



SEASON TWO

7 Aprile 2022

I sistemi serotoninergico e endocannabinoide sono coinvolti nella genesi dell'epilessia da assenza? Indagine di immunofluorescenza a livello di *substantia nigra*

Giulia Salamanca¹, Cristiano Bombardi¹, Annamaria Grandis¹, Claudio Tagliavia¹

¹DIMEVET - Servizio di Anatomia e Fisiologia

Background

L'epilessia da assenza (AS) è una forma di epilessia generalizzata che si manifesta con vere e proprie "crisi da assenza non convulsive": improvvisi e brevi momenti di perdita di coscienza associati a un mancato controllo dei movimenti volontari e lievi contrazioni miocloniche del viso^[1]. Queste crisi sono caratteristiche delle forme di epilessia giovanile dell'Uomo come la Childhood absence epilepsy (CAE) e la Juvenile absence epilepsy (JAE) e, inoltre, sono state osservate anche nel cane^[2-4]. L'esatta patogenesi dell'AS non è stata ancora del tutto chiarita e nuove evidenze mostrano che la sostanza nera nella sua parte reticolare (SNr), componente dei nuclei della base, possa svolgere un ruolo chiave^[1]. Numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento dei sistemi serotoninergico (5-HT) e endocannabinoide (eCB) in corso di altre forme epilettiche e, alcune evidenze scientifiche, fanno presupporre che lo siano anche in corso di epilessia da assenza. Nello specifico sembra che il recettore serotoninergico 2C (5HT_{2C}) e il recettore cannabinoide CB₁ (CB_{1r}) possano agire in sinergia nel modulare il loop talamo-corticale che si genera in corso di AS⁵

Scopo del lavoro

Date le evidenze riguardanti il coinvolgimento dei sistemi 5-HT e eCB in altre forme di epilessia e l'implicazione della SNr in corso di AS^{1,5}, lo scopo del presente lavoro è quello di indagare il comportamento dei due sistemi in corso di AS, andando a valutare attraverso metodiche di immunofluorescenza, la distribuzione dei recettori 5HT_{2C}, CB₁ e dell'enzima anabolico del sistema eCB DGL α (diacylglycerol lipase α) a livello di SNr in encefali di ratti GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) rappresentanti il modello genetico di elezione per l'AS⁶, WISTAR e NEC (Nonepileptic Control) utilizzati invece come controlli negativi.

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 18 ratti (6 GAERS, 6 NEC e 6 Wistar) suddivisi equamente per età (P15, P25 e P90). Gli animali sono stati anestetizzati con una miscela iniettata per via intraperitoneale (4.0 ml/kg) composta da pentobarbitale sodico (48 mg/kg) e cloralio idrato (40 mg/kg) e perfusi intracardialmente usando una pompa peristaltica (flusso 30–35 ml/min) iniettando: soluzione salina 0.9% (+4 °C) per 2 min, e successivamente paraformaldeide 4%-glutaraldeide 0.2% in 0.1 M PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.4 (flusso 10 ml/min) per 30 min. Gli encefali sono stati rimossi dal cranio e fissati per 2-4 h, dopo di che sono stati crioprotetti in una soluzione PBS contenente al 30% Saccarosio a +4°C per 48h. Si è proceduto quindi al congelamento rapido in azoto liquido e al taglio di sezioni seriali coronali di 15 μ m (3 sezioni per ogni soggetto) effettuate al criostato e apposte su vetrini gelatinizzati. Le sezioni sono state quindi processate attraverso la tecnica

dell'immunofluorescenza in camera umida (vd SOP ANFI ANV 053), utilizzando i seguenti anticorpi primari: Mouse anti 5HT_{2c} (Santacruz, #SC-17797; 1:100) e Rabbit anti-CB₁ (Frontier Institute, #CB1RBAF380; 1:100); Mouse anti 5HT_{2C} (Santacruz, #SC-17797; 1:100) e Rabbit anti-DGL α (Frontier Institute #DGLaRbAf380; 1:100) e secondari: Goat anti-Rabbit TRITC (Chemicon #AP132R; 1:200) E Goat anti-Mouse FITC (Cynagen #NOTYET FB1/80; 1:200). Si è quindi proceduto con la chiusura dei vetrini utilizzando Buffer glicerolo e DAPI.

Risultati e Conclusioni

Sia il DGLa che il recettore 5HT_{2C} forniscono un'evidente marcatura a carico del corpo dei neuroni. La densità dei neuroni immunoreattivi per il DGLa non mostra differenze significative comparando NEC GAERS e WISTAR a P₁₅, a P₂₅ si osserva in maniera statisticamente significativa un maggior numero di neuroni DGLa immunoreattivi nei WISTAR rispetto sia ai NEC sia ai GAERS, tale differenza si manifesta in maniera ancora più evidente nei ratti a P₉₀ (soprattutto comparando WISTAR a GAERS). La densità dei neuroni immunoreattivi per il recettore 5HT_{2c} è sempre maggiore in maniera statisticamente significativa nei WISTAR rispetto a NEC e soprattutto GAERS nei tre tempi (P₁₅, P₂₅, P₉₀). A P₉₀ si osserva la più evidente differenza di densità soprattutto tra WISTAR e GAERS. Le analisi di colocalizzazione del recettore 2C con il DGLa non mostrano alcuna differenza significativa nei tre gruppi a P₁₅; a P₂₅ differenze statisticamente significative si osservano solo tra NEC e WISTAR, mentre a P₉₀ tra WISTAR e GAERS. Dai risultati ottenuti si evidenzia come nei GAERS la SNr mostri una bassa densità di neuroni immunoreattivi per entrambi gli antigeni esaminati. Tale aspetto si riflette nei GAERS a P₉₀ in una differente colocalizzazione del 5HT_{2c} con il DGLa rispetto in particolare ai WISTAR. In conclusione nei ratti che mostrano AS si osserva un'alterazione dell'espressione del recettore 5HT_{2C} e del DGLa rispetto al gruppo di controllo (WISTAR). I risultati sulla doppia immunofluorescenza CB₁/2C sono ancora in fase di valutazione.

Bibliografia

- [1] Crunelli V, Lőrincz ML, McCafferty C, et al. Clinical and experimental insight into pathophysiology, comorbidity and therapy of absence seizures. *Brain*. 2020;143(8):2341-2368. doi:10.1093/brain/awaa072
- [2] Poma R, Ochi A, Cortez MA. Absence seizures with myoclonic features in a juvenile Chihuahua dog. *Epileptic Disord*. 2010;12(2):138-141. doi:10.1684/epd.2010.0312
- [3] Wielaender F, James F m. k., Cortez M a., et al. Absence Seizures as a Feature of Juvenile Myoclonic Epilepsy in Rhodesian Ridgeback Dogs. *J Vet Intern Med*. 2018;32(1):428-432. doi:10.1111/jvim.14892
- [4] Lorenz MD, Coates J, Kent M. *Handbook of Veterinary Neurology - E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2010.
- [5] Colangeli R, Teskey GC, Di Giovanni G. Endocannabinoid-serotonin systems interaction in health and disease. *Prog Brain Res*. 2021;259:83-134. doi:10.1016/bs.pbr.2021.01.003
- [6] Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998;55(1):27-57. doi:10.1016/S0301-0082(97)00091-9

Indicare, apponendo una "X":

▪ La **casata** di appartenenza

One Health

Blue Growth

Fundamental Sciences

Clinical Sciences

Animal Production

▪ La **tipologia** del proprio progetto

Individual Research

Team Work

Travelling Scientists