa potrebbero rendere ragione di questa maggior significatività.

## Conclusioni

Dopo la comprovata efficacia della TNS in recenti studi clinici in pazienti con epilessia, i risultati del nostro lavoro possono aiutare a capire le potenzialità terapeutiche della metodica.

La mancanza di effetti collaterali, la minore invasività, i minori costi, la più facile applicabilità di questa tecnica di neurostimolazione rispetto alla VNS, così come l'alto numero di pazienti che ne potrebbero beneficiare, rendono già auspicabile l'uso della TNS nell'EPFR.

La desincronizzazione EEG da noi osservata e la co-localizzazione degli effetti della TNS con i focolai epilettogeni EEG, scardiscono ulteriormente l'appropriatezza della metodica, in quanto non solo capace di uno stato di allerta EEG ma anche di una probabile azione intrafocale più mirata.

Il potenziamento della risposta EEG con stimolazione bilaterale, rappresenterebbe in alternativa alla VNS un possibile guadagno di efficacia a fronte di minori effetti collaterali, essendo il trigemino sprovvisto di componente vegetativa.

La maggior significatività rispetto ad altre stimolazioni superficiali nervose periferiche suggerisce in ultimo una maggior sensibilità anatomo-funzionale del sistema nervoso centrale nei confronti della TNS.

L'insieme dei nostri dati potrebbe quindi incoraggiare l'uso della TNS come terapia palliativa nell'epilessia farmacoresistente in particolare in sostituzione o in associazione con la VNS, con cui abbiamo confermato alcune similitudini.

Gli studi sul sano mostrano ugualmente un arousal EEG spia verosimilmente di un potenziamento dell'inibizione gabaergica a livello frontale da parte della TNS o indice di

un diverso grado di attivazione delle aree corticali in risposta alla TNS elettrica. La mancata variazione del teta nel sano, ci ha convinti inoltre della natura patologica del teta ridotto dei pazienti e ci ha spinti a spaziarne meglio la distribuzione così da validarne la natura epilettogena, risultando così di grande aiuto nell'interpretazione dei risultati sul malato.

## Prospettive future

Le conclusioni del progetto hanno incoraggiato la collaborazione con la cattedra di medicina nucleare di Sassari, il dipartimento di scienze cardiovascolari e neurologiche e il dipartimento di biologia sperimentale di Cagliari per:

- una estensione futura del progetto ai pazienti resistenti alla stimolazione vagale per valutare la possibile coadiuvazione o alternativa della TNS cronica alla VNS. A questo scopo si valuterà l'impatto della TNS sull'attività EEG, sulla situazione clinica e sulla qualità di vita dei pazienti con EPFR nei quali la VNS abbia avuto una scarsa efficacia (< 40%).
- chiarire sui modelli animali i meccanismi neurofisiologici e le strutture anatomiche alla base dell'azione anticonvulsiva della TNS. Ciò sarà possibile, attraverso la valutazione immunostochimica della variazione secondaria alla TNS acuta e cronica nella quantità e nell'espressione genica di neurotrasmettitori, proteine e neurotrofine che è già noto essere implicati negli effetti antepilettici e trofici della VNS sul sistema nervoso centrale.
- spaziare con studi perfusionali mediante la metodica della tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo (SPECT) la risposta alla TNS acuta sia in soggetti sani che affetti da EPFR, in correlazione con i dati elettro-clinici, a completamento dello studio topografico svolto sinora sull'EEG, così da marcare le aree target della stimolazione.

Questo approccio multidisciplinare è teso a un approfondimento dello studio delle potenzialità della TNS nel trattamento di pazienti con EPFR non candidabili né alla chirurgia dell'epilessia né alla VNS e in quelli che, non rispondendo alla VNS, potrebbero beneficiare di una sua complementazione con la TNS. Di conseguenza, appare interessante

il parallelo avvio di uno studio mirato ad acquisire conoscenza delle strutture nervose impegnate nell'azione antiepilettica della TNS e dei meccanismi attraverso cui essa ne modula l'attività, campo di ricerca sinora inesplorato.

# Ringraziamenti

## Grazie

Alla Prof.ssa Franca Deriu per avermi dato fiducia e autonomia, per aver dato un domani al progetto attraverso future collaborazioni, per avermi qualificato per nuovi incarichi professionali, per avermi convinta che l'obiettivo non è sempre irraggiungibile, per avermi dato esempio di come moltiplicare le ore della giornata, per gli scontri arrendevoli e stimolanti, per la comprensione nei momenti difficili e soprattutto per la gratificante amicizia.

Al Prof. Tolu per l'occasione data di affacciarmi per la prima volta al mondo della ricerca, per aver creduto nelle potenzialità del progetto anche con investimenti futuri, e per i consigli sapienti.

Al Dr. Fabrizio De Carli, del CNR di Genova, che ha curato l'elaborazione dei dati, per la dedizione disinteressata e la professionalità dimostrata.

Alla Dr.ssa Murrighile e il Dr. Ganga, della Clinica Neurologica di Sassari, miei maestri, per aver partecipato all'arruolamento dei pazienti, dato disponibilità nelle sedute di sperimentazione, e sostenuto nel percorso.

Ai tecnici del servizio di neurofisiologia della Clinica Neurologica di Sassari, Nino e Gianni, per gli insegnamenti di tecnica EEG e per l'assistenza strumentale.

Alle colleghe e amiche dell'Istituto di Fisiologia di Sassari, quelle ormai lontane, Rosella e Bruna, e quelle ancora vicine, Giovanna, Silvia, Jasna per l'allegria, l'affetto, e il coraggio umano e professionale che mi hanno dimostrato e infuso.



Grazie a Elena ed Enzo, colleghi e amici preziosissimi che mi hanno illuminato e aiutato nel lavoro, con cui ho condiviso le gioie e i dolori di questi anni.

Grazie a Giovanni Antonio, per l'aiuto datomi per il manoscritto, con amore e tribolazione.

Grazie ai miei familiari, a cui ho rubato gran parte del tempo dedicato a questa tesi.

## Tabelle medie generali

**Gruppo sani** stimo=infra stage=S1 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	6.2692530	5.6970431	1.3189100	22.9442000
teta	5	2.0763772	2.4263415	0.3177100	10.5518000
alfa	5	25.1881663	31.1669975	0.9822500	168.4260000
beta	5	5.1049546	4.5239395	0.5040190	16.7850700
fm	5	10.7487811	2.3064456	5.1615303	16.1932660

gruppo=sani stimo=infra stage=S2 -----

delta	5	5.8382907	6.9597977	1.4172100	36.1847000
teta	5	1.9618917	2.2498789	0.3119100	10.3962000
alfa	5	28.6888407	35.9342441	1.0921300	210.5033000
beta	5	5.2861460	4.5306150	0.6072460	17.4662000
fm	5	10.9428791	1.8549037	7.0420505	15.4564861

gruppo=sani stimo=infra stage=S3 -----

delta	5	5.8153572	4.5754003	1.2909600	17.5780000
teta	5	2.0121069	2.3351531	0.3318700	11.0993000
alfa	5	26.6798761	32.0978548	1.1808800	183.7100000
beta	5	5.3520816	4.3459108	1.2701360	17.3812700
fm	5	10.9561108	1.9627783	6.3468623	15.4983384

gruppo=sani stimo=infra stage=basale -----

delta	5	6.2160146	6.0385632	1.3966400	24.7962000
teta	5	2.0931956	2.4255706	0.3386900	11.0738000
alfa	5	28.5830870	37.2123124	1.0988200	196.2070000
beta	5	4.6331864	4.5584579	0.4837120	16.1435900
fm	5	10.4125044	1.5708580	6.9325979	14.0693288

The SAS System

## Tabelle medie generali

**Gruppo sani** stimo=sovra stage=S1 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	8.5315239	4.2905119	2.9660200	25.1211000
teta	5	1.8712567	0.8524431	0.6305800	4.3316000
alfa	5	33.3770561	23.4012664	3.2181000	92.2899000
beta	5	4.8550563	3.7167208	1.8971200	24.6021800
fm	5	9.8306345	1.3136421	7.9691074	14.3476002

--- gruppo=sani stimo=sovra stage=S2 -----

delta	5	7.4194309	3.0374792	2.9075900	19.9683000
teta	5	1.8893109	0.7949372	0.6376100	4.0553000
alfa	5	33.7685087	24.7344323	2.6342400	106.7486000
beta	5	4.2769771	2.2062929	1.8272470	11.9021030
fm	5	9.8269707	1.2778387	8.0716015	14.0101184

--- gruppo=sani stimo=sovra stage=S3 -----

delta	5	8.0385887	3.4154433	3.1220300	21.2901000
teta	5	1.8478289	0.7956745	0.5579000	4.2872000
alfa	5	35.9777515	27.1405160	2.9152400	127.8222000
beta	5	4.1348499	1.9062437	1.8377640	10.5437300
fm	5	9.6191818	1.1486795	7.5361508	13.4406129

---- gruppo=sani stimo=sovra stage=basale -----

delta	5	7.3946535	3.1412331	3.3018200	20.1290000
teta	5	1.8384772	0.7927602	0.5141900	4.1635000
alfa	5	31.6048515	23.5503930	3.6997200	114.5926000
beta	5	3.6319216	1.4611573	1.5689320	7.6719000
fm	5	9.4690414	1.2354842	7.2539822	13.2271452

The SAS System

## Tabelle medie generali

**Gruppo sani** stimo=mono stage=S1 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	5.4813861	3.2503251	1.4181700	12.5836300
teta	5	0.9006978	0.3623930	0.3652300	1.6463500
alfa	5	30.5596250	22.4692964	3.2683700	68.5033900
beta	5	5.2869302	2.6735220	1.9355410	13.5704920
fm	5	9.7517467	0.7322479	9.1776039	10.9908014

--- gruppo=sani stimo=mono stage=S2 -----

delta	5	4.8469756	2.1457531	1.5852700	10.1046100
teta	5	1.1035389	0.5045719	0.3669500	2.3096000
alfa	5	34.1624944	25.4080706	3.3739600	81.2300000
beta	5	5.1617127	2.0567345	2.0633720	10.9264830
fm	5	9.6334072	0.7474933	9.0145544	10.0891124

----- gruppo=sani stimo=mono stage=S3 -----

delta	5	4.5458889	1.8415671	1.6669700	9.5383300
teta	5	1.1721506	0.6536287	0.5771700	3.4031100
alfa	5	34.3160350	24.1332786	4.0180100	72.8692000
beta	5	5.0564537	1.8456920	2.0883530	10.0639420
fm	5	9.5223322	0.7375052	8.9762680	10.6838076

----- gruppo=sani stimo=mono stage=basale-----

delta	5	3.5397611	1.5078803	1.1624400	6.7336500
teta	5	0.8609033	0.3410362	0.4524800	1.8398200
alfa	5	25.4242061	17.7012645	3.2150700	57.9028300
beta	5	4.3554805	1.2841012	2.2810200	6.5386300
fm	5	9.3203430	0.695074	8.8577624	10.4531223

The SAS System

## Tabelle medie generali

### Gruppo EPFR

gruppo=epi stimo=mono stage=S1 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	8	22.7415219	25.7722471	2.3198200	164.9080000
teta	8	6.0091477	5.3193070	0.9075100	37.5570000
alfa	8	34.8417367	32.6355952	3.4813700	187.1426000
beta	8	10.2673759	16.4141459	0.8945360	97.1274000
fm	8	8.6496804	2.5078443	3.7235112	17.7115250

gruppo=epi stimo=mono stage=S2 -----

delta	8	21.7268419	23.4910436	2.4812700	137.3840000
teta	8	6.4931407	5.3007285	0.7849800	29.9380000
alfa	8	38.2367819	39.0399630	3.3591200	222.8455000
beta	8	8.5202745	11.0254928	0.9726730	65.1082000
fm	8	8.4563973	2.0473318	4.3375279	17.0335098

gruppo=epi stimo=mono stage=S3 -----

delta	8	26.3967426	32.5917169	1.9199700	166.5560000
teta	8	7.6025440	6.2408516	0.7933600	32.1670000
alfa	8	36.0334266	33.5355532	3.0473300	184.9779000
beta	8	8.3220466	11.3829386	0.9466370	70.6348000
fm	8	8.2395920	2.0551552	3.8931248	16.0487275

gruppo=epi stimo=mono stage=basale-----

delta	8	26.1139724	30.4783126	2.5184300	228.8890000
teta	8	8.2341416	7.6579356	1.0042300	57.0150000
alfa	8	36.4682620	31.6450540	2.5728900	151.6560000
beta	8	6.8671373	7.0992530	0.8359390	34.5753900
fm	8	7.9515608	1.7155419	4.1743263	12.3796278

The SAS System

## Tabelle medie generali

### Gruppo EPFR

gruppo=epi stimo=bilaterale stage=S1 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	8	17.0661344	24.2677364	1.4537300	171.5032000
teta	8	4.4569732	4.3052160	0.3122800	23.4250000
alfa	8	34.4014934	41.5995902	0.8488350	254.4544000
beta	8	10.7443823	12.9852421	0.5214220	75.7268700
fm	8	9.8440893	2.3420977	4.0323554	17.3716642

gruppo=epi stimo=bilaterale stage=S2 -----

delta	8	14.2618706	13.7511884	1.6865600	78.0100000
teta	8	4.2012354	4.0141900	0.3268800	18.7836000
alfa	8	34.4354888	40.1362604	0.7830740	205.6062000
beta	8	10.3118987	12.5791211	0.5283840	71.0753000
fm	8	9.7398043	2.1595265	5.3658391	15.4828005

gruppo=epi stimo=bilaterale stage=S3 -----

delta	8	15.3509469	16.2205953	1.5462400	84.4910000
teta	8	5.0027902	5.1259844	0.2658900	25.5080000
alfa	8	37.9217182	44.9640237	0.8328340	244.2608000
beta	8	10.5773096	12.5338289	0.5714480	70.5538600
fm	8	9.7188633	2.1534643	5.2454985	15.8345552

gruppo=epi stimo=bilaterale stage=basale -----

delta	8	14.0615786	13.6865936	1.9664500	76.4060000
teta	8	5.2449866	5.6128273	0.4442900	33.4170000
alfa	8	31.6018547	34.6879813	0.7260210	187.7084000
beta	8	8.6744544	10.3252022	0.5037320	62.2391300
fm	8	9.2544677	1.9915552	5.1616039	15.1790589

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

-----deriva= **C3/P3** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4495015	0.9677730	-0.5148671	3.0226614
fm	16	8.8655046	1.8256542	5.9268728	13.4191886

-----deriva=C3/P3 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4959225	0.9472144	-0.4953132	3.0942781
fm	16	8.7390341	1.5572721	6.2551311	12.3973552

-----deriva=C3/P3 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5638945	1.0020738	-0.5474377	3.3091186
fm	16	8.7755805	1.7298587	5.8331986	12.6905816

-----deriva=C3/P3 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6207181	0.9949648	-0.4900268	3.2858239
fm	16	8.6201098	1.7304455	5.9034090	12.6653671

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= C4/P4 stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4052578	0.9289190	-0.7601848	2.5032294
fm	16	8.8339602	1.4206331	6.9554970	12.0238372

