

- **Titolo del progetto: Svelare le trappole di DNA in epilessia – RICERCA DI BASE**

- **Responsabile scientifico: Giuseppe Didato (PI)** - UOC Epilettologia Clinica e Sperimentale, Fondazione IRCCS Ist. Neurol C. Besta, Milano

Altri componenti del gruppo di Ricerca

- Francesca Colciaghi - UOC Epilettologia Clinica e Sperimentale, Fondazione IRCCS Ist. Neurol C. Besta, Milano. Ruolo: coPI
- Massimo Costanza, UOC Neuro-oncologia Fondazione IRCCS Ist. Neurol C. Besta, Milano. Ruolo: Collaboratore Principale
- Sabina Sangaletti, UOC Immunologia, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori Milano. Ruolo: Collaboratrice
- Arianna Ciotti - UOC Epilessia, Fondazione IRCCS Ist. Neurol C. Besta, Milano. Ruolo: Collaboratrice
- Michela Cravedi - UOC Neuro-oncologia Fondazione IRCCS Ist. Neurol C. Besta, Milano. Ruolo: Collaboratrice

- **Sinossi**

L'epilessia è una patologia che colpisce circa cinquanta milioni di persone nel mondo. L'origine delle crisi epilettiche nel 60% dei pazienti è dovuta ad una alterazione focale del cervello. Nel 25% circa di questi pazienti le crisi epilettiche non sono adeguatamente controllate dal trattamento farmacologico (epilessia farmaco-resistente), e tali pazienti sono candidati alla chirurgia dell'epilessia.

I meccanismi che determinano la farmaco-resistenza non sono stati ancora del tutto identificati. Il quadro patologico dell'epilessia è caratterizzato da ipereccitabilità neuronale, a cui si associano frequentemente rimodellamento del tessuto cerebrale, neurodegenerazione e neuroinfiammazione, sostenuta sia dalle cellule residenti che da leucociti periferici reclutati attraverso una barriera ematoencefalica (BEE) danneggiata.

I neutrofili rappresentano la popolazione più abbondante tra le cellule dell'immunità innata e svolgono un ruolo chiave nel promuovere la rottura della BEE e la neuroinfiammazione in diverse condizioni patologiche del sistema nervoso centrale, quali il trauma cerebrale, l'ischemia, la malattia di Alzheimer. Uno dei meccanismi principali con cui i neutrofili danneggiano l'endotelio cerebrovascolare e promuovono il danno del parenchima cerebrale consiste nel rilascio di fibre di cromatina decorate con proteine altamente pro-infiammatorie, fra cui l'istone citrullinato, la neutrofilo-elastasi e la mieloperossidasi, denominate trappole extracellulari dei neutrofili (NET).

Ad oggi, scarsa attenzione è stata dedicata alla caratterizzazione dei neutrofili e dei NET in contesti di epilessia. Un aumento significativo del rapporto neutrofili/linfociti è stato riportato durante la fase acuta di crisi epilettiche generalizzate in pazienti epilettici e recentemente proposto come biomarcatore infiammatorio di malattia. Tuttavia, non è noto se in pazienti affetti da epilessia farmaco-resistente vi siano alterazioni fenotipiche e/o funzionali del comparto neutrofilico, quali l'espansione di specifiche sottopopolazioni, l'alterazione dei mediatori infiammatori coinvolti nella loro attivazione e la produzione di NET.

Questo studio si prefigge di approfondire il coinvolgimento dei neutrofili e dei NET in pazienti affetti da epilessia focale farmaco-resistente del lobo temporale (ad eziologia non autoimmune o non infiammatoria) e candidati al trattamento chirurgico. A tale scopo, la presente proposta progettuale si articolerà su tre livelli di investigazione.

Il primo livello mira a verificare se l'epilessia farmaco-resistente induca una modificazione sistemica della risposta infiammatoria dei neutrofili rispetto a soggetti sani, tramite l'utilizzo di un approccio di citofluorimetria policromatica su sangue periferico e di multiplexing di mediatori infiammatori plasmatici. In parallelo misureremo i livelli plasmatici dei NET e verificheremo se nei pazienti epilettici vi sia un'attivazione del processo di NETosi tramite saggi cellulari in vitro. Inoltre, le analisi di correlazione tra i parametri immunologici e quelli clinici potrebbero identificare biomarcatori candidati di malattia misurabili su una fonte di materiale biologico facilmente accessibile come il sangue periferico.

Il secondo livello si focalizzerà sulla risposta infiammatoria localizzata nel SNC e caratterizzerà il fenotipo dei neutrofili eventualmente infiltranti il campione di tessuto cerebrale epilettico e la produzione di NET tramite approcci di citofluorimetria policromatica e analisi di immunofluorescenza confocale.

Tale approccio permetterà di dettagliare il ruolo e il fenotipo dei neutrofili sia a livello periferico che centrale. Questo aspetto è particolarmente rilevante da un punto di vista patologico, in quanto potrebbe indicare la presenza di uno stato costitutivamente alterato di queste cellule nei pazienti selezionati.

Il terzo livello è basato su un approccio di pre-clinica e potrebbe rivelare il potenziale epilettogeno dei NET, identificando un nuovo meccanismo patogenetico non ancora descritto. A tal fine verrà sfruttato il modello pilocarpina di epilessia del lobo temporale nel quale valuteremo il potenziale terapeutico dell'inibizione della NETosi nel controllare la ricorrenza delle crisi epilettiche e contrastare il danno cerebrale.

I dati ottenuti in questo progetto potrebbero individuare nuovi biomarcatori cellulari e/o molecolari di malattia e suggerire nuove prospettive terapeutiche immunomodulanti per quei pazienti epilettici oggi non trattati con successo con i farmaci anticrisi.

- **Parole chiave** (max 5): neutrofili, DNA extracellulare, infiammazione sterile, epilessia farmacoresistente, immunofenotipizzazione
- **Razionale** (max 1000 parole)

L'epilessia è una patologia da cui sono affetti circa cinquanta milioni di persone nel mondo, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità. Nel 60% di questi pazienti l'origine delle crisi epilettiche è dovuta a una alterazione localizzata (focale) del cervello. In circa il 25% dei pazienti con epilessia focale, il trattamento farmacologico risulta inefficace, una condizione definita dall'International League Against Epilepsy (ILAE) come epilessia farmacoresistente (Kwan et al, 2010). I meccanismi che determinano la farmacoresistenza, benché ampiamente oggetto di numerosi studi, non sono stati ancora del tutto identificati.

Una possibile alternativa terapeutica per i pazienti con epilessia farmacoresistente è rappresentata dalla ablazione della zona epilettogena attraverso metodiche chirurgiche che sono efficaci e sicure quando i pazienti vengono accuratamente selezionati (Weibe et al, 2001; Kohlhase et al, 2021).

L'epilessia è frequentemente un disturbo cronico ed è caratterizzata non solo da ipereccitabilità neuronale ma anche da rimodellamento del tessuto cerebrale che include neurodegenerazione, rimodellamento vascolare e neuroinfiammazione, sostenuta sia dalle cellule residenti, che da leucociti periferici, reclutati attraverso una barriera ematoencefalica (BEE) danneggiata (Turrin e Rivest, 2004; Vezzani e Granata, 2005; Schultzberg et al., 2007; Fabene et al., 2008, 2010; Bauer et al., 2017).

I neutrofili rappresentano la popolazione più abbondante tra le cellule dell'immunità innata e svolgono un ruolo chiave nel promuovere la rottura della BEE e della barriera sangue-CSF durante i processi neuroinfiammatori (Christy et al., 2013; Santos-Lima et al., 2022). La capacità dei neutrofili di aumentare la permeabilità vascolare è nota ormai da quattro decenni e la relazione tra l'adesione dei neutrofili e il danno vascolare è stata studiata in diverse condizioni patologiche del sistema nervoso centrale (SNC; Wedmore e Williams, 1981; Wang e Doerschuk, 2002; DiStasi e Ley, 2009; Rossi et al., 2020).

Inoltre, una delle funzioni effettrici più rilevanti identificate recentemente nei neutrofili consiste nel rilascio di fibre di cromatina decorate con proteine altamente pro-infiammatorie, fra cui l'istone citrullinato (CitH3), la neutrofilo-elastasi (NE) e la mieloperossidasi (MPO), denominate *trappole extracellulari dei neutrofili (NET)*. Originariamente identificata come un meccanismo anti-microbico (Brinkmann et al., 2004), la NETosi è stata coinvolta in svariati contesti patologici sia acuti che cronici, in cui contribuiscono a promuovere processi di infiammazione sterile e danno tissutale (Wartha et al., 2008, Yousefi et al., 2019). Nel contesto delle patologie del SNC, il coinvolgimento dei neutrofili e dei NET è stato evidenziato nelle condizioni di trauma cerebrale, ischemia, malattia di Alzheimer, e sclerosi laterale amiotrofica (Zenaro et al. 2015; Vaibhav et al., 2020; Trias

