

Riunione annuale SIN Umbro-Marchigiana

Perugia 7 Dicembre 2016

## La giunzione neuro-muscolare ed oltre: dalla miastenia all'epilessia

Amelia Evoli

Istituto di Neurologia, Università Cattolica, Roma

## La miastenia gravis come prototipo di malattia anticorpo-mediata

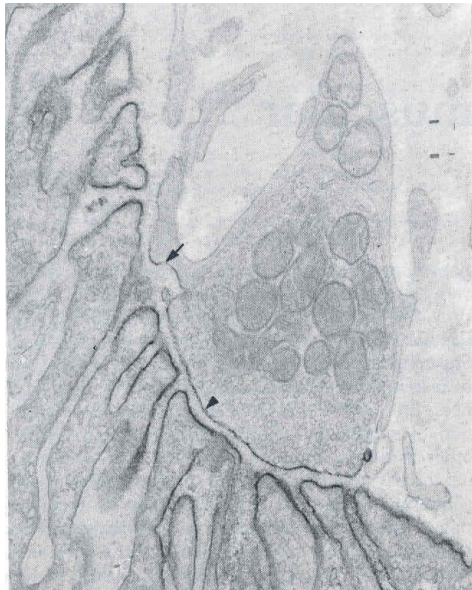
- Negli ultimi 10 anni, sono state identificate numerose patologie neurologiche anticorpo (Ab)-mediate
- Ab contro canali ionici o proteine sinaptiche causano in ampio spettro di alterazioni nel sistema nervoso centrale e periferico che possono essere trattate efficacemente
- la miastenia gravis (MG), una rara malattia della giunzione neuromuscolare, è stata un modello per la comprensione dei meccanismi patogenetici, per la diagnosi e la terapia di queste patologie.

# Miastenia gravis: disturbo postsinaptico della giunzione neuro-muscolare

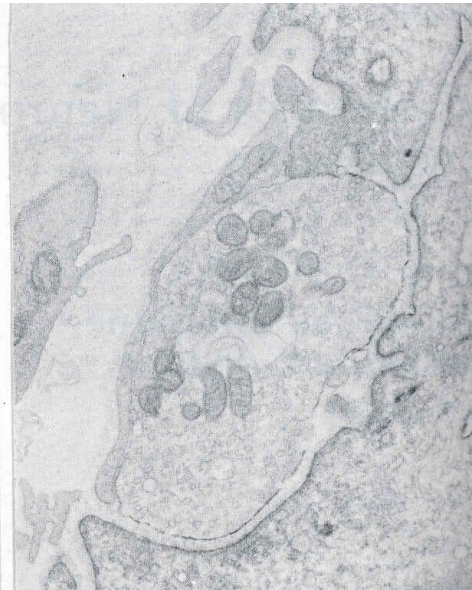
Perdita di recettori dell'acetilcolina e alterazioni della membrana post-sinaptica → blocco della trasmissione neuromuscolare



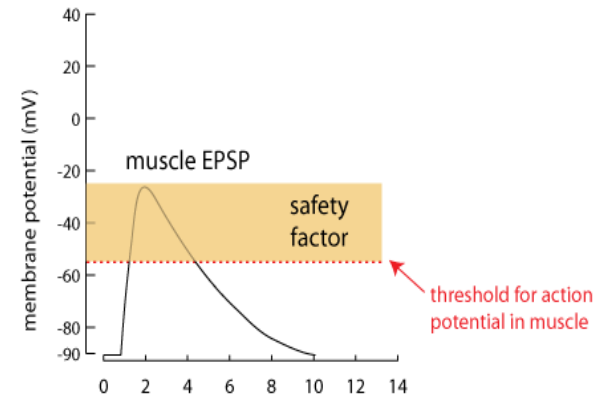
deficit di forza ed esauribilità dei muscoli scheletrici