----- deriva=C4/P4 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5135960	0.9387393	-0.5562415	2.9430433
fm	16	8.6838609	1.2954936	6.6339143	11.4134322

----- deriva=C4/P4 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6240596	0.9435500	-0.4192497	2.9846562
fm	16	8.6183779	1.4036050	6.4954326	11.5532402

----- deriva=C4/P4 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6229128	0.8936010	-0.3551903	2.8950110
fm	16	8.5977051	1.4016135	6.8062784	11.6212658

The SAS System



## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **CZ/PZ** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.0777506	0.8382151	-0.4484927	2.0776024
fm	16	9.5213300	1.8178699	6.7671709	12.6438597

----- deriva=CZ/PZ stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.1182556	0.8976982	-0.5295159	2.3539434
fm	16	9.4074204	1.6366920	6.6477131	12.2905789

----- deriva=CZ/PZ stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.2694952	0.9326139	-0.4058952	2.6701406
fm	16	9.3062467	1.7917413	6.2315765	12.6062116

----- deriva=CZ/PZ stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.2754953	0.9225082	-0.3389894	2.5880272
fm	16	9.4175542	1.9090282	6.4545416	12.3829889

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **F3/C3** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.2332650	0.9253236	-0.6852584	2.7063154
fm	16	10.0393359	2.8629725	5.2094732	16.4674205

----- deriva=F3/C3 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.2422668	0.9196550	-0.6091737	2.9049648
fm	16	10.0081601	2.5647829	5.6324374	15.4828005

----- deriva=F3/C3 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.3470212	0.9382339	-0.4527926	2.8277041
fm	16	9.9503743	2.6943204	5.3590182	15.8345552

----- deriva=F3/C3 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5257143	0.9431777	-0.2624173	3.3100319
fm	16	9.5458633	2.4585294	4.9584160	15.1790589

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **F4/C4** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4960224	0.9136046	-0.3113739	3.0874907
fm	16	9.0124490	2.4074884	6.2217281	14.9048218

----- deriva=F4/C4 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6024762	0.9040408	-0.1411835	3.1345372
fm	16	8.8602735	2.0820527	6.2914840	13.6408252

----- deriva=F4/C4 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6329359	0.8829915	-0.3405064	3.0254367
fm	16	8.8627917	2.2326775	6.2061388	13.9879374

----- deriva=F4/C4 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.7428627	0.9267908	0.0571929	3.2241419
fm	16	8.6965777	2.2034687	5.9896237	13.8709806

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **F7/T3** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5298066	0.9338880	0.0196261	2.9495470
fm	16	10.6543007	3.0891846	5.4150516	14.8897732

----- deriva=F7/T3 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5344058	0.9638735	0.1368708	3.2000681
fm	16	10.6445688	2.8393310	5.7708055	14.5181849

----- deriva=F7/T3 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6101163	0.9841497	0.0920230	3.3269766
fm	16	10.6872749	2.7897537	5.6042004	15.1178160

----- deriva=F7/T3 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.7589437	0.9950894	0.3660102	3.2287866
fm	16	8.9077446	2.1458005	5.4137838	12.0775813

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **F8/T4** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4458358	1.0862347	-0.9075044	2.8355577
fm	16	9.5628025	2.9568113	5.4582269	16.6243893

----- deriva=F8/T4 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5036719	1.1084055	-0.9153662	2.9523132
fm	16	9.5002875	2.4202536	5.5195589	14.4740676

----- deriva=F8/T4 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6188040	1.1069861	-0.8262901	2.9747997
fm	16	9.3006116	2.4824388	5.5174480	14.8963935

----- deriva=F8/T4 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5600745	1.0245693	-0.3924206	3.0332689
fm	16	7.9177289	2.0569319	5.4717816	12.2113187

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **FP1/F3** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.7639715	0.5028983	-0.2349125	1.4972318
fm	16	9.0732355	2.3325675	4.2741228	13.1513383

----- deriva=FP1/F3 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.8296019	0.5576083	-0.2411293	1.6892283
fm	16	8.8224942	2.1421966	4.5002261	12.9992929

----- deriva=FP1/F3 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.8846907	0.6554582	-0.2297403	2.1074336
fm	16	8.9511335	2.3192052	4.2452635	13.3023735

----- deriva=FP1/F3 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.0024360	0.6308208	-0.1934877	2.0883022
fm	16	8.9734374	2.0273548	4.2684541	12.3607129

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **FP1/F7** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6493461	0.9102619	0.0977617	3.4923170
fm	16	9.4215120	3.7024841	4.0483300	17.5611655

----- deriva=FP1/F7 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6353308	0.8130191	0.3688080	3.3193725
fm	16	9.0522897	3.4301101	4.4034241	17.0335098

----- deriva=FP1/F7 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.7019189	0.8934872	0.2936691	3.3148403
fm	16	9.2318889	3.1165107	4.3188407	16.0487275

----- deriva=FP1/F7 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.8956126	0.9252532	0.3884953	3.9919796
fm	16	8.0028781	2.1062278	4.1743263	13.1022760

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **FP2/F4** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.6765729	0.9384914	-1.1180704	1.9592353
fm	16	8.3345125	3.1002350	3.7235112	13.8564459

----- deriva=FP2/F4 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.7452492	1.0387116	-1.1011154	2.3661137
fm	16	8.2275187	2.7261847	4.3375279	13.7520643

----- deriva=FP2/F4 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.8248973	1.1001634	-1.3184862	2.5921080
fm	16	8.4576008	2.9703611	3.8931248	13.5382140

----- deriva=FP2/F4 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	0.8747056	1.0236932	-0.9694806	2.6151817
fm	16	8.0934034	2.3055257	4.1763659	12.3796278

The SAS System



## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **FP2/F8** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6695693	0.7569615	0.0749126	3.0211320
fm	16	8.5458547	2.9320023	4.0323554	14.8978041

----- deriva=FP2/F8 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6452036	0.7758675	0.5437941	2.9600222
fm	16	8.6340289	2.5265519	6.3192798	13.6453989

----- deriva=FP2/F8 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.8362698	0.7824970	0.3778746	3.0810426
fm	16	8.4635121	2.6934068	5.7732581	13.6721838

----- deriva=FP2/F8 stage=Wake -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.8438395	0.8432368	0.4068774	3.2928695
fm	16	7.8582036	2.2346239	5.6079348	13.0411572

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **FZ/CZ** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
leta	16	1.7177999	0.6107189	0.4485246	2.6630877
fm	16	9.2285462	1.9977653	6.4356478	13.0513593

----- deriva=FZ/CZ stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.7654546	0.6644774	0.5023801	2.6150573
fm	16	9.1520516	1.8314749	6.4567595	12.1040750

----- deriva=FZ/CZ stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.8316138	0.6767573	0.3913865	2.7124405
fm	16	9.0842815	2.0204750	6.0442985	12.4484768

----- deriva=FZ/CZ stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	2.0174842	0.6928218	0.8314385	3.0455410
fm	16	8.9812417	1.9884738	5.8175348	13.0278436

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **P3/O1** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4876779	0.6073718	0.0901240	2.1883520
fm	16	8.9990894	1.3097643	6.7923653	12.0000952

----- deriva=P3/O1 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5684924	0.6191210	0.4307754	2.3660762
fm	16	8.8447862	1.4524159	6.2122896	12.0806605

----- deriva=P3/O1 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6817513	0.6411637	0.4586962	2.4227209
fm	16	8.6416819	1.5962574	5.3840061	11.9020598

----- deriva=P3/O1 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6749931	0.7063714	0.2091825	2.5882752
fm	16	8.6103995	1.3212242	6.8467486	11.1140670

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **P4/O2** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5265787	0.8535287	-0.2281938	2.8439147
fm	16	8.4783014	1.5081093	6.4100054	10.9978894

----- deriva=P4/O2 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5568445	0.8797675	-0.2027406	3.3104956
fm	16	8.3376475	1.6265298	5.7304845	11.0737771

----- deriva=P4/O2 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6765258	0.8117639	-0.0297275	2.9906393
fm	16	8.1819618	1.7665427	4.8995916	11.0154881

----- deriva=P4/O2 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.6845174	0.8336812	-0.1004283	3.2076531
fm	16	8.2586665	1.7829169	5.4254842	11.2205703

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **T3/T5** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.7500231	0.8033980	-0.3731093	2.8367072
fm	16	9.8079351	2.8205404	5.9802230	17.7115250

----- deriva=T3/T5 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.7281766	0.7766957	-0.3052488	2.9984336
fm	16	9.6943384	2.2523167	5.7146277	14.1687318

----- deriva=T3/T5 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.8333772	0.8610299	-0.4190672	3.0361302
fm	16	9.1030938	2.0411490	4.8370789	12.2601866

----- deriva=T3/T5 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.8441207	0.8606516	0.1275045	3.2509441
fm	16	8.6771950	1.9643775	4.9966701	12.6003763

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **T4/T6** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.9978309	0.8810526	-0.2616895	2.8958401
fm	16	9.2881303	2.6824716	5.6395197	17.4753663

----- deriva=T4/T6 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	2.0291967	0.8100798	-0.0197232	3.0097880
fm	16	8.7406274	1.9746795	4.9248097	11.6989513

----- deriva=T4/T6 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	2.1925089	0.8301040	0.1926184	3.1931354
fm	16	8.3524647	1.9449521	4.2895102	11.5964335

----- deriva=T4/T6 stage=Wake -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	2.1021140	0.8775835	0.0376907	3.2107630
fm	16	7.8442234	2.0500152	5.1616039	13.4112926

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **T5/O1** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.3839558	0.9700634	-0.5966740	3.3124390
fm	16	9.3698178	2.7188992	5.6947919	15.7351511

----- deriva=T5/O1 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4769777	0.9511116	-0.6128214	3.1805091
fm	16	9.2716638	2.2467014	5.8511068	14.7227248

----- deriva=T5/O1 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.4872786	0.8625073	-0.4276187	2.8613319
fm	16	8.8883397	1.7927117	6.0279189	12.9000036

----- deriva=T5/O1 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5788836	1.0029122	-0.6070796	3.5465668
fm	16	8.8375444	1.5633578	6.0436710	11.2216471

The SAS System

## Gruppo EPFR (mono + bilaterali)

----- deriva= **T6/O2** stage=S1 -----

The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5234475	0.6859642	0.2028102	2.6486045
fm	16	9.4073097	2.0892013	5.6717126	15.4081744

----- deriva=T6/O2 stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5396171	0.6622173	0.2757891	2.4984397
fm	16	9.1447624	1.4004163	6.0007492	11.2160360

----- deriva=T6/O2 stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5995318	0.6473605	0.5154489	2.5020833
fm	16	8.7688810	1.4313232	5.2454985	10.7461022

----- deriva=T6/O2 stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
teta	16	1.5938281	0.7007659	0.3916974	2.6355369
fm	16	9.0137793	1.6240007	6.3125767	12.9995076

The SAS System



## Tabelle medie generali MNS

### Gruppo EPFR

----- gruppo= epi stage=S1 -----  
 The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	8.9484578	6.3693119	2.8840768	18.3339972
teta	5	8.4346336	6.3297532	2.0458078	16.4959656
alfa	5	32.8195848	35.2419241	3.6167108	93.8014233
beta	5	14.4096417	15.2870314	2.3017896	40.6533066
fm	5	9.8768606	1.5539458	8.4506177	11.5705061

----- gruppo= epi stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	8.4242899	4.5380772	4.0120642	15.1229983
teta	5	7.5593055	8.8248809	3.1466188	17.7322933
alfa	5	34.9838961	37.5589586	4.0379449	100.2599056
beta	5	14.4744244	16.9858653	2.2222953	44.1534304
fm	5	9.7959115	1.4858414	7.9880766	11.5764166

----- gruppo= epi stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	22.6736658	32.0907610	4.1295724	79.4934017
teta	5	9.7913572	6.8451917	2.1814988	17.9655611
alfa	5	35.9313748	34.5190776	3.8109079	94.9194094
beta	5	14.8223003	15.4108035	2.4202229	41.5901976
fm	5	9.7020188	1.5450336	7.9481722	11.4543857

----- gruppo= epi stage=basale -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	20.7821546	28.3595444	2.8666664	70.8758577
teta	5	9.2715748	5.7550911	2.0227574	15.4168286
alfa	5	30.5045369	28.1014648	2.9665946	77.7711628
beta	5	14.4233345	15.6763468	2.4434864	41.7023585
fm	5	9.6671293	1.5005743	7.6909889	11.7079513

-----

## Tabelle medie generali MNS

### Gruppo Sani

----- gruppo= sani stage=S1 -----  
 The MEANS Procedure

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	7.0175342	4.0345941	3.6985394	13.5912717
teta	5	2.9549662	1.5968303	1.3825128	4.6672592
alfa	5	18.1202173	16.5996666	4.6533321	42.3360692
beta	5	6.2115938	5.3908531	2.2466488	15.3466091
fm	5	9.8829702	1.7099361	8.2171797	12.7327356

----- gruppo=sani stage=S2 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	7.0626722	4.0394401	4.1164412	13.9547417
teta	5	2.8237833	1.4596444	1.3396368	4.4565029
alfa	5	18.4091866	15.1744389	4.5366859	37.7849949
beta	5	6.2820379	5.3903287	2.3089148	15.4239346
fm	5	9.8871954	1.7187585	8.2382980	12.6949667

----- gruppo=sani stage=S3 -----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	7.1013833	3.9300947	3.7362569	13.5619244
teta	5	2.9783159	1.7550873	1.3177616	4.9728978
alfa	5	19.3183201	16.8916070	5.2055829	43.0205736
beta	5	6.2303437	5.1390329	2.2585194	14.7868951
fm	5	9.8407303	1.5822777	8.2209341	12.3376813

----- gruppo=sani stage=basale-----

Variable	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
delta	5	7.8216896	5.3836749	4.2602991	17.1992944
teta	5	2.9884490	1.5159331	1.4988783	4.9557628
alfa	5	16.7879562	14.5534866	3.6642299	32.5304773
beta	5	5.7513606	3.8804389	2.3624822	11.6361316
fm	5	9.4359160	1.5039196	8.0842243	11.7610843

-----

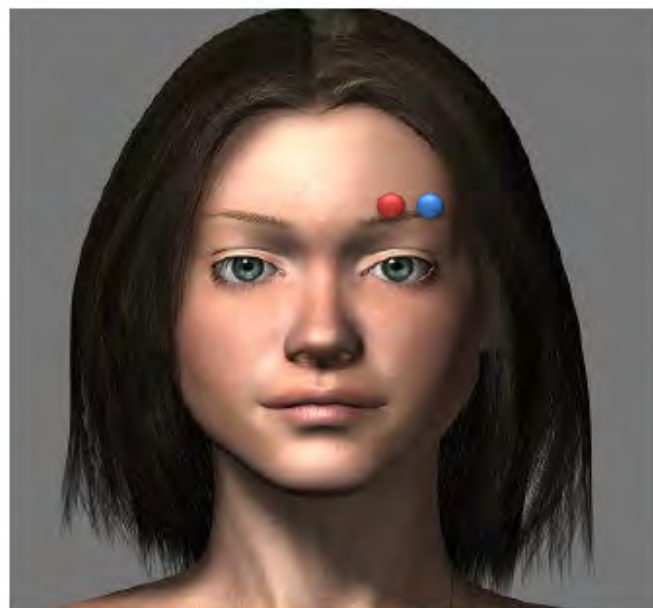


Figura 1: schema del posizionamento degli elettrodi in posizione infraorbitaria e sovraorbitaria.