et al., 2018; Colciaghi and Costanza, 2022) dove si ipotizza che il rilascio dei NET veicoli segnali infiammatori in grado esacerbare il danno sia dell'endotelio cerebrovascolare che del parenchima, richiamando contestualmente altri leucociti al sito di infiammazione. In particolare, la stimolazione delle integrine neutrofiliche porta alla produzione di NET e al rilascio di mediatori infiammatori, tra cui specie reattive dell'ossigeno e chemochine, che contribuiscono sia alla riduzione dell'espressione delle proteine delle giunzioni occludenti cerebrovascolari con conseguente apertura della BEE, che al reclutamento ed attivazione di ulteriori leucociti al sito di infiammazione (Santos-Lima et al., 2022). I neutrofili sono in grado contribuire molto precocemente alla disfunzione vascolare sia in modelli animali di ischemia cerebrale (modello murino di occlusione dell'arteria cerebrale media; Hallenbeck et al., 1986; Kataoka et al., 2004; Sienel et al., 2022) che in un modello murino di stato epilettico (SE) indotto da pilocarpina (topo C57B6/pilocarpina, Fabene et al., 2008). Entro un'ora dall'induzione dello SE, i neutrofili sono in grado di aderire ai microvasi cerebrali contribuendo non solo alla disfunzione della BEE, ma anche in maniera significativa all'intensità dello SE, e alla conseguente ricorrenza delle crisi epilettiche spontanee nella fase cronica di malattia. La deplezione dei neutrofili indotta prima dell'induzione dello SE nel modello pilocarpina tramite l'infusione dell'anticorpo anti-Gr-1, causa una drastica riduzione sia dell'intensità dello SE che della frequenza delle crisi epilettiche spontanee in fase cronica di malattia, confermando il contributo pro-epilettogeno dei neutrofili (Fabene et al., 2008). Una riduzione simile della patologia epilettica è stata ottenuta nello stesso lavoro tramite la somministrazione di anticorpi monoclonali diretti contro l'integrina $\alpha 4$ e VCAM-1, o in modelli knock-out per le molecole di adesione (e.g. *Selplg*^{-/-} o *Fut7*^{-/-}) (Fabene et al., 2008). Un aumento del numero di leucociti è stato osservato nel parenchima cerebrale di pazienti con epilessia refrattaria al trattamento, indipendentemente dall'eziologia della malattia (Fabene et al., 2008).

Ad oggi, scarsa attenzione è stata dedicata alla caratterizzazione dei neutrofili e dei NET in contesti di epilessia. Alcuni studi hanno descritto un aumento significativo del rapporto neutrofili/linfociti (NLR) durante la fase acuta di crisi epilettiche tonico-cloniche generalizzate in pazienti epilettici e riportato che tale incremento risulta anche associato a crisi febbrili complesse ma non a crisi febbrili semplici (Özdemir et al. 2017; Yiğit et al. 2017; Günes & Büyükgöl, 2020; Hossein et al., 2022). L'aumento di un'unità di NLR correla significativamente con un rischio raddoppiato di occorrenza di crisi epilettiche tonico-cloniche generalizzate ed è stato quindi proposto come biomarcatore infiammatorio in pazienti epilettici e fattore prognostico di malattia, suggerendo che una risposta infiammatoria sistemica mediata dai neutrofili sia associata all'insorgenza delle crisi epilettiche nei pazienti. Un recente studio ha dimostrato che neutrofili di pazienti affetti da encefalite anti-NMDA siano più prone a produrre NET rispetto a controlli sani (Qiao et al., 2022).

Tuttavia, non è noto se in pazienti affetti da epilessia farmaco-resistente vi siano alterazioni fenotipiche e/o funzionali del comparto neutrofilico, quali l'espansione di specifiche sottopopolazioni, l'alterazione dei mediatori infiammatori coinvolti nella loro attivazione e la produzione di NET. Similmente, non è al momento stato investigato se i NET possano svolgere un ruolo pro-epilettogeno, né se l'inibizione della NETosi possa modulare il danno cerebrale e/o controllare le crisi epilettiche. Tramite la combinazione di approcci di citofluorimetria policromatica, multiplexing di molecole infiammatorie, saggi funzionali in vitro sui neutrofili, e l'utilizzo del un modello in vivo di SE indotto da pilocarpina, questo studio si prefigge di investigare il coinvolgimento dei neutrofili e della NETosi nella patogenesi dell'epilessia farmaco-resistente. I risultati della presente proposta progettuale potrebbero contribuire all'identificazione di nuovi meccanismi, finora non indagati, alla base della farmaco-resistenza dell'epilessia.

- **Obiettivi** (max 500 parole)

La presente proposta progettuale si prefigge di:

1. Analizzare la frequenza e il fenotipo dei neutrofili circolanti e quantificare i livelli dei mediatori molecolari plasmatici associati all'attivazione dei neutrofili in pazienti epilettici affetti da epilessia focale farmaco-resistente non associata ad eziologia autoimmune e/o infiammatoria, e relativi controlli sani (n=20 pazienti con epilessia del lobo temporale farmaco-resistente con sclerosi ippocampale o non lesionale, candidati

al trattamento chirurgico; n=20 controlli sani). Questo approccio potrebbe identificare alterazioni infiammatorie sistemiche a carico dei neutrofili in corso di epilessia e suggerire biomarcatori candidati di malattia, misurabili su una fonte di materiale biologico facilmente accessibile come il sangue periferico.

2. Verificare il reclutamento dei neutrofili nel cervello di pazienti epilettici. Verrà quantificata l'eventuale infiltrazione ed il fenotipo dei neutrofili presenti nel tessuto cerebrale campionato dalla resezione chirurgica dei pazienti (n=5 pazienti). In parallelo, valuteremo l'eventuale presenza dei NET in sezioni di tessuto cerebrale attraverso un approccio di immunofluorescenza (IF) confocale. Questa analisi permetterebbe di evidenziare il potenziale coinvolgimento dei neutrofili e dei NET nei processi neuroinfiammatori dell'epilessia.

3. Determinare la capacità dei neutrofili isolati da pazienti di rilasciare NET *in vitro* rispetto ai controlli sani e misurare il contenuto dei NET circolanti in pazienti e controlli. Questa sezione del progetto permetterebbe di verificare se in corso di epilessia vi sia un'attivazione del processo di NETosi ed indicherebbe un nuovo potenziale meccanismo infiammatorio associato all'epilessia.

4. Studiare il potenziale ruolo pro-epilettogeno dei NET in un modello preclinico di stato epilettico, e valutare se l'inibizione farmacologica della NETosi in questo modello sia in grado di ridurre il danno cerebrale e la ricorrenza delle crisi epilettiche. Questa analisi potrebbe valutare in modo diretto il coinvolgimento dei NET nella patogenesi dell'epilessia ed identificare un nuovo potenziale approccio terapeutico. Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio su modello ratto-pilocarpina mostrano che, nella fase cronica di malattia (4 settimane dopo l'occorrenza dello SE), infiltrati neutrofilici (identificati coi marcatori Ly6G+ e NE) sono in grado di estrudere NET dsDNA⁺-CitH3⁺, particolarmente evidenti a livello dei vasi (**Figura 1**, in fondo al progetto).

- **Piano Sperimentale** (max 2000 parole)

Obiettivo 1

Task 1.1 Selezione dei pazienti – Criteri di Inclusione/esclusione (*Responsabile Giuseppe Didato*)

Criteri di inclusione

Saranno arruolati 20 pazienti adulti (≥ 18 anni) affetti da epilessia focale farmaco-resistente del lobo temporale ad eziologia non autoimmune o infiammatoria (con sclerosi dell'ippocampo o non lesionale), candidati a trattamento chirurgico per l'epilessia presso la Neurochirurgia della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano.

Per la definizione di epilessia farmaco-resistente saranno applicati i criteri ILAE (Kwan et al, 2010): persistenza di crisi epilettiche dopo assunzione di almeno due farmaci anticrisi (ASM) in associazione o in successione.

Criteri di esclusione

Epilessia temporale ad eziologia infiammatoria/autoimmune

Malattie infiammatorie o autoimmuni del sistema nervoso centrale o sistemiche

Terapia con farmaci antinfiammatori o immunosoppressori

Come soggetti di controllo saranno inclusi donatori sani senza patologie neurologiche o infiammatorie acute o croniche abbinati per età e sesso (n=20).

Task 1.2 Immunofenotipizzazione e profilo infiammatorio plasmatico (*Responsabili Massimo Costanza-Francesca Colciaghi*)

Al fine di determinare eventuali alterazioni del comparto neutrofilico in corso di epilessia, i pazienti epilettici e controlli saranno sottoposti a prelievo ematico e verranno determinati:

(a) la conta assoluta dei neutrofili circolanti;

(b) la frequenza dei neutrofili tramite un'analisi di citofluorimetria policromatica comprensiva di marcatori di lineage e maturazione/differenziamento quali: CD14 e HLA-DR, importanti per distinguere i monociti (CD14⁺ HLA-DR⁺) dai granulociti (CD14⁻ HLA-DR⁻); CD16 e CD15, utili a differenziare i granulociti eosinofili (CD16⁺CD15^{low}) e basofili (CD16⁻CD15⁻) dai neutrofili (CD16⁺CD15⁺); CD66b, CD11b,

CD10 indicativi dello stato di maturazione dei neutrofili. Verrà incluso inoltre il marcatore CXCR2, un recettore per le chemochine responsabile del traffico dei neutrofili nel sito dell'infiammazione, oltre che essere un marcatore di maturità cellulare (Marini et al., 2017; Borella et al., 2022)

(c) i livelli plasmatici di un pannello di 21 mediatori molecolari associati all'attivazione e al reclutamento dei neutrofili (Marini et al., 2017) e quantificati tramite metodica Bioplex/Luminex. In particolare, (i) citochine: interferon (IFN)- γ , interleuchina (IL)-3, IL-4, IL-6, IL-17, IL-18, IL-23, fattore di necrosi tumorale (TNF), fattore attivante i linfociti B (BAFF); (ii) chemochine: CCL2, CCL3, CCL4, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL10; (iii) fattori di crescita: il fattore di crescita granulocitario (G-CSF), il fattore di crescita granulocitario-macrofagico (GM-CSF), il fattore di crescita trasformante (TGF)- α , il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)- β , il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF).

