

BANDO LICE 2019

Title: **Understand auto-antibodies mediated epilepsy: a new experimental approach and therapeutic targets.**

Title: **Comprendere le encefalopatie autoimmuni con epilessia: un nuovo approccio sperimentale e possibili target terapeutici**

PI: **Dott.ssa Chiara Pastori**

Rendicontazione semestrale

Obiettivi della Ricerca

L'obiettivo principale dello studio è testare se gli autoanticorpi presenti nel plasma dei pazienti affetti da encefalopatia autoimmune con crisi epilettiche modificano l'eccitabilità neuronale. Il progetto prevede inoltre di definire se e come le cellule del sistema immunitario (in particolare le cellule mononucleate, PBMCs - Peripheral Blood Mononuclear Cells) e altri componenti del siero (albumina) contribuiscano agli effetti acuti neuro-vascolari e pro-infiammatori mediati da autoanticorpi diretti contro antigeni neuronali di superficie. Durante la prima fase del progetto si valuterà il ruolo dei mononucleati (PBMC) e dell'albumina nella generazione di attività epilettica e della attivazione cerebrovascolare nelle malattie anticorpo-mediate.

Metodologia applicata

Tutti gli esperimenti finora effettuati sono stati eseguiti nel preparato di cervello di cavia isolato mantenuto in vitro mediante perfusione arteriosa. I PBMC sono stati isolati: i) da sangue intero di donatori sani (controlli; n=9) e ii) da pazienti affetti da encefalopatia autoimmune o sospetta autoimmune con crisi epilettiche (n=3). I PBMC isolati da donatori sani sono stati: i) messi in coltura per 48h senza alcun trattamento (n=2); ii) trattati con Concanavalina-A (ConA, 2 microg / ml; n=7) per 48 ore per indurre attivazione policlonale e mimare il presunto stato di attivazione dei PBMC dei pazienti. Dopo le 48 ore, sia i PBMC attivati con la ConA sia i PBMC non attivati, sono stati perfusi nel cervello isolato di cavia.

I PBMC isolati dai pazienti sono stati immediatamente perfusi nel cervello isolato di cavia. In ogni esperimento sono stati iniettati tra i 6.000.000 e i 10.000.000 PBMC. La perfusione dei PBMC è stata sempre preceduta da perfusione di lipopolisaccaride (LPS, 100ng/ml) e da albumina ricombinante umana (1 g/l) al fine di riprodurre il danno di barriera ematoencefalica spesso riscontrato nei pazienti affetti da encefalopatia autoimmuni con crisi epilettiche.

Esperimenti di controllo sono stati effettuati al fine di garantire i risultati ottenuti (vedi Experimental Approach, protocolli a, c, e, g; n=7)

Alla fine di ogni esperimento, il preparato di cervello isolato di cavia è stato sottoposto a fissazione per immersione in una soluzione al 4% di paraformaldeide e successivamente tagliato e sottoposto a reazioni di

immunoistochimica per valutare i) infiammazione cerebrale (con Abs anti-IBA1, -IL-1beta, ii) attivazione cerebrovascolare (con Abs anti-ICAM-1).