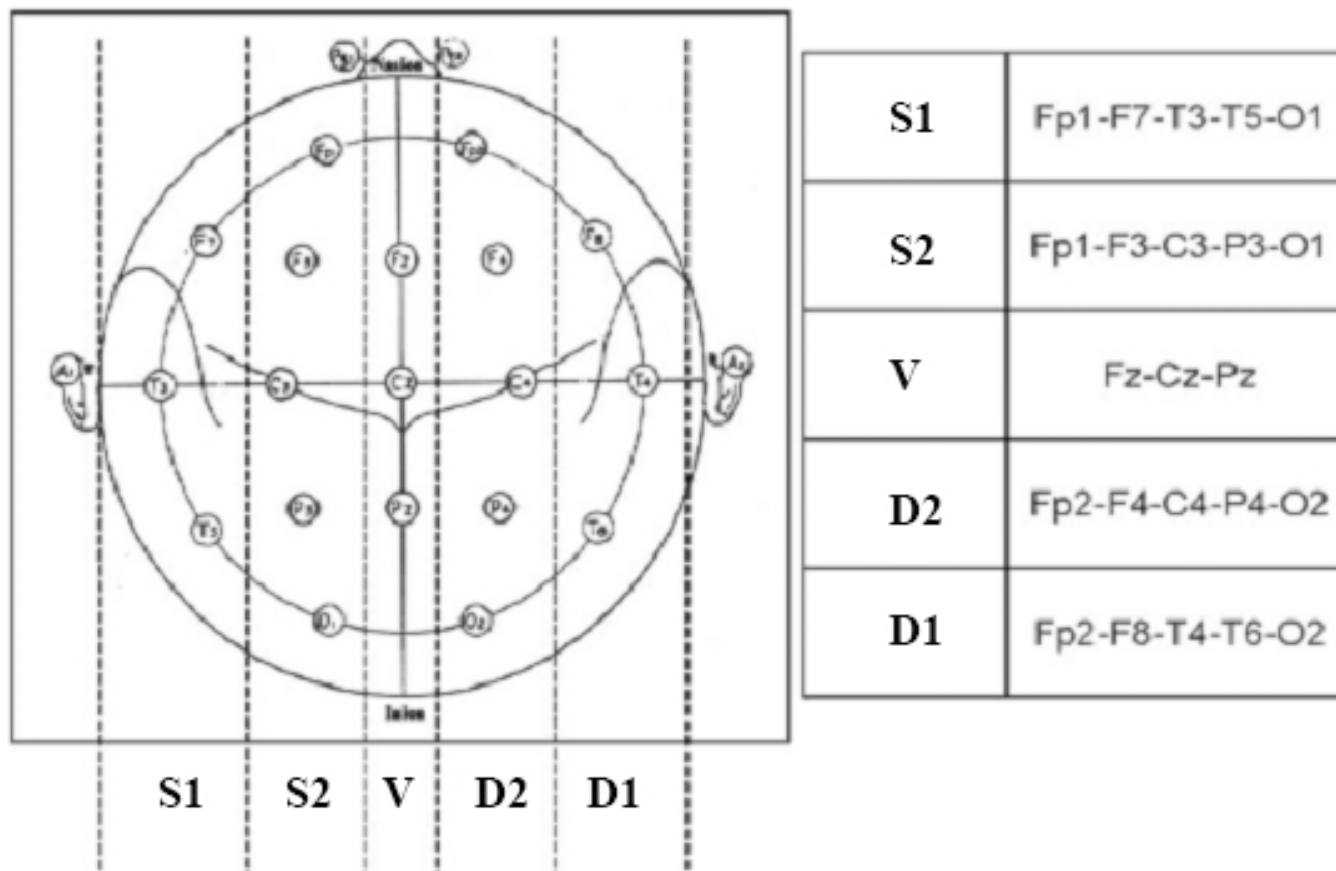


Figura 2. Montaggio degli elettrodi sullo scalpo secondo il sistema internazionale 10-20: S1 gruppo degli elettrodi soprasilviani di sinistra, S2 gruppo degli elettrodi parasagittali di sinistra, V gruppo degli elettrodi al vertice, D2 gruppo degli elettrodi parasagittali di destra, D1 gruppo degli elettrodi soprasilviani di destra.

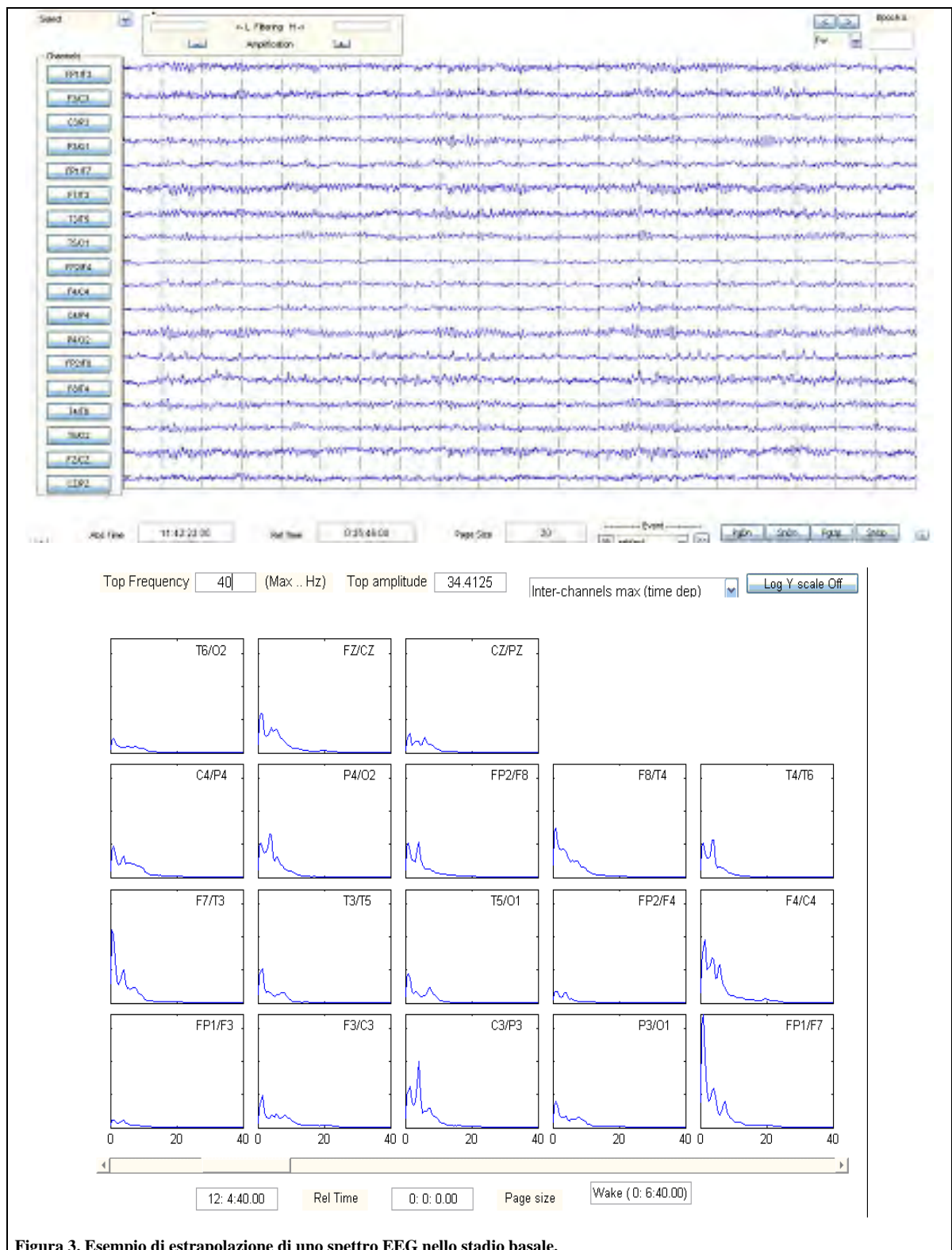


Figura 3. Esempio di estrapolazione di uno spettro EEG nello stadio basale.

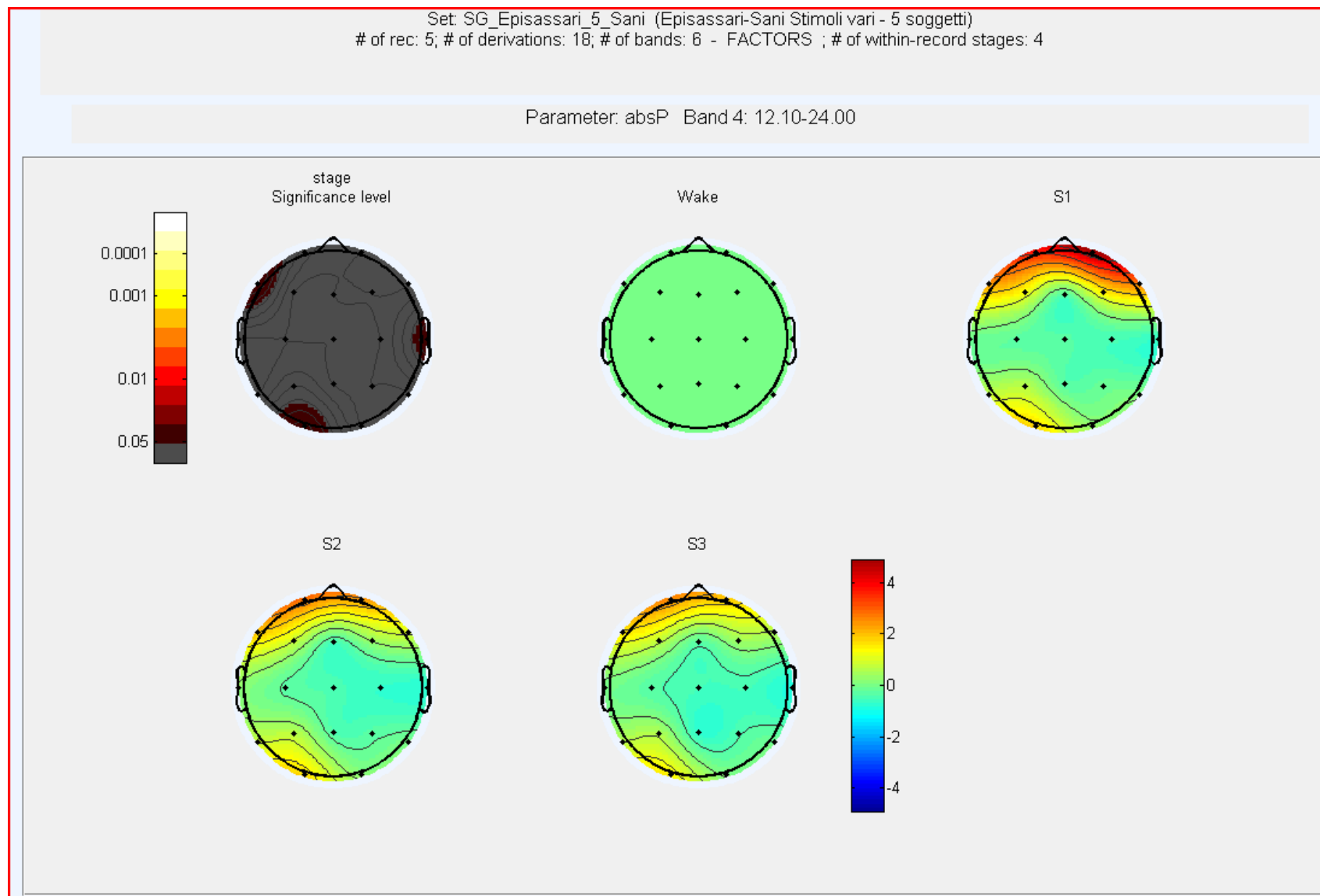


Figura 4. Mappe di frequenza nel gruppo dei sani: potenza assoluta della banda beta (12-24). Aumento lievemente significativo (in rosso) dopo stimolo (S1) rispetto al basale (in verde), prevalente sulle regioni frontali .

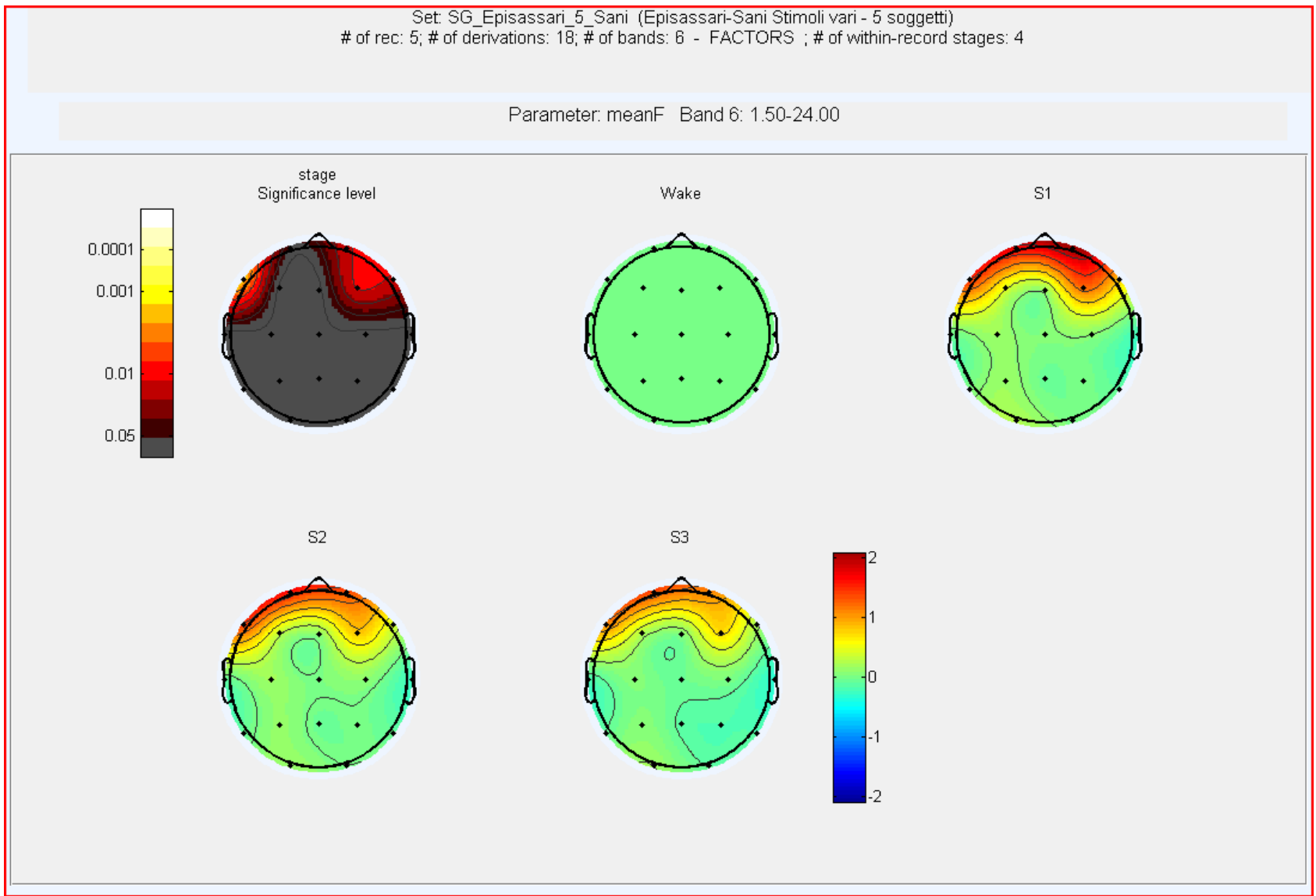


Figura 5. Frequenza media (banda 1.5-24) nel gruppo dei soggetti sani: aumento significativo (in rosso) dopo stimolo (S1) rispetto al basale (in verde), in corrispondenza delle regioni frontali.