I dati immunologici esaminati ai punti a-c nel gruppo di pazienti epilettici saranno sia comparati al gruppo di controlli sani che correlati con i seguenti parametri clinici:

- Età di esordio dell'epilessia
- Durata di malattia
- Frequenza delle crisi
- Presenza di crisi con evoluzione tonico-clonica bilaterale (oltre alle crisi focali)
- Numero di farmaci anticrisi (ASM) assunti al momento della valutazione

Obiettivo 2

Task 2.1 Immunofenotipizzazione del tessuto cerebrale (Responsabile: Massimo Costanza)

Al fine di determinare se i neutrofili vengano reclutati nel cervello in corso di epilessia e caratterizzarne il fenotipo immunologico, un campione di tessuto ottenuto dal lobo temporale dei pazienti dopo l'intervento chirurgico sarà analizzato tramite citofluorimetria multiparametrica comprensiva degli stessi marcatori di lineage e maturazione/differenziamento riportati nella *Task 1.2-b*.

La frequenza delle sottopopolazioni dei neutrofili che verranno eventualmente determinate nel tessuto cerebrale dei pazienti epilettici sarà comparata a quella dei neutrofili circolanti dei pazienti epilettici e dei donatori sani, determinati nell'obiettivo 1.

Task 2.2 Analisi degli infiltrati e dei NET nel tessuto cerebrale dei pazienti (Responsabile Francesca Colciaghi)

Allo scopo di verificare la presenza degli infiltrati neutrofilici e della NETosi nel cervello epilettico, sezioni di tessuto fissato ottenuti dalla chirurgia dell'epilessia verranno valutati per analisi di tripla IF confocale tramite l'utilizzo di diverse combinazioni di marcatori specifici: CD66b/NE/MPO, CD66b/MPO/CitH3, NE/MPO/CitH3, dsDNA/CitH3/NE.

Obiettivo 3

Task 3.1 Misurazione dei NET plasmatici (Responsabile: Massimo Costanza)

Il processo di NETosi è caratterizzato dal rilascio di fibre DNA associato ad enzimi quali NE e MPO, pertanto la presenza di tali complessi nei fluidi biologici è ampiamente considerata come un marcatore di NETosi (Carmona-Rivera et al., 2022; Borella et al., 2022)

Ad oggi non esistono kit commerciali in grado di determinare i livelli dei complessi dsDNA-NE o dsDNA-MPO. In laboratorio abbiamo recentemente messo a punto una metodica ELISA in grado di determinare in modo semi-quantitativo il livello dei complessi DNA-MPO e DNA-NE nei fluidi biologici. Effettueremo pertanto una valutazione dei livelli di tali complessi nel plasma dei pazienti epilettici (n=20) e controlli (n=20), reclutati all'obiettivo 1. I livelli dei NET circolanti saranno correlati ai parametri clinici descritti nell'obiettivo 1 (età di esordio dell'epilessia, durata di malattia, frequenza delle crisi, numero di farmaci anticrisi assunti al

momento della valutazione, intervallo temporale rispetto alla crisi precedente al prelievo ematico). La realizzazione di questa Task prevede il contributo della dr.ssa Michela Cravedi.

Task 3.2 Saggio di NETosi in vitro (Responsabile: Francesca Colciaghi)

Per verificare se l'epilessia sia associata ad un'attivazione della NETosi, sfrutteremo un saggio di NETosi in vitro, in collaborazione con la dott.ssa Sabina Sangaletti (Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori). Pertanto, una parte del prelievo ematico ottenuto all'obiettivo 1 verrà utilizzata per purificare i neutrofili da pazienti e controlli (n=5/gruppo) tramite separazione immunomagnetica. I neutrofili saranno coltivati per 4h in vitro su piastre di poly-D-lysina come descritto (Sangaletti et al., 2012) e verrà valutato se, rispetto al gruppo di donatori sani, i neutrofili derivanti dai pazienti epilettici rilasciano in misura maggiore NET sia spontaneamente (come effetto di un'attivazione pregressa), che in seguito ad induzione con uno stimolo canonico di NETosi quale l'estere del forbole PMA. Inoltre, colture parallele saranno trattate con un bloccante selettivo della dell'enzima peptidil-arginina deiminasi (PAD)4 (Lewis et al., 2015). Tale enzima promuove la citrullinazione degli istoni e la conseguente decondensazione della cromatina ed è stato dimostrato avere ha un ruolo chiave nel promuovere la NETosi (Colciaghi and Costanza, 2022). Questo trattamento servirà a verificare in un modello in vitro che l'inibizione del PAD4 sia in grado di bloccare la NETosi dei neutrofili derivanti da pazienti epilettici e in che entità questo avvenga rispetto a neutrofili derivanti dai donatori sani.

Obiettivo 4 (Responsabile Francesca Colciaghi)

Task 4.1 Trattamento terapeutico in un modello di stato epilettico con l'inibitore dell'enzima PAD4

Per questo studio pilota, intendiamo utilizzare il modello murino di TLE indotto da pilocarpina in topi C57BL/6, secondo protocollo ampiamente utilizzato (Fabene et al., 2008). Dopo 1 h di SE convulsivo gli animali verranno randomizzati e iniettati **(i)** con GSK484 i.p. (15-20 mg/kg), inibitore specifico dell'enzima PAD4, e trattati quotidianamente per almeno 20 giorni oppure **(ii)** riceveranno salina e usati come gruppo di controllo epilettico (almeno n=5-7 topi per gruppo). La latenza dell'insorgenza della prima crisi epilettica spontanea dall'occorrenza dello SE, la frequenza e severità delle crisi epilettiche spontanee verranno valutate nella fase cronica di malattia (5°-20° giorno) attraverso video-monitoraggio (24h/di) dopo l'induzione di SE come riportato in precedenza (Fabene et al., 2008). Dal momento che le meningi rappresentano una via cruciale di infiltrazione cerebrale dei leucociti circolanti (Santos-Lima et al., 2022), si ritiene opportuno, in questo studio pilota, non utilizzare elettrodi corticali per la registrazione EEG delle crisi per non danneggiare le meningi stesse, evitando così di introdurre un bias nell'analisi degli infiltrati neutrofilici e deposito di NET. Sebbene la somministrazione di pilocarpina, senza l'insorgenza dello SE, di per sé non abbia effetto sul reclutamento cerebrale e adesione dei leucociti ai vasi (Fabene et al., 2008), si prevede comunque di generare un ulteriore gruppo di animali (n=5) che riceverà diazepam (5-10 mg/kg i.p.) 20 minuti prima dell'iniezione di pilocarpina allo scopo di sopprimere l'insorgenza dello SE. Questi animali verranno utilizzati come ulteriore gruppo di controllo specifico della risposta infiammatoria indotta da pilocarpina in assenza di SE (Fabene et al., 2008; Colciaghi et al., 2011).

Task 4.2 Analisi istologica degli infiltrati, dei NET nel tessuto cerebrale, neuroinfiammazione e danno nel modello

Un'analisi neuropatologica verrà condotta in tutti i gruppi sperimentali per valutare il danno cerebrale sia livello macroscopico che molecolare. Lo shrinkage ippocampale, la densità cellulare nelle diverse aree ippocampali (CA, ilo e dispersione delle cellule granulari del giro dentato) e lo spessore della corteccia cerebrale (segni distintivi di danno nel modello C57BL/6-pilocarpina) verranno valutati su sezioni seriali colorate con tionina. Sezioni cerebrali adiacenti verranno dedicate alla valutazione **(i)** della risposta infiammatoria innata cerebrale (gliale/microgliale con marcatori specifici GFAP/Iba-1) a livello corticale ed ippocampale, **(ii)** del deposito dei NET (Ly6G o NE con MPO/CitH3 o con MPO/dsDNA) e **(iii)** dell'infiltrazione dei neutrofili (cellule Ly6G+/NE+) a livello meningeale e dei plessi coroidei, attraverso esperimenti di IF confocale. **(iv)** Il danno di BEE verrà valutato attraverso l'analisi dell'extravasazione di albumina o di IgG mediante analisi immunohistochimica (IHC).

L'autorizzazione ministeriale per l'esecuzione delle procedure animali previste dalla presente Task è in fase di sottomissione all'Organo Preposto al Benessere Animale della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta.

La realizzazione di questo obiettivo prevede il contributo della dr.ssa Arianna Ciotti.

• **Metodi** (max 2000 parole)

Obiettivo 1

Soggetti inclusi nello studio. Tutti i pazienti saranno sottoposti a studio prechirurgico secondo un protocollo finalizzato a verificare l'esordio delle crisi epilettiche nel lobo temporale, in particolare: accurata valutazione clinica (raccolta di dati demografici e dettagli della storia epilettologica), monitoraggio video-EEG (VEEG) per registrazione delle crisi, RM encefalo ad alto campo (3 Tesla), PET cerebrale con 18F-fluoro-desossiglucosio (FDG). Le resezioni verranno eseguite per motivi strettamente terapeutici dopo che i pazienti avranno dato il loro consenso informato, e l'estensione dell'escissione verrà pianificata sulla base della localizzazione della zona epilettogena (definita sulla base di dati anatomo-elettroclinici di cui sopra) e del rischio di deficit post-chirurgici.