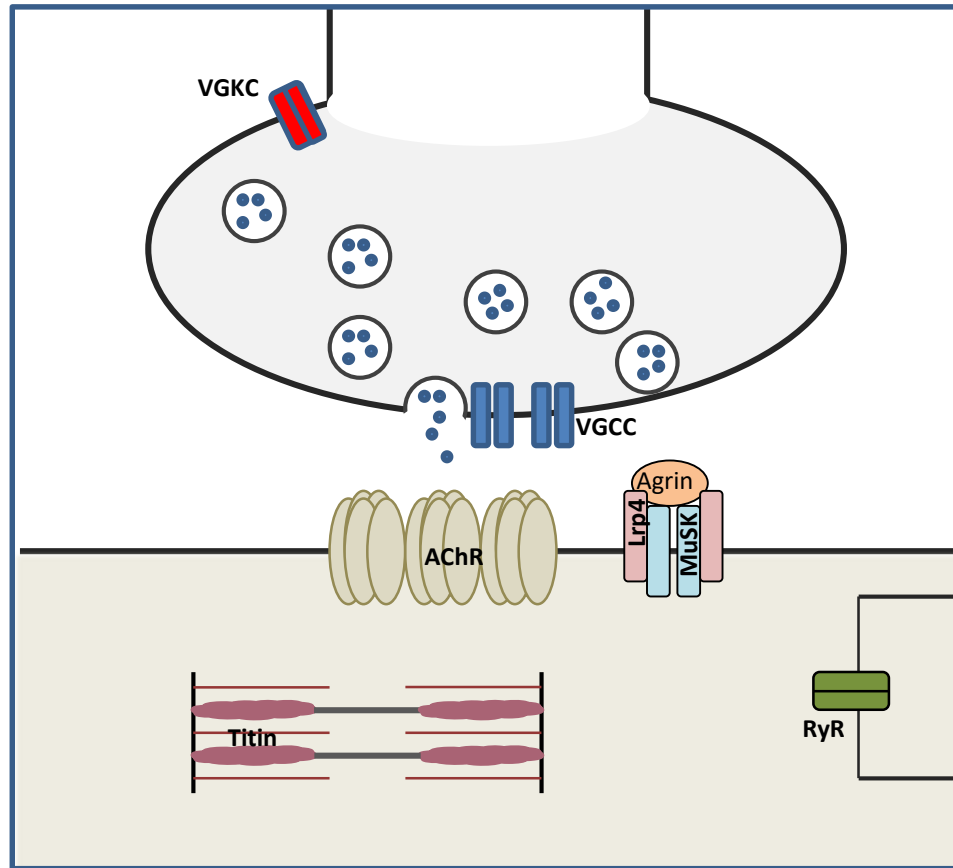
Normale



Miastenia anti-AChR +



# Antigeni della giunzione neuro-muscolare



**AChR:** recettore dell'acetilcolina **MuSK:** tirosinchinasi muscolo-specifica

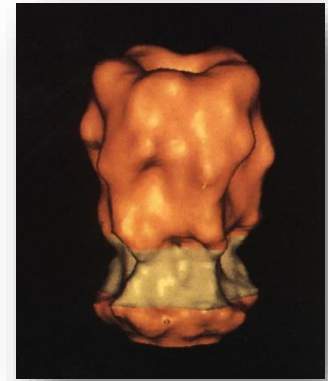
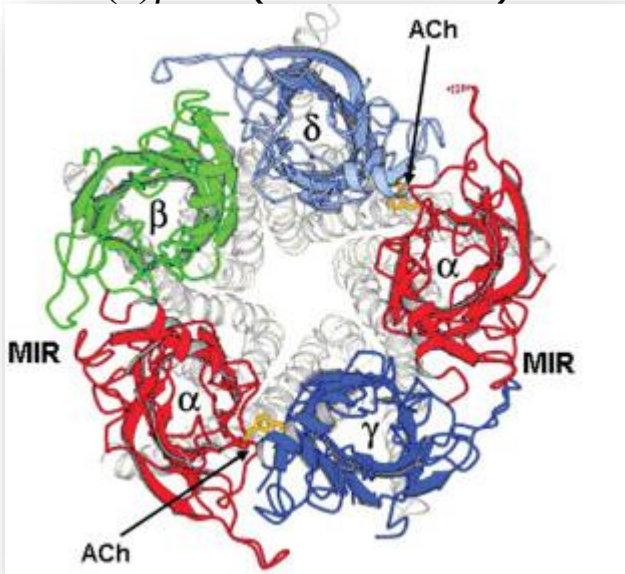
**Lrp4:** LDL receptor-related protein 4; **RyR:** recettore della rianodina