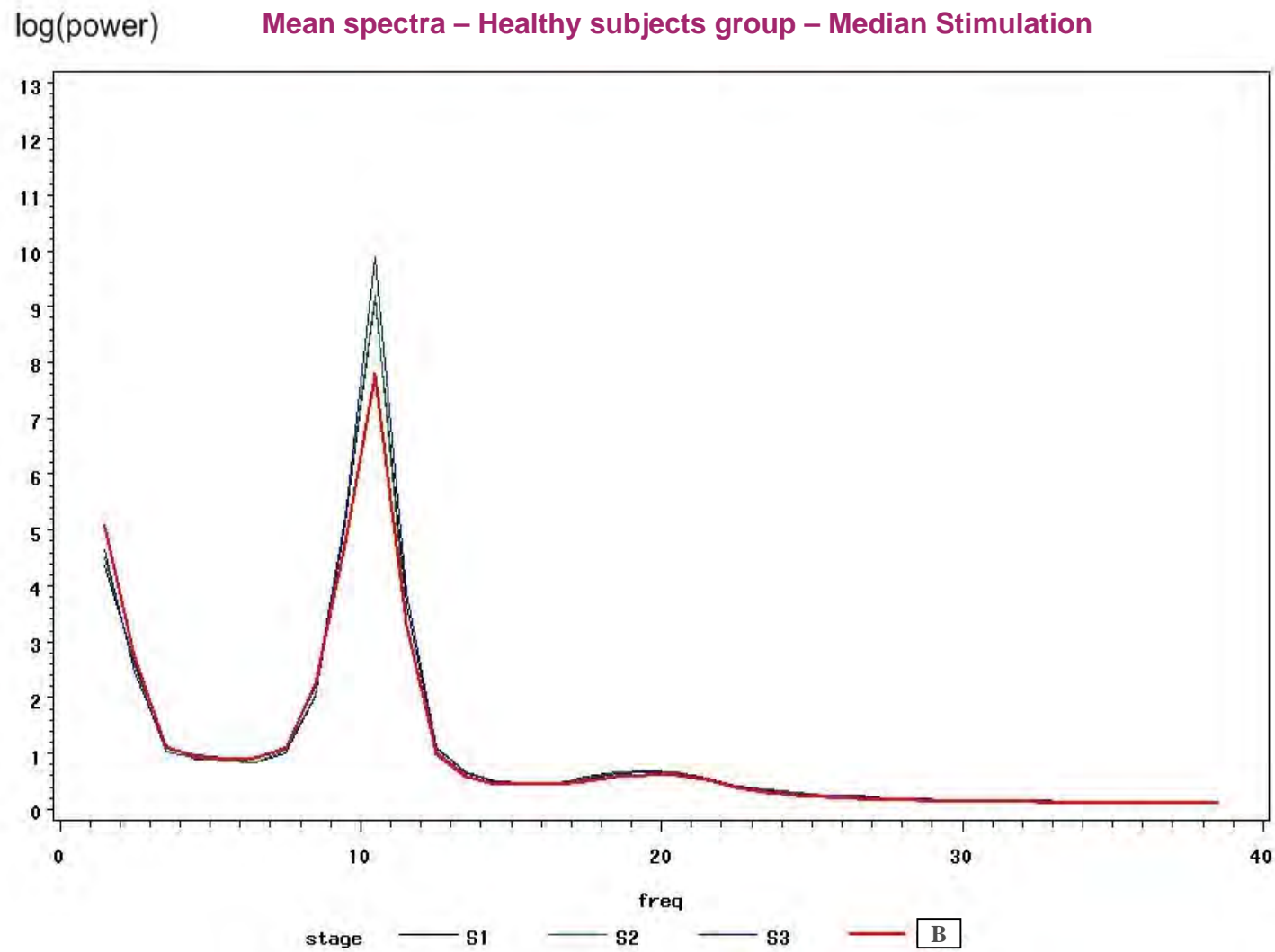


Figura 6. Stimolazione del nervo mediano nel gruppo dei sani: sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di potenza spettrale e sull'asse delle ascisse le varie frequenze EEG. Si osserva solo un rinforzo non significativo del ritmo di fondo senza interessamento delle altre bande.



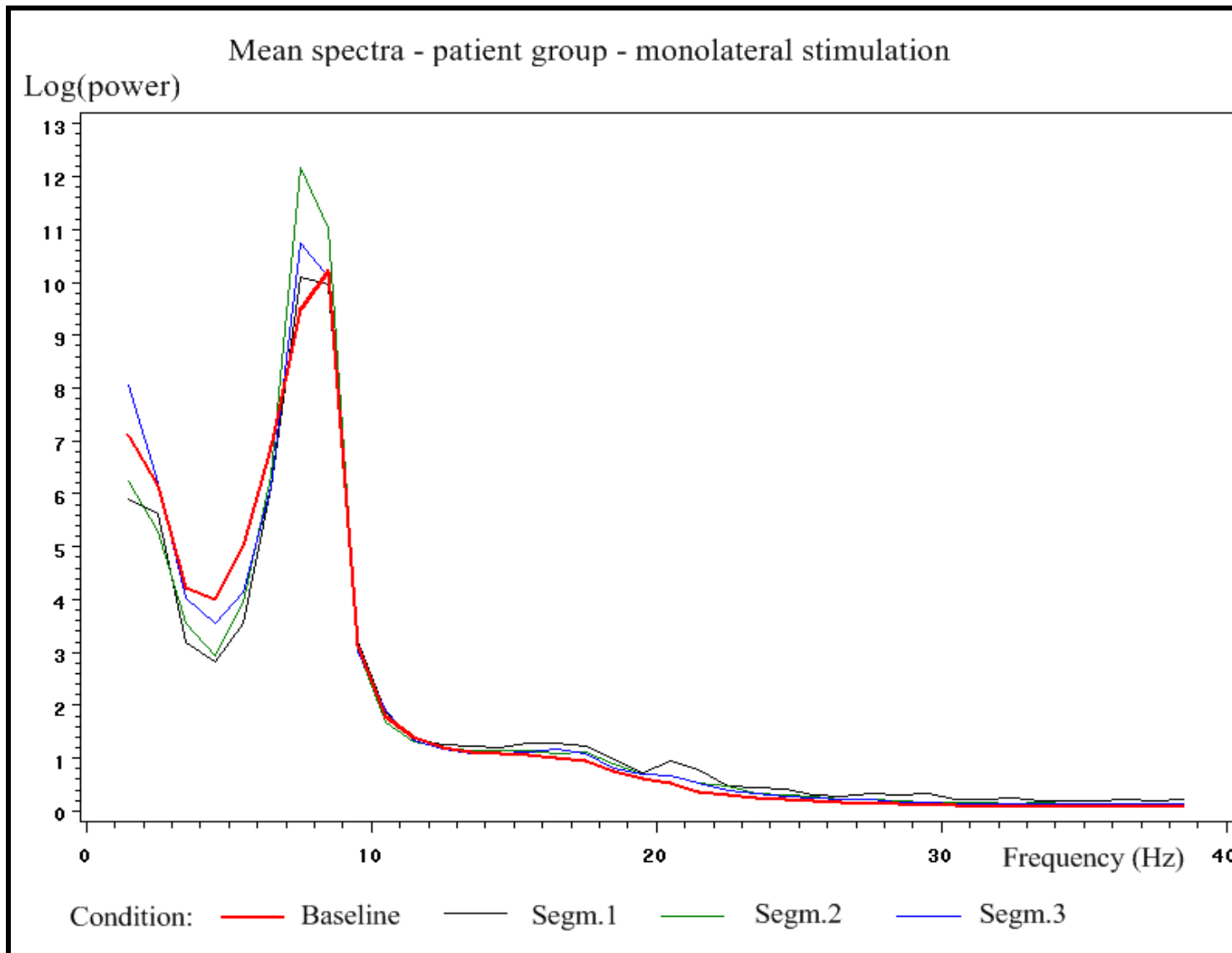


Figura 7. Potenza dello spettro medio nel gruppo dei pazienti dopo TNS monolaterale: sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di potenza spettrale e sull'asse delle ascisse le varie frequenze EEG. Ogni condizione è contrassegnata da un colore: in rosso la linea basale, in nero il segmento S1 (primi 10 secondi di time off), in verde S2 e in blu S3. Si osserva in coincidenza della banda teta un caduta di potenza nel post-stimolo rispetto al basale e un suo rinforzo spostandoci verso le frequenze più rapide.

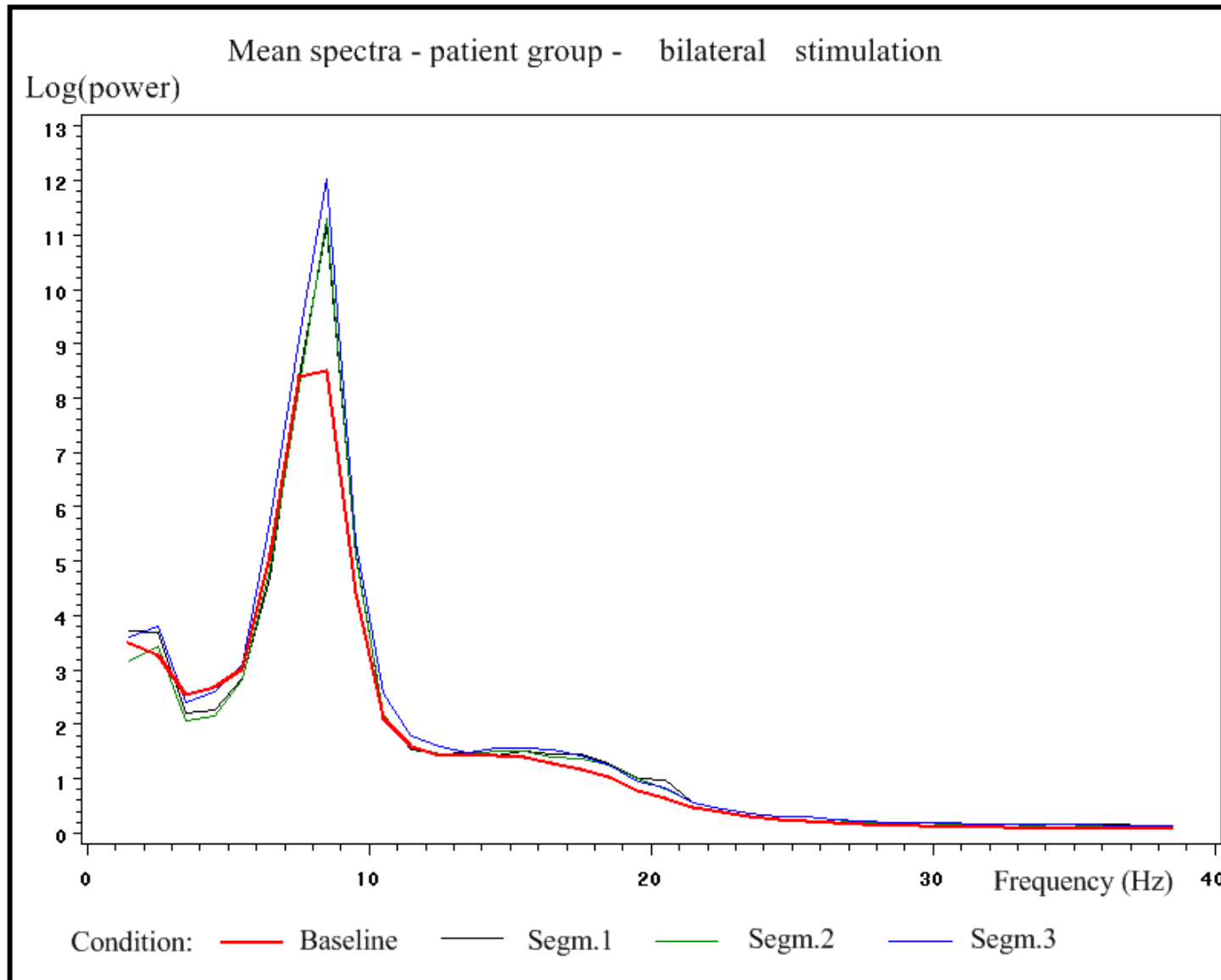


Figura 8. Potenza dello spettro medio nel gruppo dei pazienti dopo TNS bilaterale: sull'asse delle ordinate sono indicati i valori di potenza e sulle ascisse i vari ritmi EEG. Si osserva nel post stimolo (S1-S2-S3), rispetto alla condizione basale (linea rossa), una riduzione della potenza spettrale nella zona del teta, un rinforzo del ritmo di fondo, e una risalita spostandoci verso le alte frequenze.