I pazienti, ai fini del presente studio, saranno sottoposti a prelievo ematico, in occasione del ricovero prechirurgico, dopo almeno 48 ore dall'ultima crisi, determinata sulla base del diario delle crisi o del monitoraggio video-EEG.

Il consenso informato scritto per l'uso di campioni chirurgici cerebrali e di dati clinici a scopo di ricerca, in conformità alle linee guida etiche istituzionali e nazionali, e il protocollo dello studio è in fase di sottomissione presso il Comitato Etico della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta.

Raccolta dei campioni. I pazienti e donatori sani saranno sottoposti a prelievo venoso tra le 8 e le 10 del mattino e fino a 20 ml di sangue sarà collezionato in provette con EDTA come anti-coagulante. I campioni saranno processati entro 30' dopo il prelievo. Una provetta sarà dedicata all'isolamento del plasma tramite centrifugazione a 2000 g per 10' a 4°C, ed il plasma aliquotato e conservato a -80°C fino all'uso. Le restanti provette di sangue verranno processate per le analisi immunologiche sul comparto neutrofilico.

Immunofenotipizzazione su sangue periferico. La conta assoluta dei neutrofili ed il rapporto neutrofili/linfociti saranno determinati tramite formula leucocitaria derivante da analisi ematologica standard automatizzata (Advia 2120, Siemens), eseguita presso il Laboratorio Analisi della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta. Per le analisi di citofluorimetria multiparametrica, 500 µl di sangue saranno trattati con 3 mL di soluzione di lisi dei globuli rossi ACK per 10' a temperatura ambiente e lavati per due volte con PBS come descritto (Montaldo et al., 2022). Successivamente le cellule saranno risospese in 100 µl di PBS 1% BSA, trattate con Human TruStain FcX™ (Biolegend) per il blocco dei siti aspecifici ed incubate con una miscela di anticorpi coniugati ai fluorocromi (Biolegend) secondo il seguente pannello: CD14-FITC, HLA-DR-PE, CD66b-PE-Dazzle594, CD16-PercCP-Cy5-5, CXCR2-PE-Cy7, CD10-APC, CD15-AF700, CD45-APC-Fire750 (marcatore pan-leucocitario), CD11b-BV570, eFluor450 (marcatore di vitalità). Successivamente i campioni saranno lavati e fissati con Fixation Buffer (Biolegend) ed acquisiti tramite citofluorimetro Navios Ex (Beckman Coulter). I dati verranno analizzati tramite software FlowJo v10.8 (BD Bioscience). Al fine di determinare la fluorescenza di background e le popolazioni negative e positive, verranno utilizzati i controlli fluorescence minus one.

Quantificazione citochine/chemochine/fattori di crescita circolanti. Il plasma dei pazienti e dei controlli sarà scongelato contemporaneamente, centrifugato a 16000g per 4' per rimuovere eventuali aggregati e diluito 1:2. I livelli di 21 mediatori infiammatori molecolari (IFN-γ, IL-3, IL-4, IL-6, IL-17, IL-18, IL-23, TNF, BAFF, CCL2, CCL3, CCL4, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL10, G-CSF, GM-CSF, TGF-α, FGF-β, VEGF) saranno quantificati tramite Human Magnetic Luminex Assay (Premixed Multiplex Custom Assay) (Biotechne) su piattaforma Bio-Plex 200 Systems (Biorad).

Obiettivo 2

Immunofenotipizzazione dei leucociti cerebrali. L'isolamento dei leucociti presenti nel tessuto cerebrale (n=5 pazienti) verrà eseguito come precedentemente descritto (Piconese et al., 2011; Mitsdoerffer et al., 2022). In breve, il tessuto cerebrale sarà sminuzzato con un bisturi e digerito per 30 minuti con collagenasi IV (2 mg/ml) e DNasi I (1 mg/ml) (Sigma). Successivamente il tessuto sarà ulteriormente omogenato su un filtro di nylon da 70µm (BD Bioscience), per ottenere sospensioni a singola cellula, e i leucociti isolati mediante centrifugazione su gradiente di Percoll 30/70%. I campioni così ottenuti saranno caratterizzati tramite citofluorimetria multiparametrica sui neutrofili in modo identico a quanto descritto nell'Obiettivo 1.

Microscopia Confocale per valutare i NET nel tessuto cerebrale umano. Dopo l'intervento chirurgico, i campioni cerebrali *en bloc* verranno immersi in soluzione fissativa (4% paraformaldeide, PFA) per 24-36 ore (ad eccezione delle porzioni - circa 200-300 mg - destinate all'analisi immunofenotipica), ed incluse in paraffina, e quindi processate per l'analisi neuropatologica di routine/diagnostica effettuata nel presso il nostro istituto (Rossini et al., 2022).

Per lo scopo specifico di questo studio, ulteriori sezioni di tessuto (7 µm) verranno sottoposte ad analisi di doppie/triple-IF (Finardi et al., 2013) per la visualizzazione dei NET e degli infiltrati neutrofilici e del loro stato di attivazione, con combinazioni di anticorpi primari monoclonali o policlonali, specifici per anti-CitH3, anti-dsDNA, anti-CD11b, anti-CD66b, anti-CD10, anti-NE, anti-MPO, seguite da incubazione con appropriati anticorpi secondari fluorescenti e controcolorate con DAPI quale marcatore nucleare. Le sezioni verranno visualizzate ed acquisite con un microscopio confocale a scansione laser TCS SP8 (Leica Microsystem).

Obiettivo 3

ELISA dei NET circolanti. Una piastra da 96 pozzetti (Nunc) verrà rivestita con un anticorpo anti-NE o anti-MPO (Abcam, 1 µg/ml), per una notte a temperatura ambiente (RT). I pozzetti saranno bloccati con PBS 1% BSA per 1h a RT, lavati con PBS-Tween 0,05% ed il plasma, diluito 1:2 in PBS 1% BSA, incubato per 3h a RT. La piastra sarà successivamente lavata e incubata con un anticorpo mouse anti-dsDNA (Abcam, 1 µg/ml). I pozzetti saranno nuovamente lavati e incubati con un anticorpo anti-mouse IgG-HRP (Southern Biotech). Infine verrà utilizzato il reagente TMB (BD Bioscience) per sviluppare la reazione e acido solforico 1N per bloccarla. L'assorbanza a 450 nm verrà determinata con un lettore di piastre (Thermo Scientific) ed i dati espressi come densità ottica media a 450 nm +/- deviazione standard.

Saggio di NETosi. I neutrofili saranno purificati da 8 mL di sangue collezionato all'obiettivo 1 da pazienti e donatori sani (n=5/gruppo) tramite MACSxpress® Whole Blood Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi) e lisi dei globuli rossi tramite RBC Lysis Buffer (eBioscience), secondo protocollo. I neutrofili verranno coltivati su vetrini pre-trattati con poly-D-lisina (2x10⁵/pozzetto) in terreno IMDM con 2%FCS (Tripodo et al., 2022) e stimolati con PMA (80 nM) o lasciati senza stimolo per 4h. In parallelo i neutrofili (stimolati e non stimolati) saranno trattati con GSK484 (10 µM) per la valutazione e quantificazione dei NET. A tal fine, le cellule verranno fissate con PFA4% e la marcatura dei NET eseguita con Syto13 (DNA), anticorpi primari diretti contro CitH3, MPO e NE (Abcam) e successiva incubazione con relativi anticorpi secondari coniugati a fluorocromi appropriati. I NET saranno visualizzati tramite microscopio confocale SP8 (Leica) e quantificati come precedentemente descritto (Sangaletti et al., 2012).

Obiettivo 4

Generazione modello topo C57BL/6-pilocarpina. L'induzione dello SE indotto da pilocarpina seguirà un protocollo sperimentale ampiamente validato ed utilizzato (Shibley H et al., 2002; Fabene et al., 2008).