**VGCC:** canale voltaggio-dipendente del Ca; **VGKC:** canale voltaggio-dipendente del K

# L' AChR è il principale antigene nella MG

$\alpha 1(2)\beta 1\gamma\delta$  (AChR fetale)

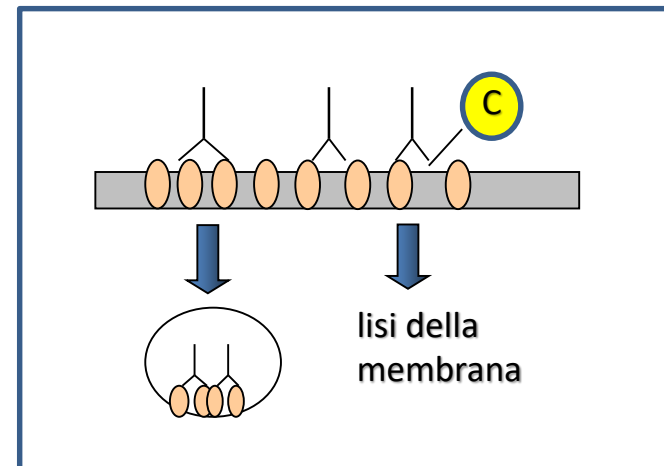
$\alpha 1(2)\beta 1\varepsilon\delta$  (AChR adulto)



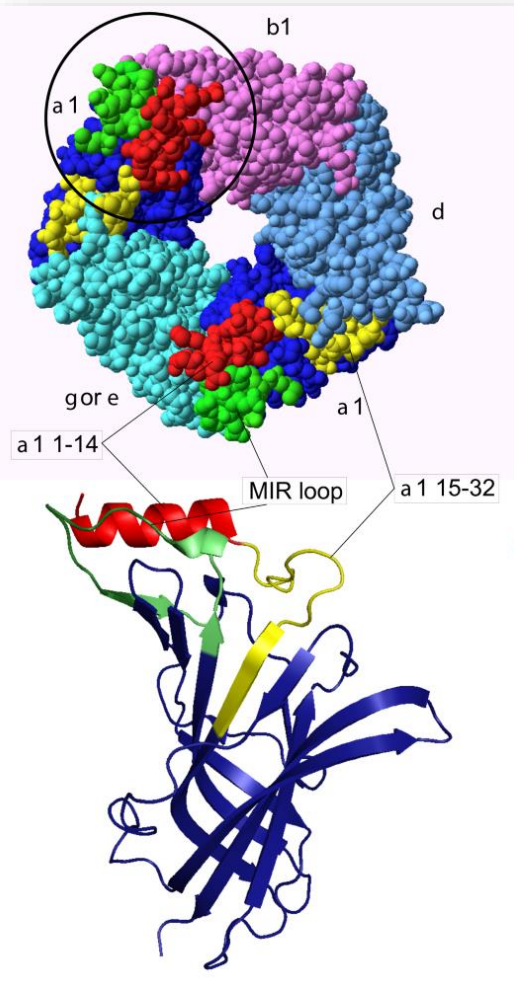
- gli Ab anti-AChR Abs sono IgG1
- legano il recettore nella conformazione nativa
- causano una marcata perdita di AChR e gravi alterazioni della membrana post-sinaptica