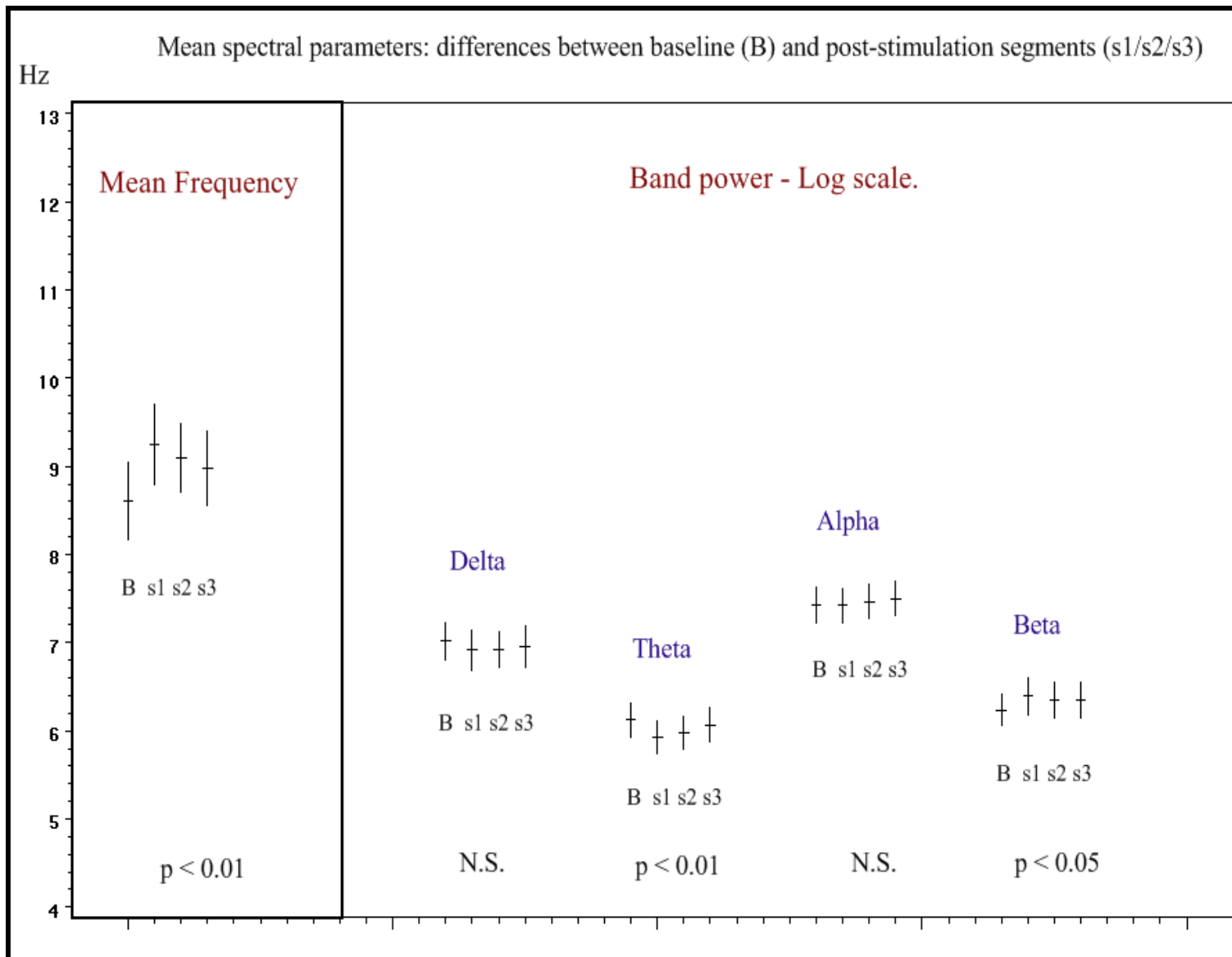
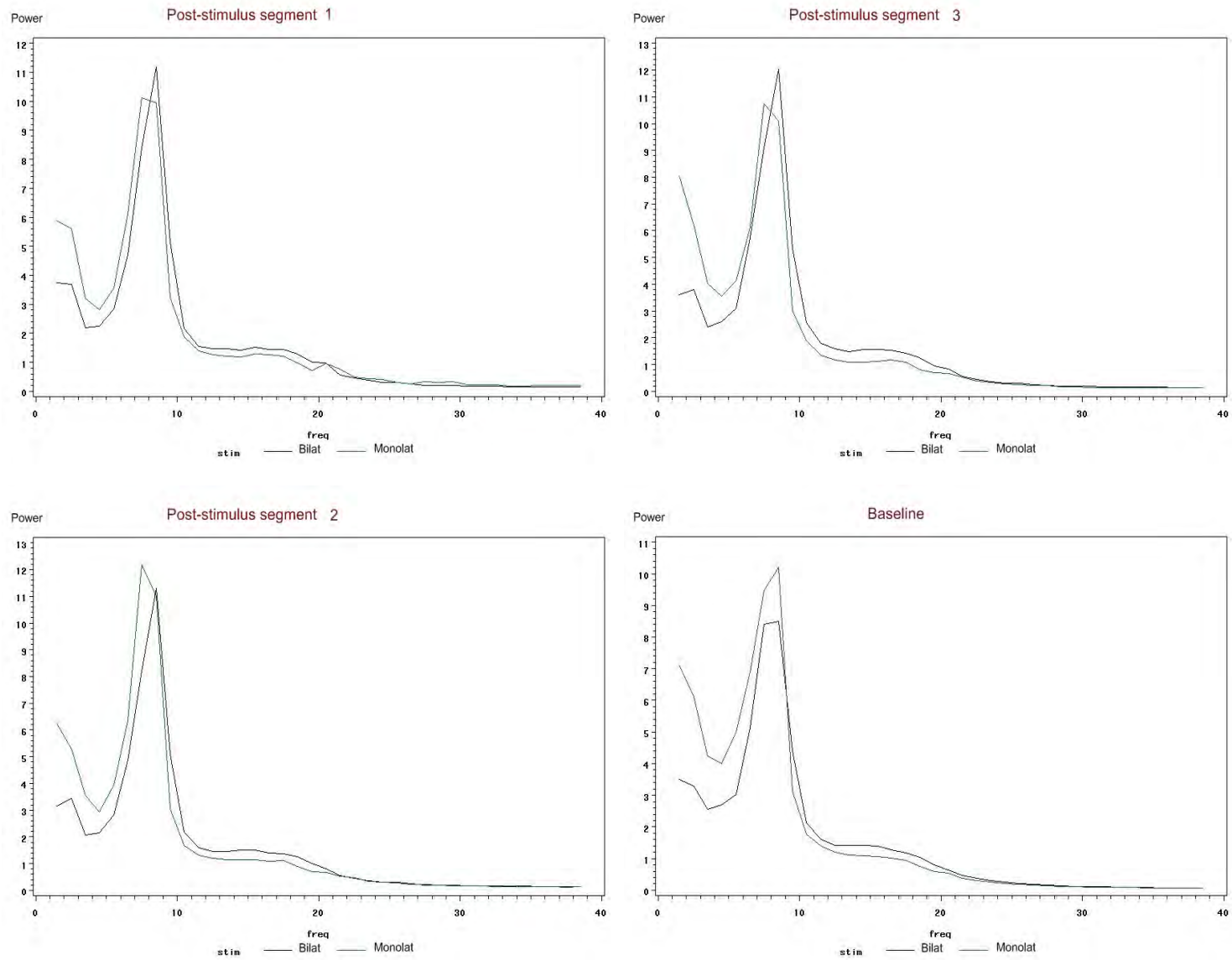


Figura 9. Gruppo dei pazienti con EPFR: valori medi con rispettivi errori standard della frequenza media (prima colonna del grafico) e della potenza assoluta delle bande (seconda colonna) nel basale e in S1-S2-S3 ossia a 10-20-30 sec di post-stimolo. In S1 aumento della frequenza media ( $p < 0.01$ ) e della potenza del beta ( $p < 0.05$ ) e riduzione della potenza del teta ( $p < 0.01$ ).



**Figura 10. Confronto tra gli spettri medi in corso di stimolazione monolaterale (linea verde ) e bilaterale (linea nera) nelle varie condizioni (segmento S1-S2-S3 di post-stimolo e basale). Nel post stimolo bilaterale potenziamento della risposta rispetto al monolaterale. Anche tra i basali c'è differenza con interessamento relativo a tutte le frequenze.**

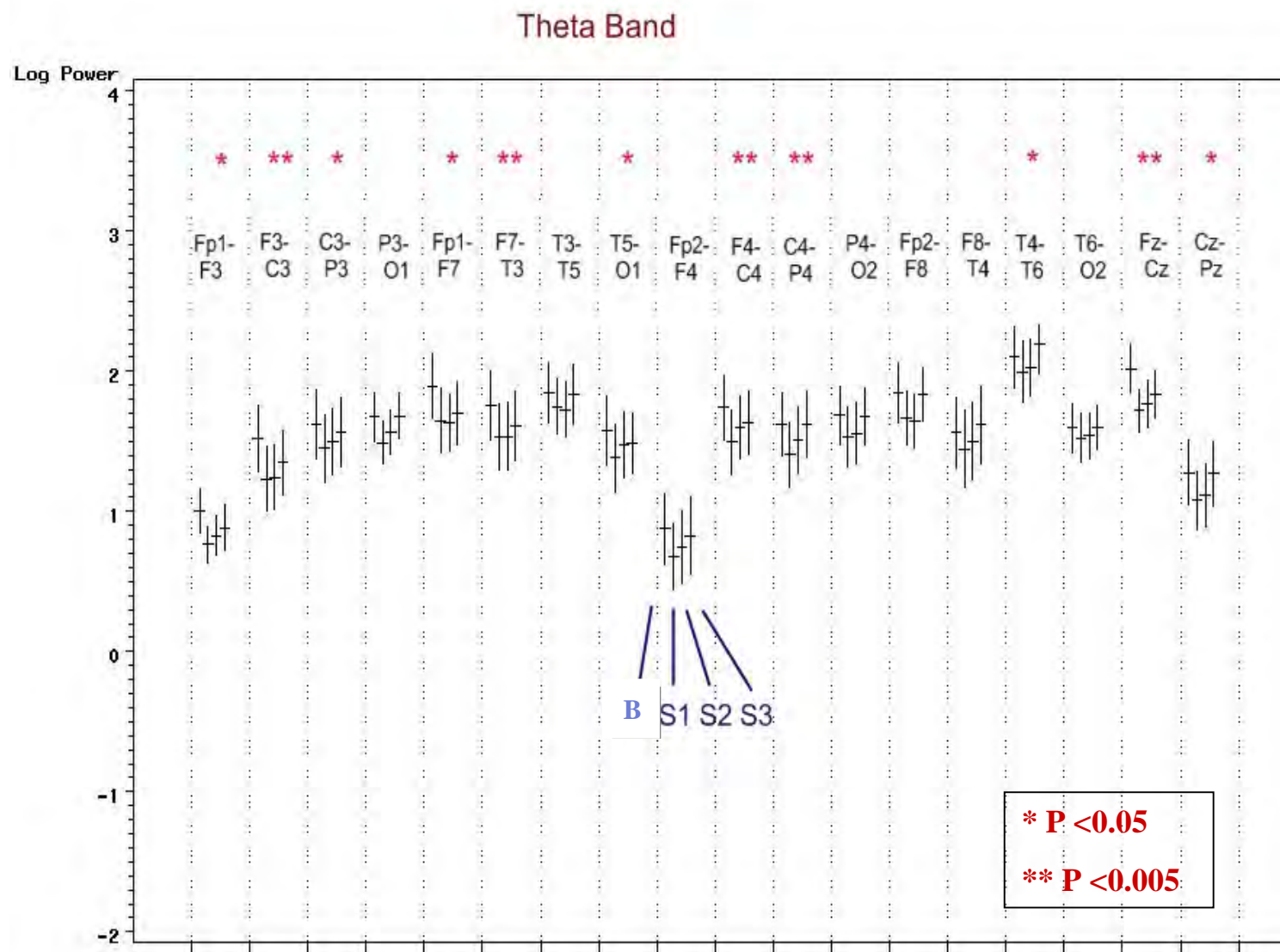


Figura 11. Analisi della distribuzione spaziale dei valori medi e rispettivi errori standard della potenza assoluta della banda teta dopo elaborazione logaritmica, articolati per ciascuna derivazione bipolare, nelle varie condizioni (B: basale, S1-S2-S3: a 10-20-30 sec di post-stimolo). Contrassegnate le maggiori significatività sulle derivazioni fronto-centrali e fronto-temporali, dove si ha una prevalenza delle focalità epilettogene del campione dei pazienti analizzati.

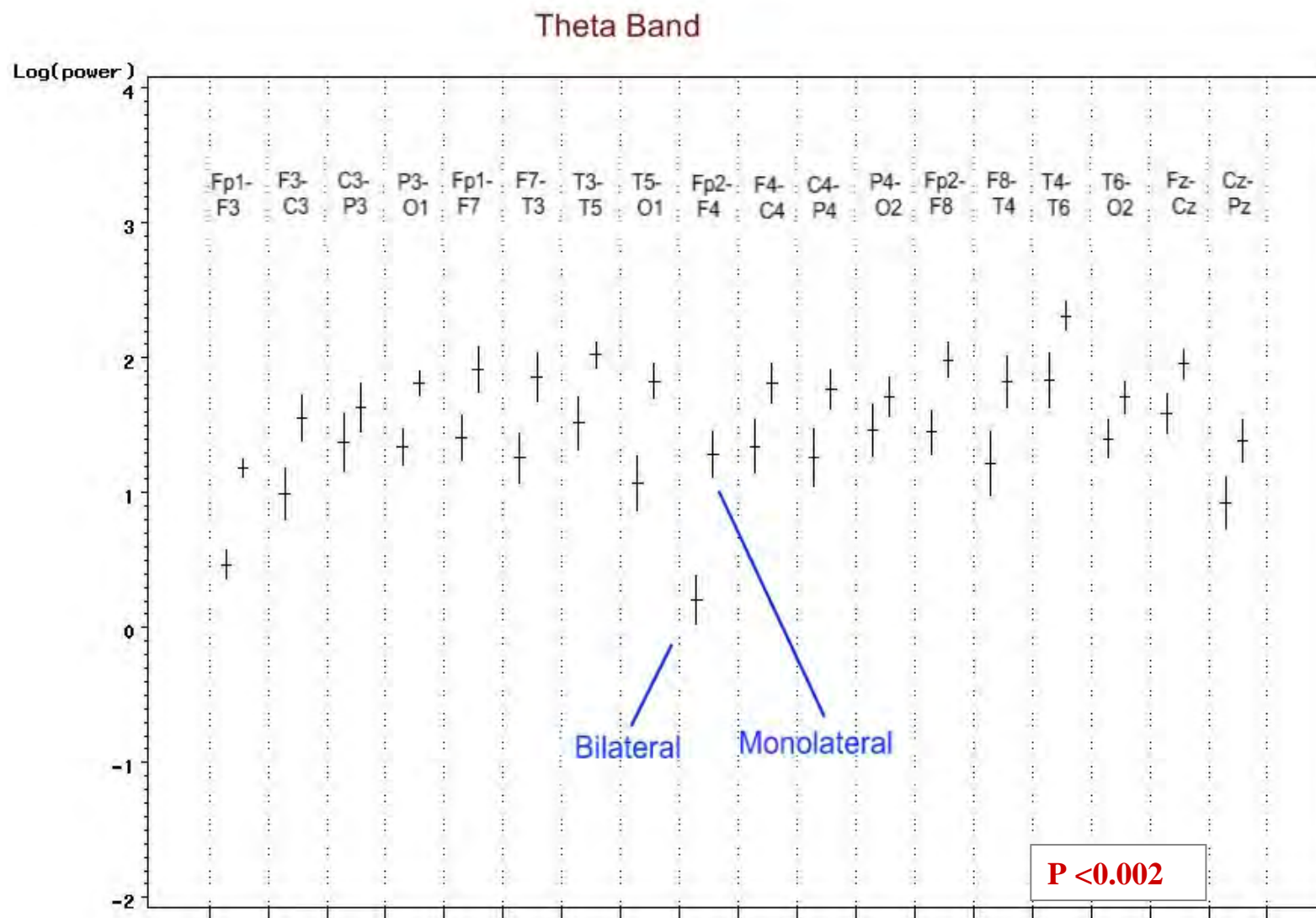


Figura 12: Interazioni tra lateralità dello stimolo e regioni relativamente alla potenza della banda teta. Rinforzo delle significatività in sede fronto-centrale e fronto-temporale.