Giovani topi maschi C57BL/6 (30-50 giorni di età, peso 20-25 g) verranno acquistati da Charles-River (Calco, Como, Italia) e mantenuti in gabbie ventilate con accesso ad acqua e cibo ad-libitum (ciclo luce/buio di 12 ore

alternati) ed abituati agli sperimentatori per almeno una settimana prima del trattamento. Il giorno dell'induzione dello SE, gli animali verranno trattati con metilscopolamina (1 mg/kg i.p., Sigma) per minimizzare gli effetti muscarinici periferici. Trenta minuti dopo, i topi verranno iniettati con pilocarpina (280-300 mg/kg i.p., Sigma) diluita in PBS 0.01 M pH 7.4. Gli animali verranno monitorati fino all'insorgenza dello SE, che verrà clinicamente registrato da due sperimentatori, in accordo con la scala di Racine (Racine 1972). Le crisi di stadio 1-2 (i.e., automatismi facciali, irrigidimento della coda, head-nodding) verranno accorpate onde evitare soggettività nella valutazione delle crisi. Le crisi di stadio 3 (crisi tonico-cloniche caratterizzate da mioclono unilaterale delle zampe anteriori in aggiunta agli stadi 1-2), stadio 4 (mioclono bilaterale delle zampe anteriori associato a rearing) e stadio 5 (mioclono bilaterale zampe anteriori/posteriori con perdita di equilibrio e caduta/ribaltamento) verranno considerate crisi convulsive generalizzate (CMS). Un topo che avrà manifestato un minimo di 3 eventi convulsivi di stadio 3-5 entro 2 ore dall'iniezione di pilocarpina verrà considerato in SE convulsivo (Shibley H et al., 2002). Topi che manifesteranno solo stadi 1-2 verranno esclusi dallo studio. Un'ora dopo l'insorgenza dello SE convulsivo, gli animali verranno randomizzati e i) iniettati con la prima dose di GSK484 (15-20 mg/kg i.p., in DMSO 10% in soluzione salina) o ii) assegnati al gruppo di controllo epilettico (veicolo; n=5-7 topi per gruppo). Novanta minuti dopo l'onset di SE, tutti gli animali verranno trattati con DZP 5 mg/kg ip, allo scopo di attenuare ed uniformare la clinica dello SE nei diversi gruppi. I topi Pilo-GSK484 riceveranno GSK484 (15-20 mg/kg ip) quotidianamente per i 20 giorni di trial. Il gruppo di topi non trattati con GSK484, riceverà veicolo per il tempo dello studio pilota. A partire dal 3°- 4° giorno dopo l'induzione dello SE, gli animali di entrambi i gruppi sperimentali verranno video-monitorati 24h/dì per l'intera durata del trial, per la registrazione i) del tempo di latenza della prima crisi epilettica spontanea (SRS onset), e per ii) la valutazione della semeiologia delle SRS: frequenza, durata, severità secondo Racine. Ulteriori n=5 topi verranno trattati con DZP (5-10 mg/kg, i.p.) prima della somministrazione di pilocarpina, allo scopo di prevenire l'insorgenza dello SE (Fabene et al., 2008; Colciaghi et al., 2011), ed utilizzato come controllo non-epilettico. Venti giorni post-SE, i topi verranno anestetizzati profondamente con isofluorano e perfusi transcardialmente con soluzione di PFA al 4% in tampone fosfato 0.15 M (pH 7.2-7.4). I cervelli verranno post-fissati in PFA 4% per 24 ore, crioprotetti in saccarosio 30% e quindi congelati in isopentano su ghiaccio secco. I cervelli verranno tagliati al criostato e sezioni coronali di 15 μ m verranno montate in serie su vetrini caricati positivamente (superfrost plus), e conservati a -20°C fino alle reazioni di IF/IHC.

Prelievi di sangue dalla vena sottomandibolare (circa 150-200 μ l, in accordo con le linee guida IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee, <https://olaw.nih.gov/resources/tutorial/iacuc.htm>) sono previsti per gli animali inclusi nello studio, il giorno precedente la somministrazione di pilocarpina (valore basale), il giorno 6, il giorno 14 e il giorno 20 (data del sacrificio), dopo induzione di SE per la valutazione dei livelli NET plasmatici (metodica ELISA, riportata sopra), nei diversi gruppi sperimentali.

Analisi istologica per valutare i NET, danno cerebrale e neuroinfiammazione nel tessuto cerebrale murino.

Verranno utilizzati protocolli ampiamente validati nel nostro laboratorio, con opportune modifiche (Colciaghi et al., 2011, 2014; Nobili et al., 2015; d'Errico et al. 2013). Sezioni coronali colorate con tionina verranno usate per valutare lo shrinkage ippocampale, la misura dello spessore della corteccia, e la densità cellulare nelle varie regioni ippocampale, come descritto in Colciaghi et al., 2011 e 2014. Per valutare il danno di BEE le sezioni saranno immunoreagite con anticorpo specifico anti-albumina (o anti-IgG di ratto/biotinilato) e sviluppate con reazione di perossidasi con 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro 0.075% (DAB; Sigma Aldrich) in presenza di 0.002% di H₂O₂ in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, previa incubazione con extravidina-perossidasi (Sigma Aldrich: diluito 1:4000). Per l'identificazione dei NET, degli infiltrati neutrofilici e della neuroinfiammazione, le sezioni saranno trattate con MetOH freddo 100% per 20 min, i siti di legame aspecifici bloccati con siero NGS (o NDS) 10% in PBS, 0.2% Triton X-100. Le sezioni verranno quindi incubate a RT, o/n, in camera umida con combinazioni di mAb o pAb specifici anti-LysG6 (marcatore murino neutrofilici), anti-NE, anti-MPO, anti-CitH3, anti-dsDNA (diluizioni da 1:200 a 1:1000), anti-Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP, marcatore gliale) o anti-Iba-1 (marcatore microgliale) in 1% NGS e 0.2% Triton, seguite da incubazione con appropriati anticorpi secondari fluorescenti e controcolorati con DAPI quale marcatore nucleare. Le sezioni

verranno visualizzate ed acquisite con un microscopio confocale a scansione laser TCS SP8 (Leica Microsystem).

Statistica

Le analisi statistiche verranno eseguite con GraphPad Prism 9. La distribuzione dei dati sarà calcolata con test di normalità D'Agostino-Pearson. In caso di dati non distribuiti in modo normale, verranno utilizzati i test Wilcoxon/Mann Whitney U o Kruskal Wallis con Dunn post-hoc per il confronto tra due o più gruppi, rispettivamente. Nel caso di dati normalmente distribuiti, per il confronto tra due o più gruppi si utilizzerà il test t di Student o l'ANOVA seguito dal test post-hoc di Bonferroni, rispettivamente. Per le analisi di correlazione si utilizzerà la regressione lineare. In tutti i test, $p < 0.05$ sarà considerato statisticamente significativo.

• Risultati attesi e rilevanza clinica (max 500 parole)

Questo progetto si prefigge di approfondire il coinvolgimento di una popolazione chiave della risposta immune innata quali i neutrofili nell'epilessia farmacoresistente. Inoltre, il ruolo patologico dei NET nell'esacerbare la risposta infiammatoria è stato ampiamente descritto in diverse patologie del CNS ad eziologia non autoimmune, ma ad oggi nessuno studio ha mai valutato il loro possibile contributo in relazione alle crisi epilettiche nei pazienti con epilessia focale farmacoresistente non associata ad eziologia autoimmune e/o infiammatoria.

A tale scopo, il progetto si articola su tre livelli di investigazione:

1) Il primo livello mira a verificare se l'epilessia farmacoresistente induca una modificazione sistemica della risposta infiammatoria dei neutrofili. A tal fine verrà sfruttato un approccio di citofluorimetria policromatica su sangue periferico e di multiplexing di mediatori infiammatori plasmatici, che potrebbe identificare rispettivamente selettive sottopopolazioni neutrofiliche e/o mediatori infiammatori alterati. Inoltre, verrà verificata una possibile alterazione funzionale dei neutrofili, analizzando l'attivazione di un meccanismo chiave della risposta neutrofilica, quale la NETosi, tramite la quantificazione dei NET plasmatici e saggi di NETosi in vitro.

Le analisi di correlazione tra i parametri immunologici e svariati parametri clinici (come da Task 1.2) potrebbero identificare biomarcatori candidati cellulari e/o molecolari di malattia misurabili su una fonte di materiale biologico facilmente accessibile come il sangue periferico, da validare in una coorte più ampia di pazienti in studi successivi.

2) Il secondo livello si focalizzerà sulla risposta infiammatoria localizzata nel SNC e si avvarrà di approcci di citofluorimetria policromatica identici a quelli utilizzati su sangue periferico, oltre che di analisi dei NET tramite IF e potrebbe per la prima volta identificare la presenza di eventuali sottopopolazioni neutrofiliche, così come l'attivazione della NETosi nel cervello epilettico.