Con due principali meccanismi:

- aumento della degradazione del recettore
- attivazione del complemento



Il 50% degli anti-AChR Ab riconosce la "main immunogenic region" nella regione extracellulare della subunità  $\alpha$



La MIR consiste di due sequenze adiacenti solo nella conformazione tridimensionale:

- il loop  $\alpha$  67–76 principale sito antigenico
- la sequenza  $\alpha$ 1–14 N-terminale

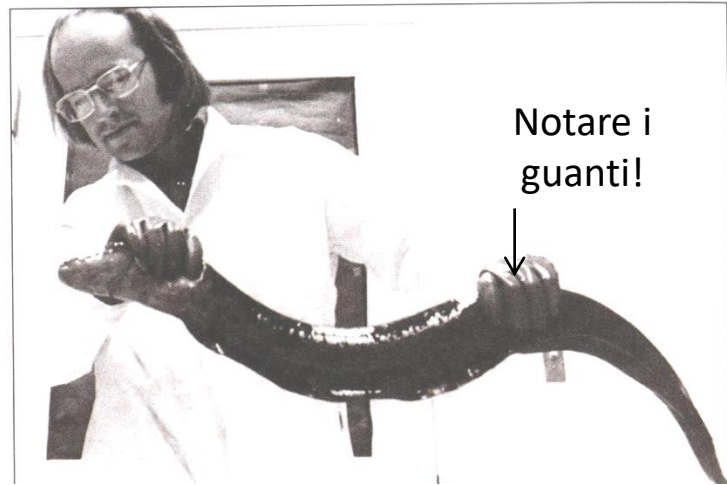
mAb anti-MIR :

- trasferiscono passivamente la malattia
- come gli Ab presenti nei pazienti inducono:
  - lisi complemento-mediata della membrana
  - modulazione antigenica del recettore

Il livello di Ab anti-MIR nei pazienti:

- correla meglio con il quadro clinico del livello totale degli Ab anti-AChR

# Vantaggi sperimentali nello studio della miastenia



Notare i guanti!

J. Lindstrom con l' *Electrophorus electricus*

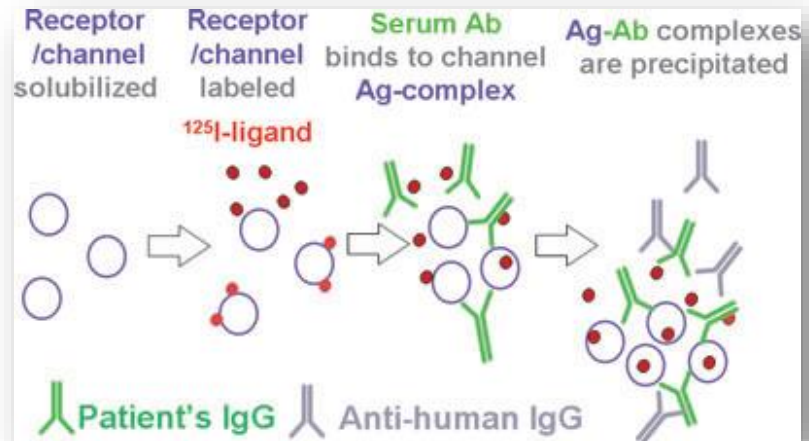
## Evidenza della patogenesi autoimmune:

### • induzione di miastenia sperimentale autoimmune:

- immunizzazione con l' AChR
- trasferimento passivo con siero/IgG di pazienti

### • dimostrazione della perdita di AChR alle NMJ di pazienti mediante $\alpha$ -bungarotossina marcata

## Dosaggio degli Ab nel siero con RIA



*Bungarus multicinctus*

# MG con Ab anti-AChR (AChR-MG)

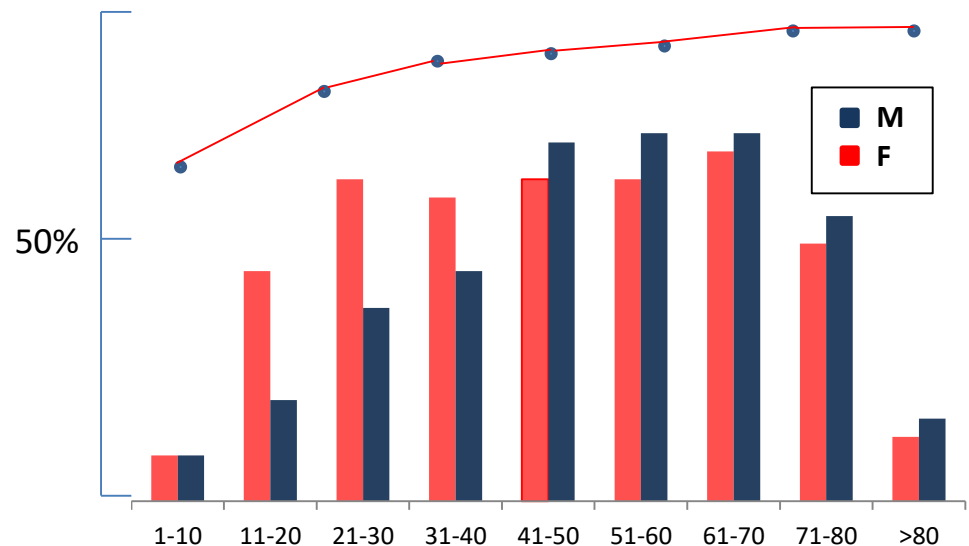
Con il RIA standard, Ab anti-AChR Ab presenti:

- nel 85-90% dei pazienti con MG generalizzata
- in ~50% dei casi con sintomi oculari

## Aspetti clinici:

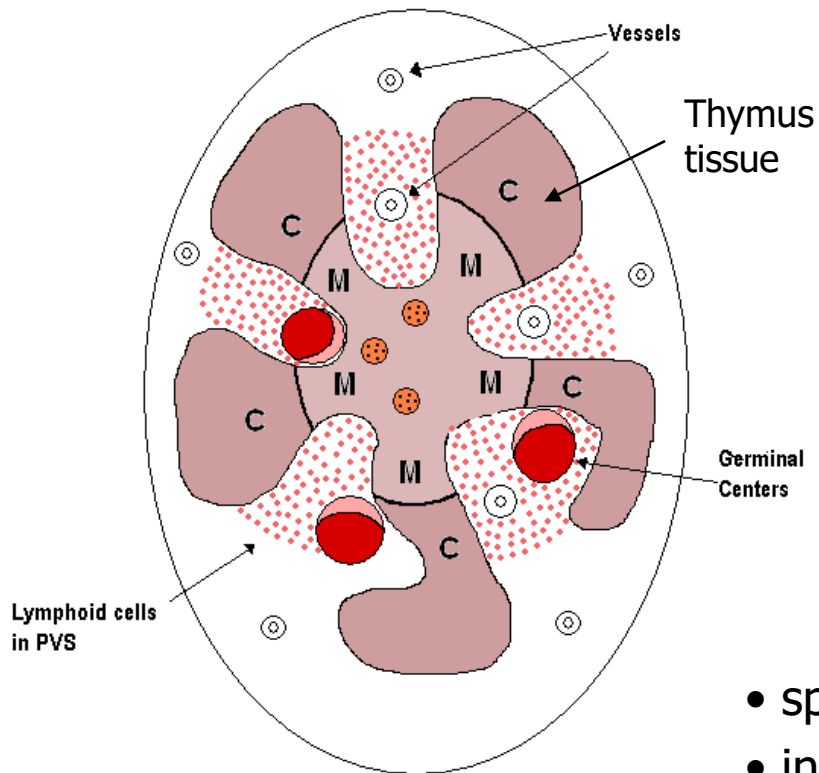
- La positività anticorpale aumenta con l'età di esordio
  - 60-70% in età pediatrica → >95% dei casi con esordio oltre i 60 aa.
- marcata variabilità nell'estensione e gravità dei deficit
- associazione con anomalie timiche
  - iperplasia linfo-follicolare
  - timoma