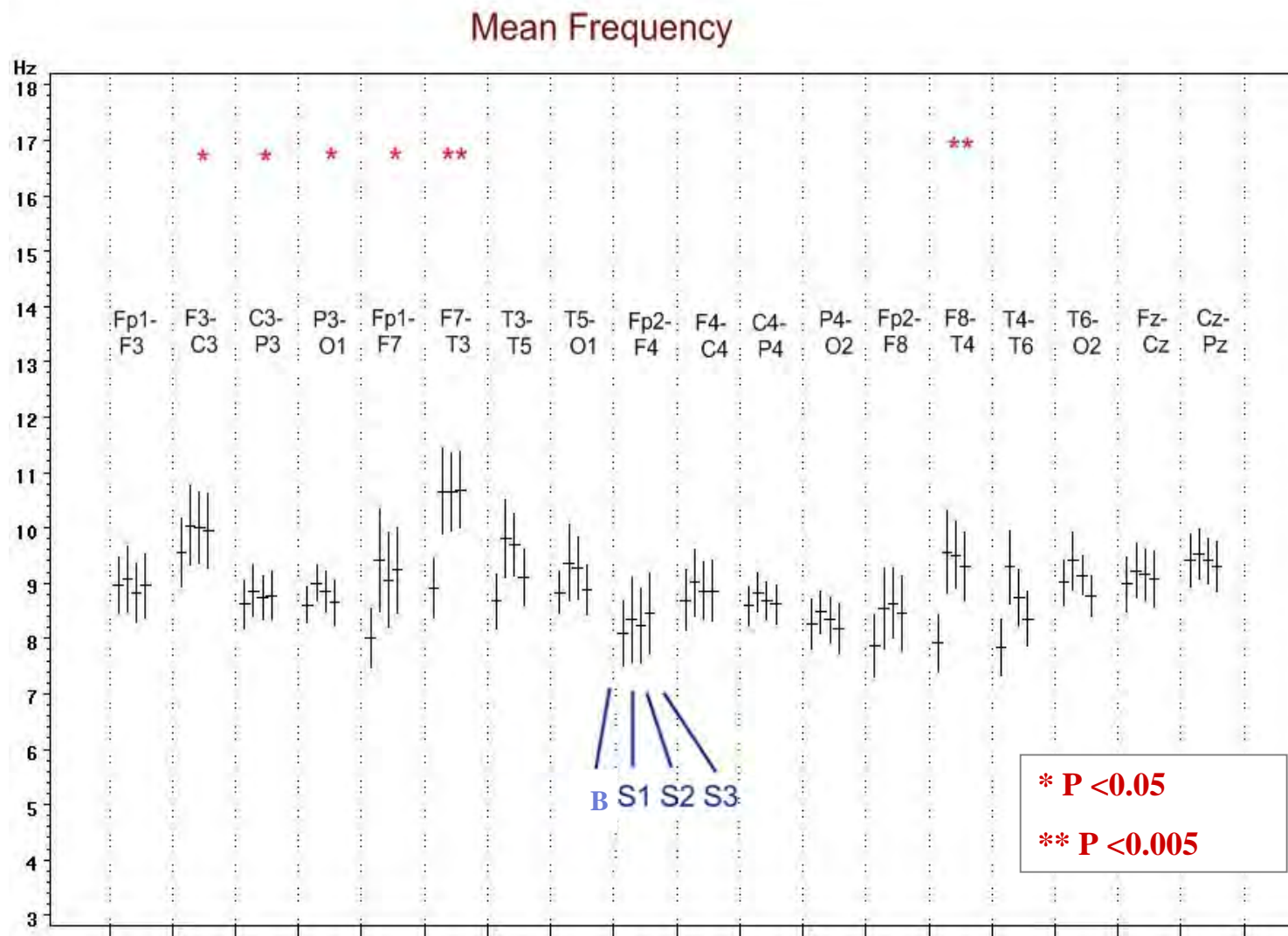


Figura 13. Analisi della distribuzione spaziale dei valori medi e rispettivi errori standard della Frequenza media articolata per ciascuna derivazione bipolare, nelle varie condizioni (B: basale, S1-S2-S3: a 10-20-30 sec di post-stimolo). Contrassegnate le maggiori significatività sulle derivazioni fronto-temporali, dove si ha una prevalenza delle focalità epilettogene del campione dei pazienti analizzati. Significatività su tutto l'ambito emisferico sinistro come da asimmetria di risposta.

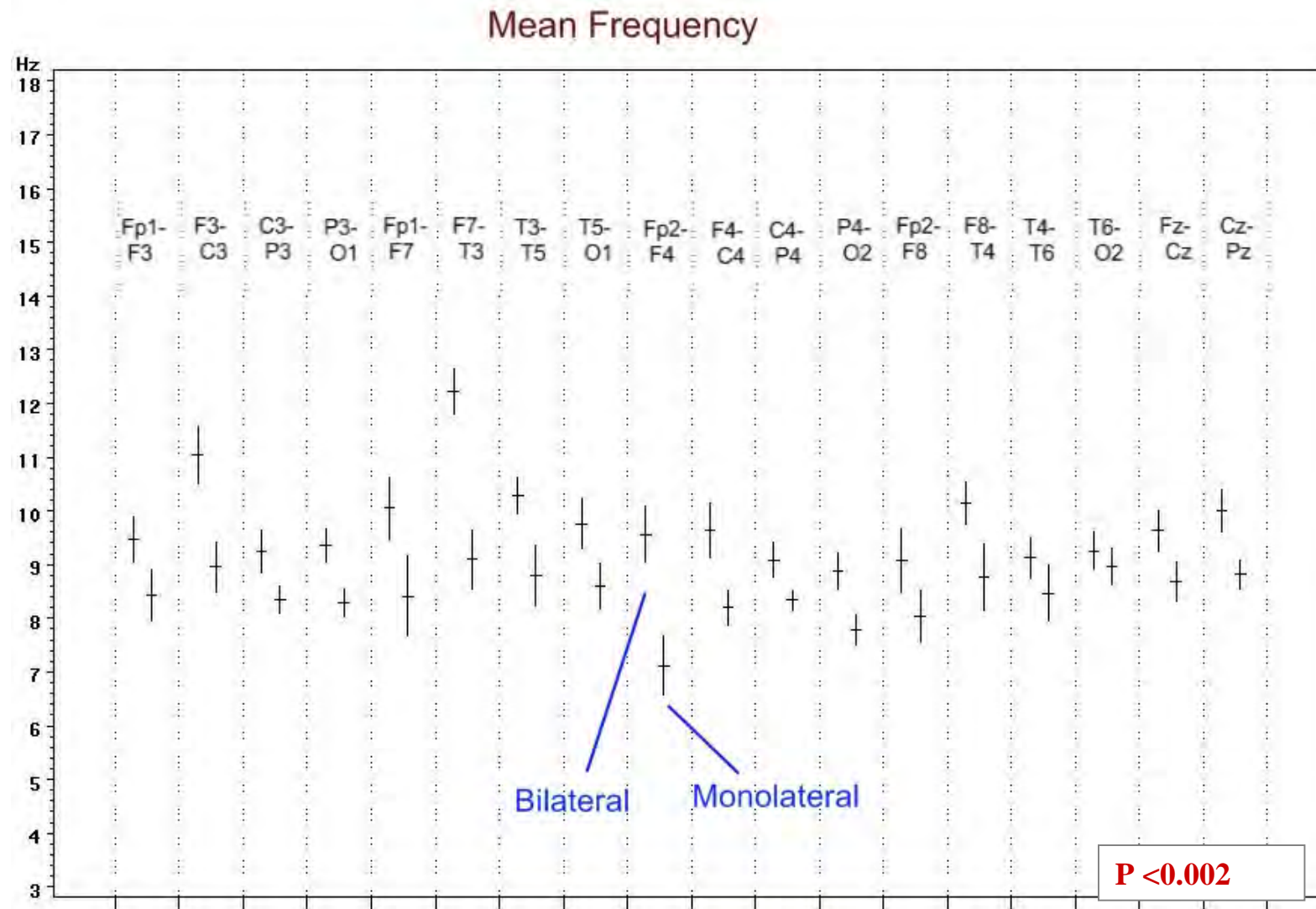


Figura 14. Interazioni tra lateralità dello stimolo e regioni relativamente alla Frequenza media. Rinforzo delle significatività in sede fronto-centrale e fronto-temporale, più marcate a sinistra.



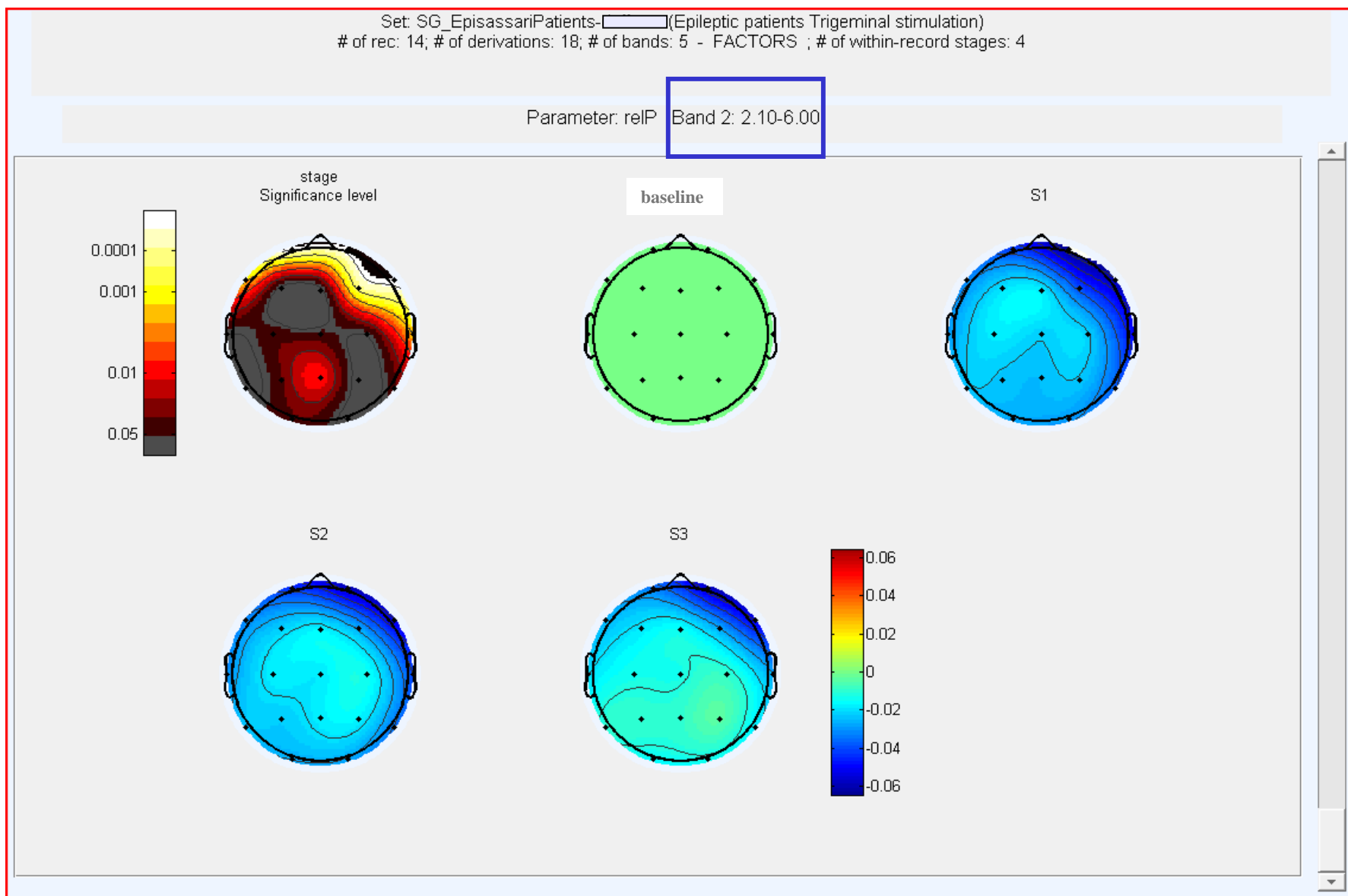


Figura 15. Mappe di potenza relativa della banda teta nel gruppo dei pazienti con EPFR: in alto a sinistra la distribuzione delle significatività statistiche nominali., fatte indipendentemente per ogni canale. Le successive mappe rappresentano le variazioni rispetto alla base. Si può osservare la diminuzione del lento massima sul segmento 1 (primi 10 sec post stimolo) ed una lieve ripresa nei segmenti successivi. Le significatività sono più fronto-temporali.

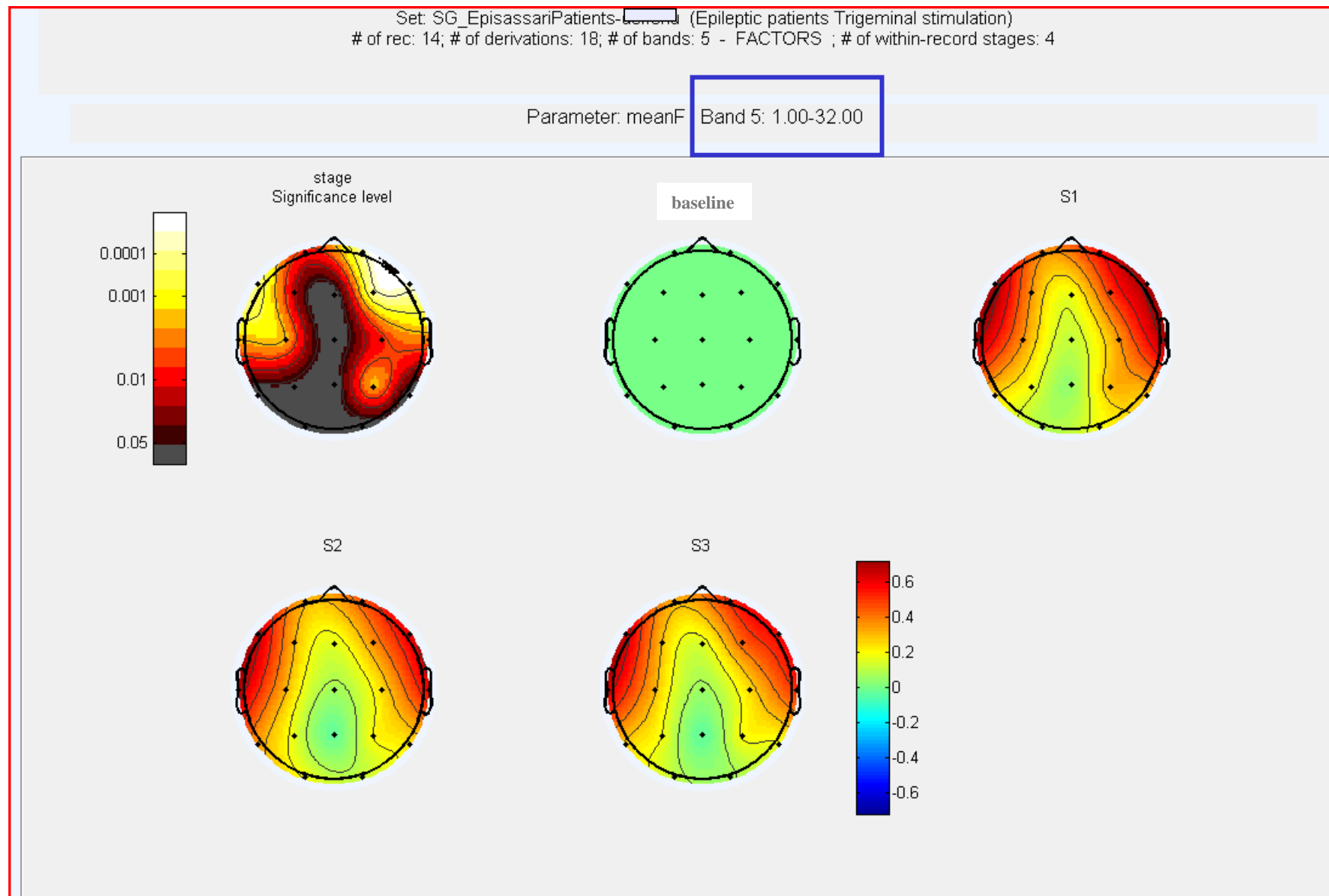


Figura 16. Mappe topografiche spettrali della Frequenza media nel gruppo dei pazienti con EPFR: In alto a sinistra la distribuzione delle significatività statistiche nominali. Le successive mappe rappresentano le variazioni rispetto alla base. Si può osservare l'incremento massimo della frequenza media sul segmento 1 (primi 10 sec post stimolo) ed una lieve attenuazione nei segmenti successivi. Le significatività sono più fronto-temporali.