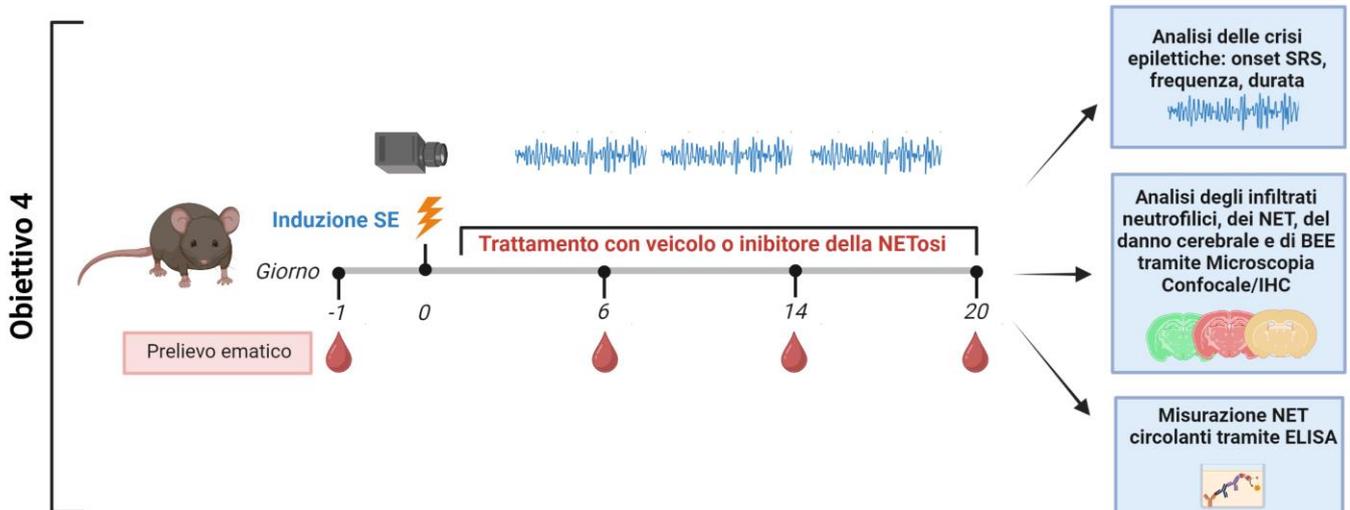
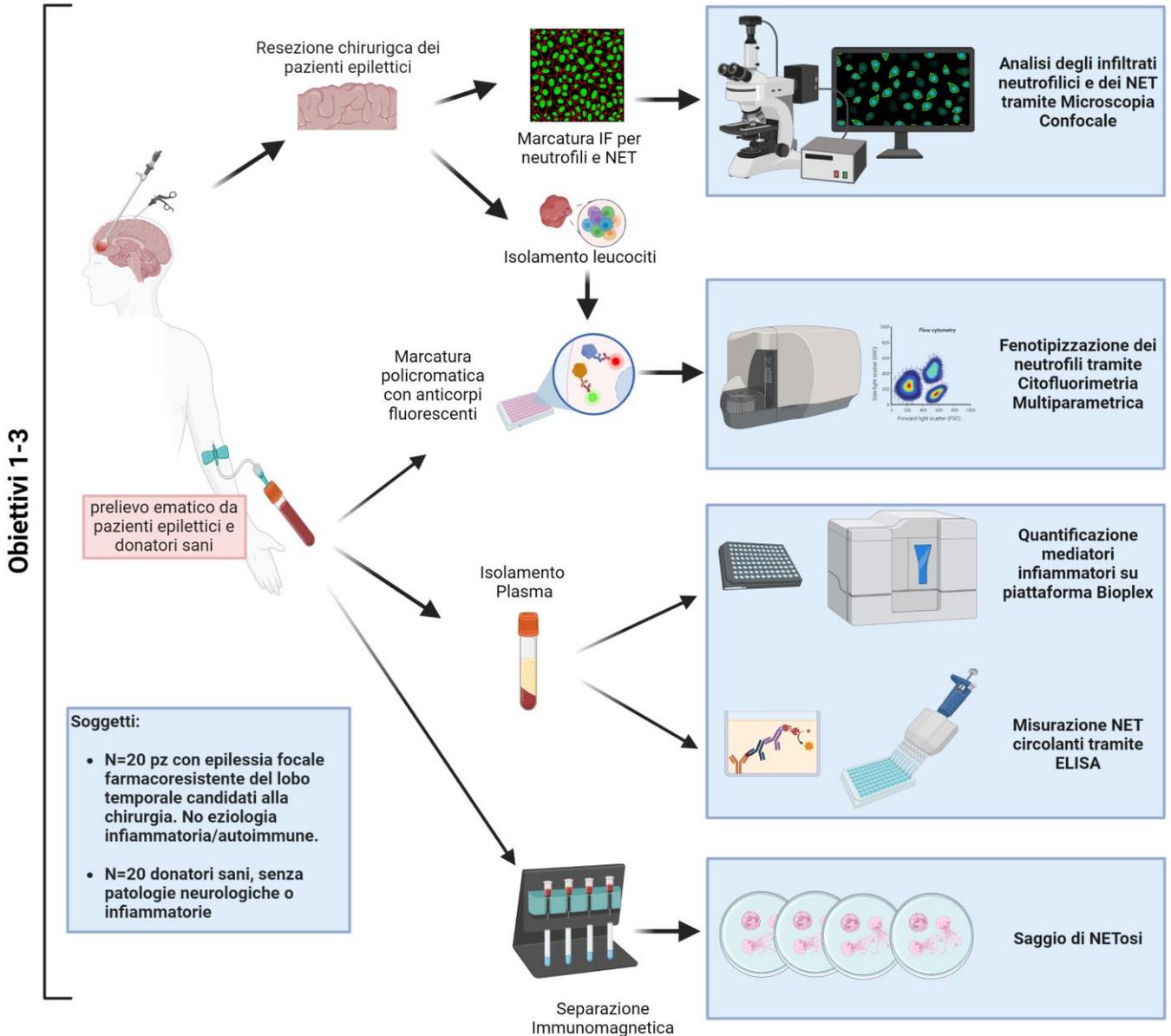
La combinazione di un immunomonitoraggio dei neutrofili sia a livello periferico che centrale permetterà di dettagliarne il ruolo e il fenotipo nella sua complessità in uno stesso paziente. Tale aspetto è particolarmente rilevante da un punto di vista patologico, in quanto potrebbe indicare la presenza di uno stato costitutivamente alterato nei pazienti con epilessia farmacoresistente, con eziologia non autoimmune o non infiammatoria.

3) Il terzo livello è basato su un approccio di pre-clinica e potrebbe rivelare il potenziale epilettogenico dei NET, identificando un nuovo possibile meccanismo patologico di malattia. A tal fine verrà sfruttato il modello pilocarpina di epilessia del lobo temporale ampiamente utilizzato, con un setting sperimentale strutturato. Questa parte del progetto potrebbe inoltre verificare il potenziale terapeutico dell'inibizione della NETosi in epilessia: il modello animale darà l'opportunità di studiarne gli effetti sul danno cerebrale e sulla ricorrenza delle crisi epilettiche.

Nel complesso, i dati ottenuti in questo progetto potrebbero indicare nuovi biomarcatori neutrofilici di malattia e/o legati alla refrattarietà alla terapia farmacologica, ed aprire prospettive nello sviluppo di strategie immunomodulanti innovative per quei pazienti epilettici oggi non trattati con successo (~120.000 in Italia).

- Sintetico schema grafico del progetto

SVELARE LE TRAPPOLE DI DNA IN EPILESSIA



• **Budget del Progetto**

	Costo Totale Progetto	Quota Richiesta a Fondazione LICE	Quota Cofinanziata	Ente cofinanziatore
Personale di Ricerca	81.900,00 €	0,00 €	81.900,00 €	Fondi istituzionali (Besta/INT) – valorizzazione del tempo dedicato dettagliato sotto
Attrezzature	4.000,00 €	4.000,00 €	0,00 €	
Materiali Consumo	45.000,00 €	29.400,00 €	15.600,00 €	Fondi istituzionali Besta
Servizi Informatici	0,00 €	0,00 €	0,00 €	
Partecipazione Congressi e collaborazioni (max 10%)	3.000,00 €	3.000,00 €	0,00 €	
Costi Pubblicazione	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €	Fondi istituzionali Besta
Overheads (max 10%)	13.650,00 €	3.600,00 €	10.050,00 €	Fondi istituzionali Besta
TOTALE	150.550,00 €	40.000,00 €	110.550,00 €	

Dettaglio Budget:

DETTAGLIO COSTO PERSONALE di Ricerca	Totale costo	Cofinanziamento
Ciotti 6m/u tot Borsa senior	12.050,00 €	Besta -Borsa RC MinSal
Colciaghi 6m/u tot Ricercatrice	25.000,00 €	Besta -TD Ricercatore
Costanza 4 m/u tot Ricercatore	16.666,67 €	Besta -TD Ricercatore
Didato 2 m/u tot Dir Medico	16.666,67 €	Besta - TI Dir Medico
Cravedi 2 m/u tot Borsa Senior	4.016,67 €	Besta - Borsa RC MinSal
Sangaletti 1m/u tot Dir Biol	7.500,00 €	INT - TD Dir Biologo
TOT	81.900,00 €	

Attrezzature: licenze software di citofluorimetria e GraphPad

Materiali Consumo: Bioplex, anticorpi FACS e ELISA, materiali e anticorpi per IHC/IF e colture cellulari; mantenimento animali sperimentali e farmaci; Materiale per analisi dati e archiviazione

Partecipazione Congressi e collaborazioni: partecipazione ad 1 congresso internazionale pertinente al progetto per due ricercatori