Positività degli AChR Ab





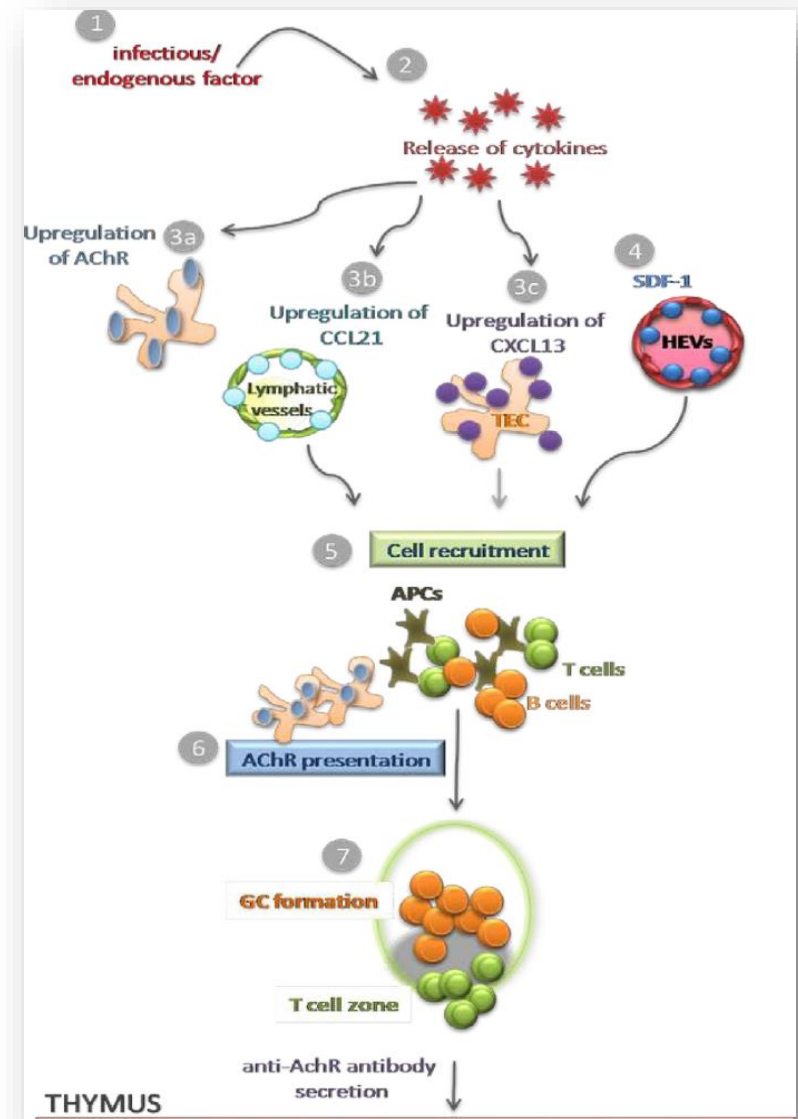
# Iperplasia timica nella MG



- spazi perivascolari espansi
- infiltrazione di B linfociti periferici
- follicoli linfatici con centri germinativi
- cellule midodi che esprimono l' AChR ( $\alpha 1(2)\beta\gamma\delta$ )