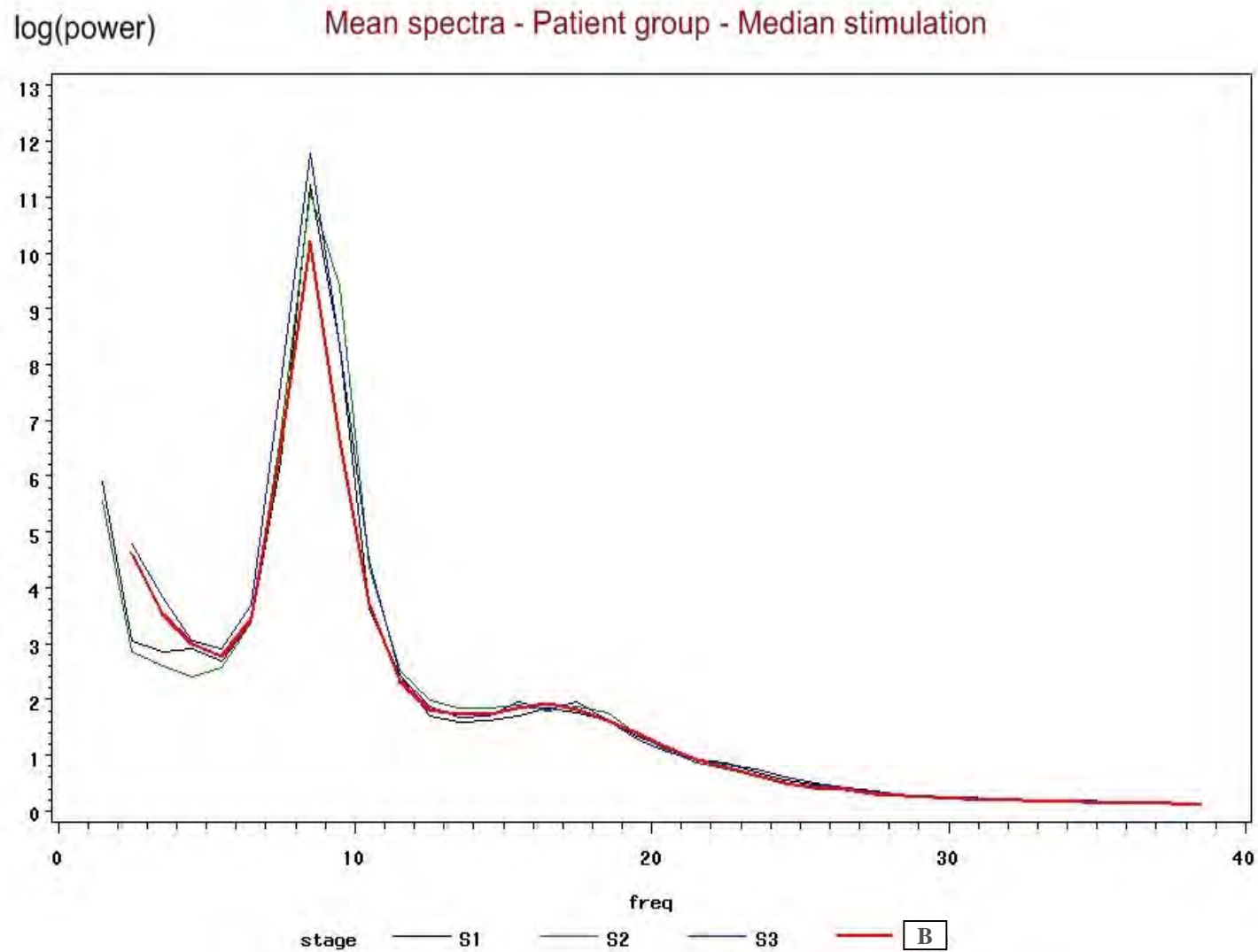


Figura 17. Stimolazione del nervo mediano nel gruppo dei pazienti con EPFR: sull'asse delle ordinate sono indicati i valori di potenza e sulle ascisse i vari ritmi EEG. Si osserva, analogamente alla TNS, nel post stimolo S1-S2 una riduzione dello spettro nella zona del delta e teta rispetto alla condizione basale in rosso, un rinforzo del ritmo di fondo, e una risalita spostandoci verso le alte frequenze, tutti non significativi.

## Bibliografia

1. Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CM, et al. Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier. *Novartis Found Symp* 2002;243:38-47.
2. Abbott NJ, Khan EU, Rollinson CM, et al. Drug resistance in epilepsy: the role of the blood-brain barrier. *Novartis Found Symp* 2002;243:38-47.
3. Akerman S, Goadsby PJ. The role of dopamine in a model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Jul;314:162-169.
4. Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, et al. Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience* 2003;118:417-429.
5. Aronica E, Gorter JA, van Vliet EA, et al. Overexpression of the human major vault protein in gangliogliomas. *Epilepsia* 2003 Sep;44:1166-1175.
6. Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol* 2003 Jan;2:33-42.
7. Avoli M, Williamson A. Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Prog Neurobiol* 1996 Apr;48:519-554.
8. Baraban JM, Aghajanian GK. Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* 1980 Apr;19:355-363.

9. 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 <sup>99m</sup>Tc-HMPAO SPET brain images. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003 Feb;30:301-305.
10. 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 <sup>99m</sup>Tc-HMPAO SPET brain images. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003 Feb;30:301-305.
11. Ben-Menachem E, Hamberger A, Hedner T, et al. Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. *Epilepsy Res* 1995 Mar;20:221-227.
12. 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* 1994 May;35:616-626.
13. 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* 1994 May;35:616-626.
14. 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* 1994 May;35:616-626.

15. BLUM B, MAGNES J, BENTAL E, LIBAN E. Electroencephalographic studies in cats with experimentally produced hippocampal epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1961 Jun;13:340-353.
16. Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002 Apr;12:199-211.
17. 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* 2001 Aug;36:470-479.
18. Bohotin C, Scholsem M, Multon S, Martin D, Bohotin V, Schoenen J. Vagus nerve stimulation in awake rats reduces formalin-induced nociceptive behaviour and fos-immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis. *Pain* 2003 Jan;101:3-12.
19. Bossut DF, Maixner W. Effects of cardiac vagal afferent electrostimulation on the responses of trigeminal and trigeminothalamic neurons to noxious orofacial stimulation. *Pain* 1996 Apr;65:101-109.
20. Browning RA, Wang C, Faingold CL. Effect of norepinephrine depletion on audiogenic-like seizures elicited by microinfusion of an excitant amino acid into the inferior colliculus of normal rats. *Exp Neurol* 1991 May;112:200-205.
21. P. Calabresi , C. Rossi , F. Coppola , P. Sarchielli, Il valproato nella terapia del dolore e dell'emicrania *Neurol Sci* (2006) 27:XXXVII Congresso SIN Supplement
22. Calabresi P, Galletti F, Rossi C, Sarchielli P, Cupini LM. Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 2007 Apr;28:188-195.

23. Camfield PR, Camfield CS. Antiepileptic drug therapy: when is epilepsy truly intractable? *Epilepsia* 1996;37 Suppl 1:S60-S65.
24. Caous CA, de Sousa BH, Lindsey CJ. Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory functions. *Auton Neurosci* 2001 Dec 10;94:14-24.
25. Carius A, Schulze-Bonhage A. Trigeminal pain under vagus nerve stimulation. *Pain* 2005 Nov;118:271-273.
26. Carpenter LL, Moreno FA, Kling MA, et al. Effect of vagus nerve stimulation on cerebrospinal fluid monoamine metabolites, norepinephrine, and gamma-aminobutyric acid concentrations in depressed patients. *Biol Psychiatry* 2004 Sep 15;56:418-426.
27. Cascino GD. Intractable partial epilepsy: evaluation and treatment. *Mayo Clin Proc* 1990 Dec;65:1578-1586.
28. Castle M, Comoli E, Loewy AD. Autonomic brainstem nuclei are linked to the hippocampus. *Neuroscience* 2005;134:657-669.
29. 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* 2002 Apr;30:108-111.
30. Chase MH, Nakamura Y, Clemente CD, Serman MB. Afferent vagal stimulation: neurographic correlates of induced EEG synchronization and desynchronization. *Brain Res* 1967 Jun;5:236-249.

31. Copp AJ, Harding BN. Neuronal migration disorders in humans and in mouse models--an overview. *Epilepsy Res* 1999 Sep;36:133-141.
32. Crabbe JB, Dishman RK. Brain electrocortical activity during and after exercise: a quantitative synthesis. *Psychophysiology* 2004 Jul;41:563-574.
33. Cruccu, G., Berardelli, A., Inghilleri, M., Manfredi, 1990. Corticobulbar projections to upper and lower facial motoneurons. A study by transcranial magnetic stimulation in man. *Neurosci. Lett.* 117, 68–73.
34. Cunningham JT, Mifflin SW, Gould GG, Frazer A. Induction of c-Fos and DeltaFosB immunoreactivity in rat brain by Vagal nerve stimulation. *Neuropsychopharmacology* 2008 Jul;33:1884-1895.
35. De Curtis M, Meccanismi di farmacoresistenza, *Neurol Sci* (2005) 26:51-54.
36. De LR, Davis CE, Albuquerque R, Carlson CR, Andersen AH. Brain activity during stimulation of the trigeminal nerve with noxious heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006 Dec;102:750-757.
37. DeGiorgio CM, Murray D, Markovic D, Whitehurst T. Trigeminal nerve stimulation for epilepsy: long-term feasibility and efficacy. *Neurology* 2009 Mar 10;72:936-938.
38. DeGiorgio CM, Shewmon A, Murray D, Whitehurst T. Pilot study of trigeminal nerve stimulation (TNS) for epilepsy: a proof-of-concept trial. *Epilepsia* 2006 Jul;47:1213-1215.
39. DeGiorgio CM, Shewmon DA, Whitehurst T. Trigeminal nerve stimulation for epilepsy. *Neurology* 2003 Aug 12;61:421-422.



40. Dirkwinkel M, Gralow I, Colak-Ekici R, Wolowski A, Marziniak M, Evers S. The influence of repetitive painful stimulation on peripheral and trigeminal pain thresholds. *J Neurol Sci* 2008 Oct 15;273:108-111.
41. Dorr AE, Debonnel G. Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Aug;318:890-898.
42. Dudek FE, Staley KJ, Sutula TP. The search for animal models of epileptogenesis and pharmacoresistance: are there biologic barriers to simple validation strategies? *Epilepsia* 2002 Nov;43:1275-1277.
43. Elger CE. Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia* 2003;44 Suppl 5:9-15.
44. Engel J, Jr. Epilepsy surgery. *Curr Opin Neurol* 1994 Apr;7:140-147.
45. Engel J, Jr. Finally, a randomized, controlled trial of epilepsy surgery. *N Engl J Med* 2001 Aug 2;345:365-367.
46. Engel J, Jr. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 6:3.
47. Engel J, Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1996 Dec;26:141-150.
48. FALCONER MA, SERAFETINIDES EA, CORSELLIS JA. ETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY. *Arch Neurol* 1964 Mar;10:233-248.
49. Fanselow EE, Reid AP, Nicoletis MA. Reduction of pentylentetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J Neurosci* 2000 Nov 1;20:8160-8168.

50. Fanselow EE, Reid AP, Nicoletis MA. Reduction of pentylentetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J Neurosci* 2000 Nov 1;20:8160-8168.
51. 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* 1999 Sep 11;53:666-669.
52. 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* 2007 Nov 7;1179:28-34.
53. Francione S, Vigliano P, Tassi L, et al. Surgery for drug resistant partial epilepsy in children with focal cortical dysplasia: anatomical-clinical correlations and neurophysiological data in 10 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 Nov;74:1493-1501.
54. Fromm GH, Aumentado D, Terrence CF. A clinical and experimental investigation of the effects of tizanidine in trigeminal neuralgia. *Pain* 1993 Jun;53:265-271.
55. Gatti G, Perucca E. Challenges in the pharmacotherapy of the epilepsies. *Expert Rev Neurother* 2002 Jul;2:439-442.
56. 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* 2004 Sep;28:507-524.
57. Goadsby PJ, Cohen AS. [Pathophysiology and treatment of trigeminal autonomic cephalalgias]. *Schmerz* 2008 Feb;22 Suppl 1:7-10.

58. Goodridge DM, Shorvon SD. Epileptic seizures in a population of 6000. I: Demography, diagnosis and classification, and role of the hospital services. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983 Sep 3;287:641-644.
59. Hammond EJ, Uthman BM, Reid SA, Wilder BJ. Electrophysiologic studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: II. Evoked potentials. *Epilepsia* 1992 Nov;33:1021-1028.
60. Hammond EJ, Uthman BM, Reid SA, Wilder BJ. Electrophysiological studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: I. EEG effects. *Epilepsia* 1992 Nov;33:1013-1020.
61. Handforth A, DeGiorgio CM, Schachter SC, et al. Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology* 1998 Jul;51:48-55.
62. Hauser WA. The natural history of drug resistant epilepsy: epidemiologic considerations. *Epilepsy Res Suppl* 1992;5:25-28.
63. 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* 2004 Sep;45:1064-1070.
64. 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* 1998 Sep;39:983-990.
65. Henry TR, Votaw JR, Pennell PB, et al. Acute blood flow changes and efficacy of vagus nerve stimulation in partial epilepsy. *Neurology* 1999 Apr 12;52:1166-1173.