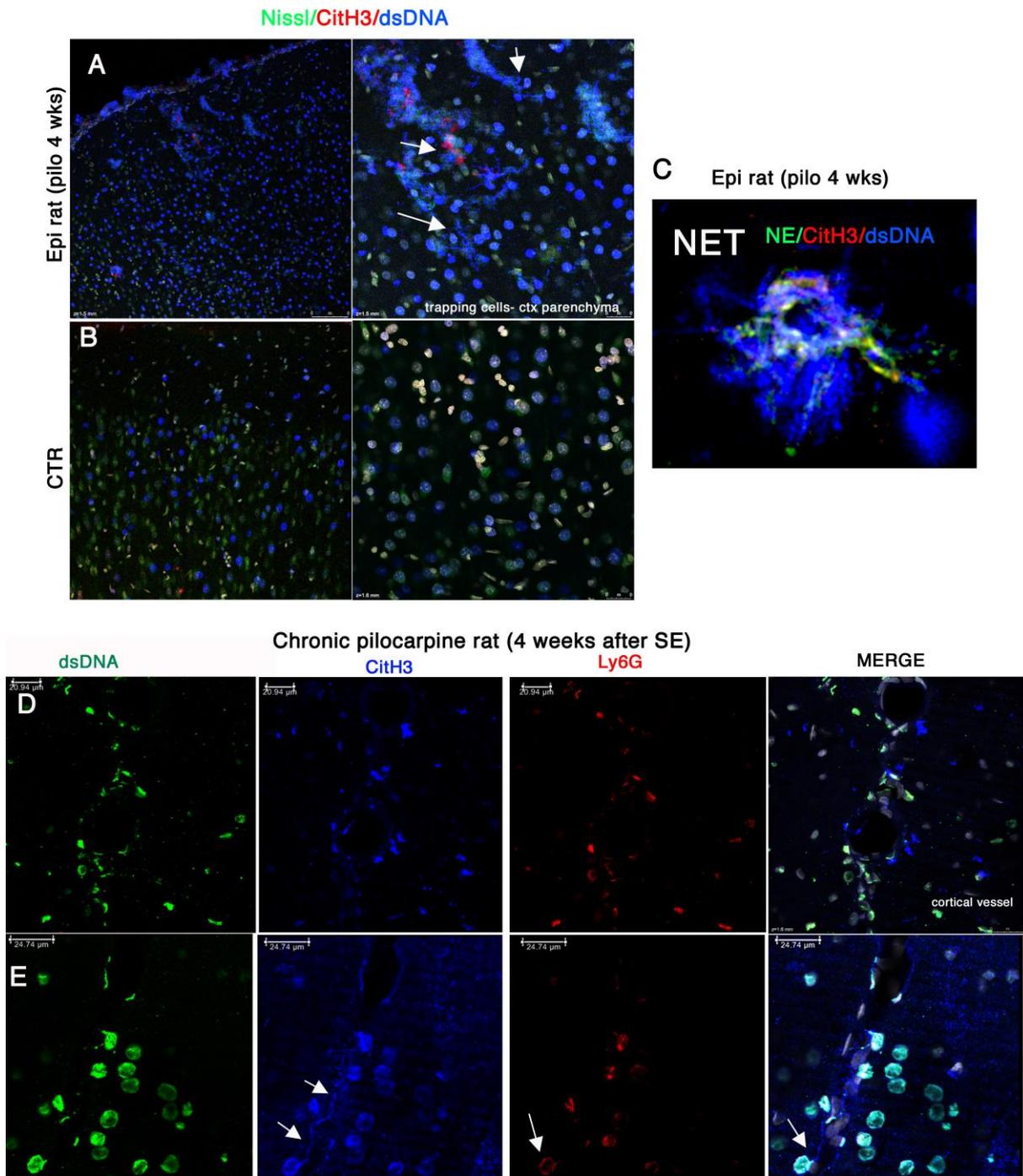
Costi Pubblicazione: costo relativo ad una/due pubblicazione

Figura 1. Analisi di IF confocale rappresentativa dei NET e infiltrati neutrofilici nel parenchima corticale di ratti-pilocarpina cronici (sacrificati 4 settimane dopo l'induzione dello SE e dopo 2 settimane dall'insorgenza delle crisi epilettiche spontanee).

A-B) Tripla-IF condotta su sezioni corticali rappresentative di un ratto PILO cronico (A) e di un ratto controllo naive non epilettico (B) con anticorpi specifici per l'istone citrullinato (**Cit-H3, in rosso**), **dsDNA (in blu)**, controcolorate con **Nissl (verde)**. La presenza di cellule rilascianti NET di **dsDNA**, positive per **Cit-H3** è evidente nel parenchima corticale degli animali epilettici, prevalentemente nei primi strati corticali, e intorno ai vasi (A). Nessuna evidenza di depositi extracellulari o di cellule 'trappanti' è riscontrabile nel parenchima dei ratti controllo (B).

C) Immagine ottenuta da tripla-IF ad alta risoluzione rappresentativa di un neutrofilo (marcato con **neutrofilo elastasi, NE**) rilasciante depositi extracellulari di **dsDNA** positivi per **Cit-H3**.

D-E) Immagini di tripla-IF condotta su sezioni di corteccia di un ratto pilocarpina epilettico cronico, in cui si osservano **neutrofili (marcati con Ly6G)** 'trappanti' filamenti di **dsDNA** positivi per **Cit-H3**, specie in corrispondenza dei vasi (frecche bianche in basso).



REFERENZE

- 1) Bauer J, Becker AJ, Elyaman W, Peltola J, Rüegg S, Titulaer MJ, Varley JA, Beghi E. Innate and adaptive immunity in human epilepsies. *Epilepsia*. 2017 Jul;58 Suppl 3(Suppl Suppl 3):57-68. doi: 10.1111/epi.13784. PMID: 28675562; PMCID: PMC5535008.
- 2) Borella R, De Biasi S, Paolini A, et al. Metabolic reprogramming shapes neutrophil functions in severe COVID-19. *Eur J Immunol*. 2022;52(3):484-502. doi:10.1002/eji.202149481
- 3) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385. PMID: 15001782.
- 4) Carmona-Rivera C, Zhang Y, Dobbs K, Markowitz TE, Dalgard CL, Oler AJ, Claybaugh DR, Draper D, Truong M, Delmonte OM, et al.; NIH COVID Autopsy Consortium; COVID STORM Clinicians; Drolet B, Moon J, Cowen EW, Kenney H, Weber SE, Castagnoli R, Magliocco M, Stack MA, Montealegre G, Barron K, Fink DL, Kuhns DB, Hewitt SM, Arkin LM, Chertow DS, Su HC, Notarangelo LD, Kaplan MJ. Multicenter analysis of neutrophil extracellular trap dysregulation in adult and pediatric COVID-19. *JCI Insight*. 2022 Aug 22;7(16):e160332. doi: 10.1172/jci.insight.160332.
- 5) Christy AL, Walker ME, Hessner MJ, Brown MA. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. *J Autoimmun*. 2013 May;42:50-61. doi: 10.1016/j.jaut.2012.11.003. Epub 2012 Dec 23. PMID: 23267561.
- 6) Colciaghi F, Finardi A, Frasca A, et al. Status epilepticus-induced pathologic plasticity in a rat model of focal cortical dysplasia. *Brain*. 2011;134(Pt 10):2828-2843. doi:10.1093/brain/awr045
- 7) Colciaghi F, Finardi A, Nobili P, Locatelli D, Spigolon G, Battaglia GS. Progressive brain damage, synaptic reorganization and NMDA activation in a model of epileptogenic cortical dysplasia. *PLoS One*. 2014 Feb 27;9(2):e89898. doi: 10.1371/journal.pone.0089898. PMID: 24587109; PMCID: PMC3937400.
- 8) Colciaghi F, Costanza M. Unveiling Leukocyte Extracellular Traps in Inflammatory Responses of the Central Nervous System. *Front Immunol*. 2022 Jul 1;13:915392. doi: 10.3389/fimmu.2022.915392. PMID: 35844591; PMCID: PMC9283689.
- 9) Daniel C, Leppkes M, Muñoz LE, Schley G, Schett G, Herrmann M. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Sep;15(9):559-575. doi: 10.1038/s41581-019-0163-2. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31213698.
- 10) D'Errico P, Boido M, Piras A, Valsecchi V, De Amicis E, Locatelli D, Capra S, Vagni F, Vercelli A, Battaglia G. Selective vulnerability of spinal and cortical motor neuron subpopulations in delta7 SMA mice. *PLoS One*. 2013 Dec 6;8(12):e82654. doi: 10.1371/journal.pone.0082654. PMID: 24324819; PMCID: PMC3855775
- 11) DiStasi MR, Ley K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol*. 2009 Nov;30(11):547-56. doi: 10.1016/j.it.2009.07.012. Epub 2009 Sep 23. PMID: 19783480; PMCID: PMC2767453.
- 12) Fabene PF, Navarro Mora G, Martinello M, Rossi B, Merigo F, Ottoboni L, Bach S, Angiari S, Benati D, Chakir A, Zanetti L, Schio F, Osculati A, Marzola P, Nicolato E, Homeister JW, Xia L, Lowe JB, McEver RP, Osculati F, Sbarbati A, Butcher EC, Constantin G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med*. 2008 Dec;14(12):1377-83. doi: 10.1038/nm.1878. Epub 2008 Nov 23. PMID: 19029985; PMCID: PMC2710311.
- 13) Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy. *J Neuroimmunol*. 2010 Jul 27;224(1-2):22-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.016. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20542576.
- 14) Finardi A, Colciaghi F, Castana L, Locatelli D, Marras CE, Nobili P, Fratelli M, Bramerio MA, Lorusso G, Battaglia GS. Long-duration epilepsy affects cell morphology and glutamatergic synapses in type IIB focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol*. 2013 Aug;126(2):219-35. doi: 10.1007/s00401-013-1143-4. Epub 2013 Jun 21. PMID: 23793416.