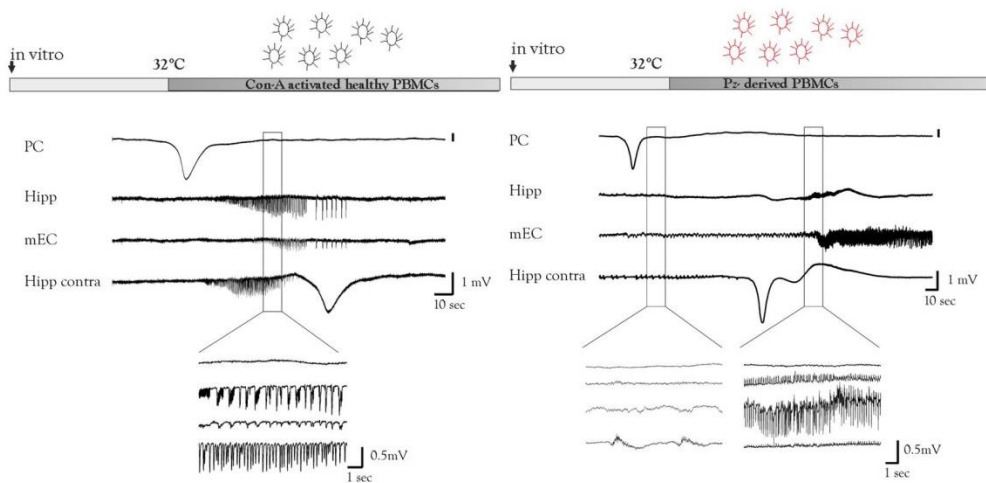
EXPERIMENTAL APPROACH



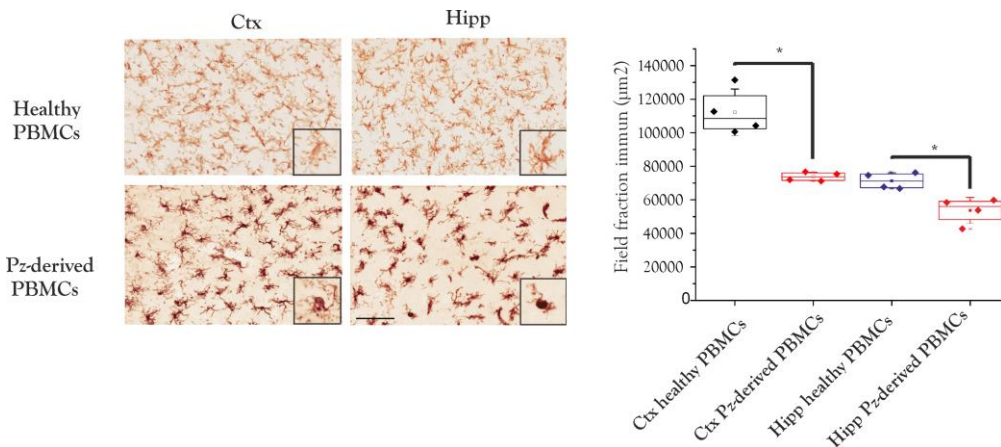
Risultati

I risultati ottenuti in questa prima fase del progetto hanno dimostrato che: i) la perfusione di LPS e albumina non è in grado di indurre alcuna attività epilettiforme, ii) la perfusione di LPS+albumina+PBMC prelevati da controlli sani e mantenuti in coltura senza alcun stimolo non induce alcuna attività epilettiforme, iii) la Concanavalina A di per se non altera l'eccitabilità neuronale.

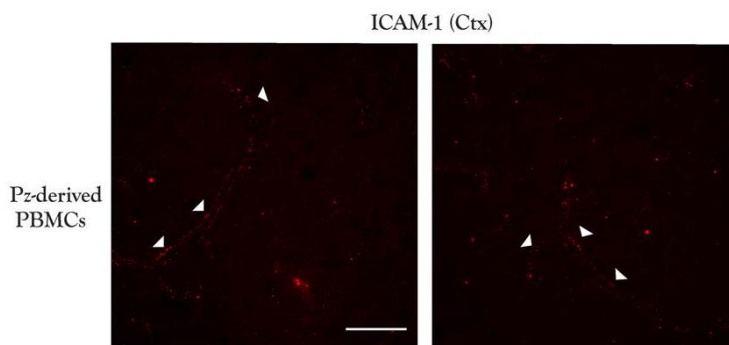
Viceversa, la perfusione di LPS+albumina e di i) PBMC prelevati da soggetti sani e attivati con la Concanavalina A per 48 e ii) PBMC prelevati dai pazienti affetti da encefalopatia autoimmune con crisi, è in grado di indurre attività critica e di indurre attivazione microgliale (sinonimo di infiammazione cerebrale) e di favorire l'espressione endoteliale della molecola di adesione endoteliale ICAM-1 (sinonimo di attivazione vascolare).



Attività epilettiforme simultaneamente registrata in corteccia entorinale mediale (mEC) ed ippocampo dopo perfusione arteriosa di LPS+albumina+PBMCs attivati con Concanavalina-A (sinistra) o PBMCs di pazienti affetti da encefalopatia autoimmune con crisi (destra)



Immagini al microscopio ottico di una sezione di corteccia cerebrale e ippocampo di cervelli perfusi con PBMCs di controllo e PBMCs di pazienti affetti da encefalopatia autoimmune con crisi. Le immagini mostrano una reazione immunoistochimica per la proteina Iba-1, marker della microglia. Scale bar 100µm. Box 50 µm (sinistra). Quantificazione della marcatura di Iba-1 (* p< 0.05; destra).



Immagini al microscopio confocale di sezioni di corteccia cerebrale di cervelli perfusi con PBMCs di pazienti affetti da encefalopatia autoimmune con crisi. Le immagini mostrano una reazione immunoistochimica per la proteina ICAM-1, marker di attivazione endoteliale. Scale bar 50 µm.

Conclusioni

I dati ottenuti dagli esperimenti eseguiti nell'ambito di questa prima parte del progetto hanno dimostrato che in presenza di un'alterazione della permeabilità di barriera ematoencefalica che facilita l'ingresso nel parenchima cerebrale di mediatori di infiammazione e di proteine del siero (e.g. albumina), la perfusione, e quindi l'entrata in contatto con il parenchima cerebrale di cellule del sistema immunitario (PBMC) attivate, e quindi in grado di liberare citochine pro-infiammatorie, contribuisce a modificare l'eccitabilità neuronale inducendo attività critica.