66. Iannetti GD, Porro CA, Pantano P, Romanelli PL, Galeotti F, Cruccu G.  
Representation of different trigeminal divisions within the primary and secondary human somatosensory cortex. *Neuroimage* 2003 Jul;19:906-912.
67. Jensen TS. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. *Eur J Pain* 2002;6 Suppl A:61-68.
68. Jones DM, Esmacil N, Maren S, Macdonald RL. Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Res* 2002 Aug;50:301-312.
69. Kalia M, Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 1982 Nov 1;211:248-265.
70. Kohling R. Voltage-gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia* 2002 Nov;43:1278-1295.
71. Kohling R. Voltage-gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia* 2002 Nov;43:1278-1295.
72. Koo B. EEG changes with vagus nerve stimulation. *J Clin Neurophysiol* 2001 Sep;18:434-441.
73. Kosel M, Schlaepfer TE. Beyond the treatment of epilepsy: new applications of vagus nerve stimulation in psychiatry. *CNS Spectr* 2003 Jul;8:515-521.
74. Krahl SE, Clark KB, Smith DC, Browning RA. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1998 Jul;39:709-714.

75. Krahl SE, Clark KB, Smith DC, Browning RA. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1998 Jul;39:709-714.
76. Krahl SE, Senanayake SS, Handforth A. Seizure suppression by systemic epinephrine is mediated by the vagus nerve. *Epilepsy Res* 2000 Feb;38:171-175.
77. Kryzhanovskii GN, Reshetniak VK, Dolgikh VG, Gorizontova MP, Speranskaia TV. [Trigeminal neuralgia of neuropathic origin]. *Biull Eksp Biol Med* 1991 Aug;112:120-122.
78. Kryzhanovskii GN, Reshetniak VK, Igon'kina SI, Zinkevich VA. [Epileptiform activity in the somatosensory cortex of rats with trigeminal neuralgia]. *Biull Eksp Biol Med* 1992 Jul;114:126-128.
79. Kuba R, Guzaninova M, Brazdil M, Novak Z, Chrastina J, Rektor I. Effect of vagal nerve stimulation on interictal epileptiform discharges: a scalp EEG study. *Epilepsia* 2002 Oct;43:1181-1188.
80. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000 Feb 3;342:314-319.
81. Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005 Feb;46:224-235.
82. Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005 Feb;46:224-235.
83. Labar D. Effects of Vagal Nerve Stimulation on Cognition and Quality of Life. To the Editor. *Epilepsy Behav* 2001 Apr;2:161-162.

84. Labar D. Effects of Vagal Nerve Stimulation on Cognition and Quality of Life. To the Editor. *Epilepsy Behav* 2001 Apr;2:161-162.
85. Lenaerts ME. Update on the therapy of the trigeminal autonomic cephalalgias. *Curr Treat Options Neurol* 2008 Jan;10:30-35.
86. Loscher W. Animal models of drug-resistant epilepsy. *Novartis Found Symp* 2002;243:149-159.
87. Loscher W. Animal models of drug-resistant epilepsy. *Novartis Found Symp* 2002;243:149-159.
88. Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2002 Jun;50:105-123.
89. Loscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2002 Mar;23:113-118.
90. Magnes J, Allweis C, Abeles M. The metabolism of the perfused cat brain during EEG synchronization and arousal. *J Neurochem* 1967 Sep;14:859-871.
91. Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P. Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation. *J Psychiatry Neurosci* 2009 Jul;34:272-280.
92. Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P. Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation. *J Psychiatry Neurosci* 2009 Jul;34:272-280.

93. 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* 2005 Sep;116:2026-2036.
94. 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* 2003 Jun;55:59-70.
95. McLachlan RS. Suppression of interictal spikes and seizures by stimulation of the vagus nerve. *Epilepsia* 1993 Sep;34:918-923.
96. McLachlan RS. Vagus nerve stimulation for intractable epilepsy: a review. *J Clin Neurophysiol* 1997 Sep;14:358-368.
97. McLachlan RS. Vagus nerve stimulation for intractable epilepsy: a review. *J Clin Neurophysiol* 1997 Sep;14:358-368.
98. Menetrey D, Basbaum AI. Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *J Comp Neurol* 1987 Jan 15;255:439-450.
99. Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1949 Nov;1:455-473.
100. Multon S, Schoenen J. Pain control by vagus nerve stimulation: from animal to man...and back. *Acta Neurol Belg* 2005 Jun;105:62-67.
101. Mutani R., L'Epilessia Farmcoresistente: inquadramento e problematiche correlate. *Neurol Sci* (2006) 27: XXXVII Congresso Sin.

102. Narayanan JT, Watts R, Haddad N, Labar DR, Li PM, Filippi CG. Cerebral activation during vagus nerve stimulation: a functional MR study. *Epilepsia* 2002 Dec;43:1509-1514.
103. Naritoku DK, Terry WJ, Helfert RH. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* 1995 Sep;22:53-62.
104. Naritoku DK, Terry WJ, Helfert RH. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* 1995 Sep;22:53-62.
105. Neuman RS. Suppression of penicillin-induced epileptiform activity by noxious stimulation: mediation by 5-hydroxytryptamine. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986 Dec;64:546-555.
106. Olejniczak PW, Mader E, Butterbaugh G, Fisch BJ, Carey M. Postictal EEG suppression and hippocampal atrophy in temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* 2001 Jan;18:2-8.
107. Ottman R, Lipton RB. Comorbidity of migraine and epilepsy. *Neurology* 1994 Nov;44:2105-2110.
108. Palmini A, Najm I, Avanzini G, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 2004 Mar 23;62:S2-S8.
109. Perucca E. The management of refractory idiopathic epilepsies. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 3:31-35.



110. Petracchia L, Onori P, Sferra R, et al. [MDR (multidrug resistance) in hepatocarcinoma clinical-therapeutic implications]. *Clin Ter* 2003 Sep;154:325-335.
111. Piovesan EJ, Di SF, Kowacs PA, et al. Massaging over the greater occipital nerve reduces the intensity of migraine attacks: evidence for inhibitory trigemino-cervical convergence mechanisms. *Arq Neuropsiquiatr* 2007 Sep;65:599-604.
112. Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 2002 Jul;1:173-181.
113. POMPEIANO O, SWETT JE. EEG and behavioral manifestations of sleep induced by cutaneous nerve stimulation in normal cats. *Arch Ital Biol* 1962;100:311-342.
114. Popeney CA, Alo KM. Peripheral neurostimulation for the treatment of chronic, disabling transformed migraine. *Headache* 2003 Apr;43:369-375.
115. Post RM. Do the epilepsies, pain syndromes, and affective disorders share common kindling-like mechanisms? *Epilepsy Res* 2002 Jun;50:203-219.
116. Potschka H, Loscher W. Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport* 2001 Aug 8;12:2387-2389.
117. Potschka H, Loscher W. Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport* 2001 Aug 8;12:2387-2389.

118. Ragsdale DS, Avoli M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Brain Res Rev* 1998 Mar;26:16-28.
119. Rajna P, Lona C. Sensory stimulation for inhibition of epileptic seizures. *Epilepsia* 1989 Mar;30:168-174.
120. Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res* 1999 Apr;34:109-122.
121. Remy S, Gabriel S, Urban BW, et al. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 2003 Apr;53:469-479.
122. Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H. Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci* 2003 Jun;17:2648-2658.
123. Ricci G, Berti G, Cherubini E. [Modifications of the focal intercritical activity and of spike-wave paroxysms during motor and mental activity]. *Riv Neurol* 1971 Sep;41:316-319.
124. Rizzi M, Caccia S, Guiso G, et al. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci* 2002 Jul 15;22:5833-5839.
125. Romaniello A, Cruccu G, Frisardi G, Arendt-Nielsen L, Svensson P. Assessment of nociceptive trigeminal pathways by laser evoked potentials and laser silent periods in patients with painful temporomandibular disorders. *Pain* 103 (2003) 31-39.

126. 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* 2008;8:66.
127. Russo GL, Tassi L, Cossu M, et al. Focal cortical resection in malformations of cortical development. *Epileptic Disord* 2003 Sep;5 Suppl 2:S115-S123.
128. Rutecki P. Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1990;31 Suppl 2:S1-S6.
129. Rutecki P. Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1990;31 Suppl 2:S1-S6.
130. Salinsky MC, Burchiel KJ. Vagus nerve stimulation has no effect on awake EEG rhythms in humans. *Epilepsia* 1993 Mar;34:299-304.
131. Sander JW. Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* 1993 Nov;34:1007-1016.
132. Saper CB. The spinoparabrachial pathway: shedding new light on an old path. *J Comp Neurol* 1995 Mar 20;353:477-479.
133. Saper CB. The spinoparabrachial pathway: shedding new light on an old path. *J Comp Neurol* 1995 Mar 20;353:477-479.
134. Schachter SC, Saper CB. Vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1998 Jul;39:677-686.
135. Schachter SC, Saper CB. Vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 1998 Jul;39:677-686.
136. Schachter SC. Advances in the assessment of refractory epilepsy. *Epilepsia* 1993;34 Suppl 5:S24-S30.

137. Schmidt D, Loscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005 Jun;46:858-877.
138. Shorvon SD. The treatment of epilepsy, 2nd ed ed. Malden, Mass: Blackwell Science, 2004.
139. Sisodiya SM, Lint WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: human epilepsy. *Novartis Found Symp* 2002;243:167-174.
140. Sisodiya SM, Lint WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: human epilepsy. *Novartis Found Symp* 2002;243:167-174.
141. Slavin KV, Colpan ME, Munawar N, Wess C, Nersesyan H. Trigeminal and occipital peripheral nerve stimulation for craniofacial pain: a single-institution experience and review of the literature. *Neurosurg Focus* 2006;21:E5.
142. Stanton PK. Noradrenergic modulation of epileptiform bursting and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl* 1992;7:135-150.
143. Storer RJ, Akerman S, Shields KG, Goadsby PJ. GABAA receptor modulation of trigeminovascular nociceptive neurotransmission by midazolam is antagonized by flumazenil. *Brain Res* 2004 Jul 9;1013:188-193.
144. Storer RJ, Goadsby PJ. Topiramate inhibits trigeminovascular neurons in the cat. *Cephalalgia* 2004 Dec;24:1049-1056.
145. Sucholeiki R, Alsaadi TM, Morris GL, III, Ulmer JL, Biswal B, Mueller WM. fMRI in patients implanted with a vagal nerve stimulator. *Seizure* 2002 Apr;11:157-162.
146. Takaya M, Terry WJ, Naritoku DK. Vagus nerve stimulation induces a sustained anticonvulsant effect. *Epilepsia* 1996 Nov;37:1111-1116.

147. Takeda M, Tanimoto T, Ojima K, Matsumoto S. Suppressive effect of vagal afferents on the activity of the trigeminal spinal neurons related to the jaw-opening reflex in rats: involvement of the endogenous opioid system. *Brain Res Bull* 1998 Sep 1;47:49-56.
148. Tassi L, Colombo N, Garbelli R, et al. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 2002 Aug;125:1719-1732.
149. Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995 Jan;36:1-6.
150. Truini A, Romaniello A, Galeotti F, Iannetti GD, Crurru G, Laser evoked Potentials for assessing sensory neuropathy in human patients. *Neuroscience, letters* 361 (2004) 25-28.
151. Uthman BM, Reichl AM, Dean JC, et al. Effectiveness of vagus nerve stimulation in epilepsy patients: a 12-year observation. *Neurology* 2004 Sep 28;63:1124-1126.
152. Van Bockstaele EJ, Peoples J, Telegan P. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* 1999 Sep 27;412:410-428.
153. Van LK, Vonck K, Boon P, Brans B, Vandekerckhove T, Dierckx R. Vagus nerve stimulation in refractory epilepsy: SPECT activation study. *J Nucl Med* 2000 Jul;41:1145-1154.

154. Van LK, Vonck K, Boon P, Versijpt J, Dierckx R. Perfusion SPECT changes after acute and chronic vagus nerve stimulation in relation to prestimulus condition and long-term clinical efficacy. *J Nucl Med* 2002 Jun;43:733-744.
155. 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* 2009;34:111-146.
156. 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* 2009;34:111-146.
157. Walker BR, Easton A, Gale K. Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitarius. *Epilepsia* 1999 Aug;40:1051-1057.
158. Walker MC, Sander JW. The impact of new antiepileptic drugs on the prognosis of epilepsy: seizure freedom should be the ultimate goal. *Neurology* 1996 Apr;46:912-914.
159. Wood PR, Foley MA, Lawler PG. Vagal reflexes and anaesthesia. *Br J Hosp Med* 1990 Aug;44:137-139.
160. Woodbury DM, Woodbury JW. Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. *Epilepsia* 1990;31 Suppl 2:S7-19.
161. Yamakawa K. Epilepsy and sodium channel gene mutations: gain or loss of function? *Neuroreport* 2005 Jan 19;16:1-3.
162. Zabara J. Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia* 1992 Nov;33:1005-1012.

163. ZANCHETTI A, WANG SC, Moruzzi G. The effect of vagal afferent stimulation on the EEG pattern of the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1952 Aug;4:357-361.
164. Zerari-Mailly F, Buisseret P, Buisseret-Delmas C, Nosjean A. Trigemino-solitarii-facial pathway in rats. *J Comp Neurol* 2005 Jun 27;487:176-189.

## Abstract

### **Study of the effects induced by transcutaneous trigeminal electrical stimulation on EEG activity of healthy subjects and of patients with drug resistant epilepsy**

**Aim:** trigeminal nerve stimulation (TNS) induces an antiepileptic effect in experimentally-induced epileptic animals, and a significant reduction seizures frequency in refractory partial epilepsy (RPE) patients. As far as we know, no information is yet available on the influence exerted by acute TNS on EEG activity of humans. We investigated the TNS effects on EEG activity of healthy subjects and RPE patients. **Methods:** ten patients and five healthy subjects were enrolled. Digital EEG signal was acquired before, during and after unilateral and bilateral non-painful TNS. EEG spectral analysis was performed. ANOVA for repeated measures was conducted to compare data before and after TNS. Relative power was represented with topographic maps to characterize the regional differences. **Results:** In healthy subjects the general power spectra was significantly increased following TNS, compared to baseline recording. In patients, a significant increase of mean frequency (mF) ( $p < 0.01$ ) and of fast activity ( $p < 0.05$ ) and significant decrease of theta band ( $p < 0.01$ ) during post-stimulus intervals compared to baseline were found. The most relevant TNS-induced EEG changes were localized at frontal-temporal derivations (theta power reduction  $p < 0.0001$ ; mF increase  $p < 0.0002$ ), where the epileptic foci were sited.

**Conclusions:** Short-term TNS desynchronises EEG activity in RPE patients. This novel finding opens new prospects in research of safe alternative non-pharmacological RPE treatments.