- 15) Fonseca-Barriendos D, Frías-Soria CL, Pérez-Pérez D, Gómez-López R, Borroto Escuela DO, Rocha L. Drug-resistant epilepsy: Drug target hypothesis and beyond the receptors. *Epilepsia Open*. 2022 Aug;7 Suppl 1(Suppl 1):S23-S33. doi: 10.1002/epi4.12539. Epub 2021 Oct 22. PMID: 34542940; PMCID: PMC9340308.
- 16) Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2020 Feb;20(2):95-112. doi: 10.1038/s41577-019-0215-7. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31558839.
- 17) Güneş M, Büyükgöl H. Relationship between generalized epileptic seizure and neutrophil/lymphocyte ratio, platelet/lymphocyte ratio, and neutrophil mediated inflammation. *Int J Neurosci*. 2020 Nov;130(11):1095-1100. doi: 10.1080/00207454.2020.1722662. Epub 2020 Feb 6. PMID: 31983256.
- 18) Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke*. 1986 Mar-Apr;17(2):246-53. doi: 10.1161/01.str.17.2.246. PMID: 3961835.
- 19) Hosseini S, Gharedaghi H, Hassannezhad S, Sadeghvand S, Maghari A, Dastgiri S, Talebi M, Khanzadeh S. The Impact of Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Febrile Seizures: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2022 Oct 11;2022:8472795. doi: 10.1155/2022/8472795. PMID: 36267837; PMCID: PMC9578816.
- 20) Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Jun;24(6):668-76. doi: 10.1097/01.WCB.0000117812.35136.5B. PMID: 15181374.
- 21) Kohlhase K, Zöllner JP, Tandon N, Strzelczyk A, Rosenow F. Comparison of minimally invasive and traditional surgical approaches for refractory mesial temporal lobe epilepsy: A systematic review and meta-analysis of outcomes. *Epilepsia*. 2021 Apr;62(4):831-845. doi: 10.1111/epi.16846. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33656182.
- 22) Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010 Jun;51(6):1069-77. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x. Epub 2009 Nov 3. Erratum in: *Epilepsia*. 2010 Sep;51(9):1922. PMID: 19889013.
- 23) Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol*. 2015 Mar;11(3):189-91. doi: 10.1038/nchembio.1735. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25622091; PMCID: PMC4397581.
- 24) Marini O, Costa S, Bevilacqua D, Calzetti F, Tamassia N, Spina C, De Sabata D, Tinazzi E, Lunardi C, Scupoli MT, Cavallini C, Zoratti E, Tinazzi I, Marchetta A, Vassanelli A, Cantini M, Gandini G, Ruzzenente A, Guglielmi A, Missale F, Vermi W, Tecchio C, Cassatella MA, Scapini P. Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood*. 2017 Mar 9;129(10):1343-1356. doi: 10.1182/blood-2016-04-713206. Epub 2017 Jan 4. Erratum in: *Blood*. 2017 Jun 15;129(24):3271.
- 25) Mitsdoerffer M, Aly L, Barz M, Engleitner T, Sie C, Delbridge C, Lepennetier G, Öllinger R, Pfaller M, Wiestler B, Rad R, Meyer B, Knier B, Schmidt-Graf F, Gempt J, Korn T. The glioblastoma multiforme tumor site promotes the commitment of tumor-infiltrating lymphocytes to the TH17 lineage in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Aug 23;119(34):e2206208119. doi: 10.1073/pnas.2206208119.
- 26) Montaldo E, Lusito E, Bianchessi V, et al. Cellular and transcriptional dynamics of human neutrophils at steady state and upon stress. *Nat Immunol*. 2022;23(10):1470-1483. doi:10.1038/s41590-022-01311-1
- 27) Nobili P, Colciaghi F, Finardi A, Zambon S, Locatelli D, Battaglia GS. Continuous neurodegeneration and death pathway activation in neurons and glia in an experimental model of severe chronic epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2015 Nov;83:54-66. doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.002. Epub 2015 Aug 8. PMID: 26264964.

- 28) Özdemir HH, Akil E, Acar A, Tamam Y, Varol S, Cevik MU, Arikanoglu A. Changes in serum albumin levels and neutrophil-lymphocyte ratio in patients with convulsive status epilepticus. *Int J Neurosci*. 2017 May;127(5):417-420. doi: 10.1080/00207454.2016.1187606. Epub 2016 May 24. PMID: 27161531.
- 29) Piconese S, Costanza M, Tripodo C, Sangaletti S, Musio S, Pittoni P, Poliani PL, Burocchi A, Passafaro AL, Gorzanelli A, Vitali C, Chiodoni C, Barnaba V, Pedotti R, Colombo MP. The matricellular protein SPARC supports follicular dendritic cell networking toward Th17 responses. *J Autoimmun*. 2011 Dec;37(4):300-10. doi: 10.1016/j.jaut.2011.09.002. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21962567.
- 30) Qiao S, Sun QY, Zhou P, et al. Increased formation of neutrophil extracellular traps in patients with anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Front Immunol*. 2022;13:1046778. Published 2022 Dec 8. doi:10.3389/fimmu.2022.1046778
- 31) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972 Mar;32(3):281-94. doi: 10.1016/0013-4694(72)90177-0. PMID: 4110397.
- 32) Rossi B, Constantin G, Zenaro E. The emerging role of neutrophils in neurodegeneration. *Immunobiology*. 2020 Jan;225(1):151865. doi: 10.1016/j.imbio.2019.10.014. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31740077.
- 33) Rossini L, De Santis D, Cecchini E, Cagnoli C, Maderna E, Cartelli D, Morgan BP, Torvell M, Spreafico R, di Giacomo R, Tassi L, de Curtis M, Garbelli R. Dendritic spine loss in epileptogenic Type II focal cortical dysplasia: Role of enhanced classical complement pathway activation. *Brain Pathol*. 2023 May;33(3):e13141. doi: 10.1111/bpa.13141. Epub 2022 Dec 23. PMID: 36564349; PMCID: PMC10154370.
- 34) Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity [published correction appears in *Blood*. 2022 Dec 15;140(24):2646-2647]. *Blood*. 2012;120(15):3007-3018. doi:10.1182/blood-2012-03-416156
- 35) Santos-Lima B, Pietronigro EC, Terrabuio E, Zenaro E, Constantin G. The role of neutrophils in the dysfunction of central nervous system barriers. *Front Aging Neurosci*. 2022 Aug 11;14:965169. doi: 10.3389/fnagi.2022.965169. PMID: 36034148; PMCID: PMC9404376.
- 36) Schultzberg M, Lindberg C, Aronsson AF, Hjorth E, Spulber SD, Oprica M. Inflammation in the nervous system--physiological and pathophysiological aspects. *Physiol Behav*. 2007 Sep 10;92(1-2):121-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.05.050. Epub 2007 May 24. PMID: 17597167.
- 37) Shibley H, Smith BN. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Res*. 2002 Apr;49(2):109-20. doi: 10.1016/s0920-1211(02)00012-8. PMID: 12049799.
- 38) Sienel RI, Kataoka H, Kim SW, Seker FB, Plesnila N. Adhesion of Leukocytes to Cerebral Venules Precedes Neuronal Cell Death and Is Sufficient to Trigger Tissue Damage After Cerebral Ischemia. *Front Neurol*. 2022 Jan 24;12:807658. doi: 10.3389/fneur.2021.807658. PMID: 35140676; PMCID: PMC8818753.
- 39) Trias E, King PH, Si Y, Kwon Y, Varela V, Ibarburu S, Kovacs M, Moura IC, Beckman JS, Hermine O, Barbeito L. Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI Insight*. 2018 Oct 4;3(19):e123249. doi: 10.1172/jci.insight.123249. PMID: 30282815; PMCID: PMC6237484.
- 40) Tripodo C, Bassani B, Jachetti E, et al. Neutrophil extracellular traps arm DC vaccination against NPM-mutant myeloproliferation. *Elife*. 2022;11:e69257. doi:10.7554/eLife.69257
- 41) Turrin NP, Rivest S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2004 Jul;16(2):321-34. doi: 10.1016/j.nbd.2004.03.010. PMID: 15193289.
- 42) Vaibhav K, Braun M, Alverson K, Khodadadi H, Kutiyawalla A, Ward A, Banerjee C, Sparks T, Malik A, Rashid MH, Khan MB, Waters MF, Hess DC, Arbab AS, Vender JR, Hoda N, Baban B,

- Dhandapani KM. Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. *Sci Adv.* 2020 May 29;6(22):eaax8847. doi: 10.1126/sciadv.aax8847. PMID: 32523980; PMCID: PMC7259928.
- 43) Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* 2005 Nov;46(11):1724-43. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x. PMID: 16302852.
 - 44) Wang Q, Doerschuk CM. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Feb;4(1):39-47. doi: 10.1089/152308602753625843. PMID: 11970842.
 - 45) Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Sci Signal.* 2008 May 27;1(21):pe25. doi: 10.1126/stke.121pe25. PMID: 18506034.
 - 46) Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature.* 1981 Feb 19;289(5799):646-50. doi: 10.1038/289646a0. PMID: 7464931.
 - 47) Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M; Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med.* 2001 Aug 2;345(5):311-8. doi: 10.1056/NEJM200108023450501. PMID: 11484687.
 - 48) Yigit Y, Yilmaz S, Akdogan A, Halhalli HC, Ozbek AE, Gencer EG. The role of neutrophil-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width in the classification of febrile seizures. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Feb;21(3):554-559. PMID: 28239812.
 - 49) Yousefi S, Stojkov D, Germic N, Simon D, Wang X, Benarafa C, Simon HU. Untangling "NETosis" from NET. *Eur J Immunol.* 2019 Feb;49(2):221-227. doi: 10.1002/eji.201747053. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30629284.
 - 50) Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, Turano E, Rossi B, Angiari S, Dusi S, Montresor A, Carlucci T, Nani S, Tosadori G, Calciano L, Catalucci D, Berton G, Bonetti B, Constantin G. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):880-6. doi: 10.1038/nm.3913. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26214837.
 - 51) Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):104-7. doi: 10.1038/nature08780. PMID: 20203610; PMCID: PMC2843437.