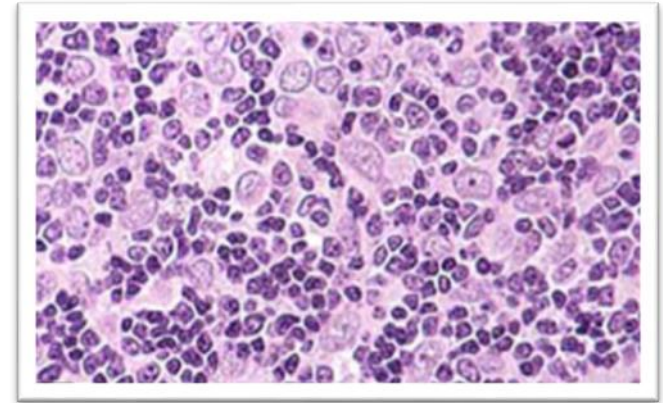
# Iperplasia timica e produzione di anticorpi anti-AChR

- ① la risposta innata a patogeni (EBV) può indurre alterazioni infiammatorie nel timo (Cavalcante, 2010)
- ② rilascio di citochine infiammatorie (IFN type I-II, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Cufi, 2014)
- ③ iper-espressione della subunità  $\alpha$  dell' AChR e di chemochine e ④ neo-angiogenesi (Weiss, 2013)
- ⑤ infiltrazione di linfociti T e B periferici nel timo e ⑥ sensibilizzazione verso l'AChR (Leite, 2007)
- ⑦ formazione di centri germinativi e produzione cronica di anticorpi anti-AChR

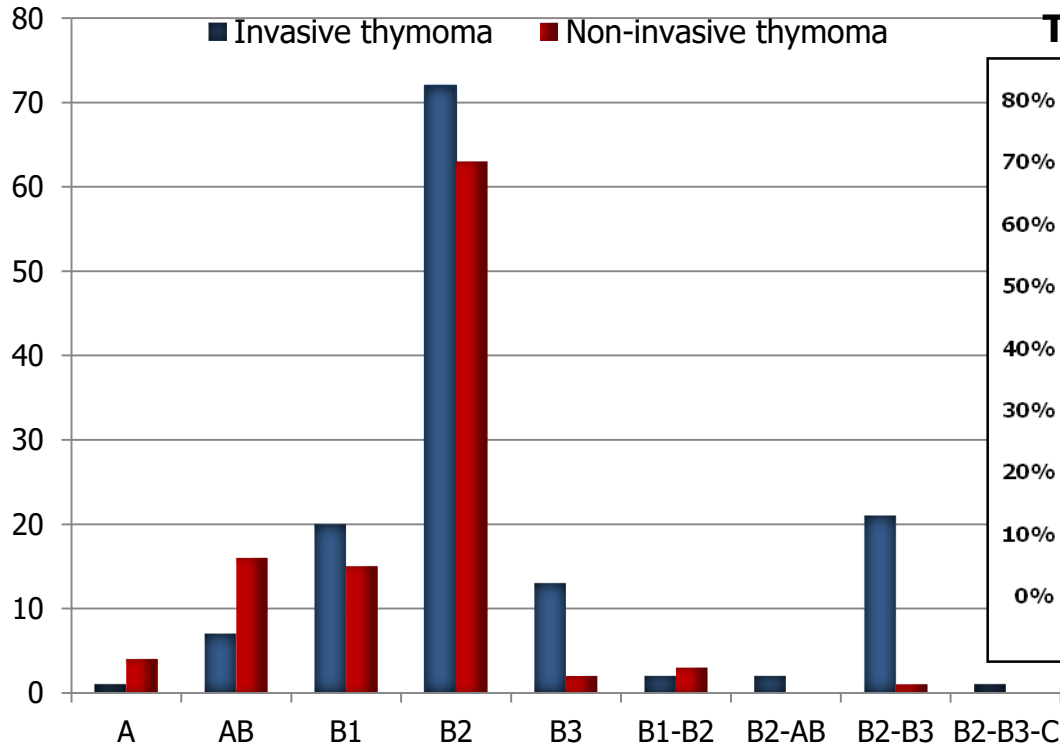




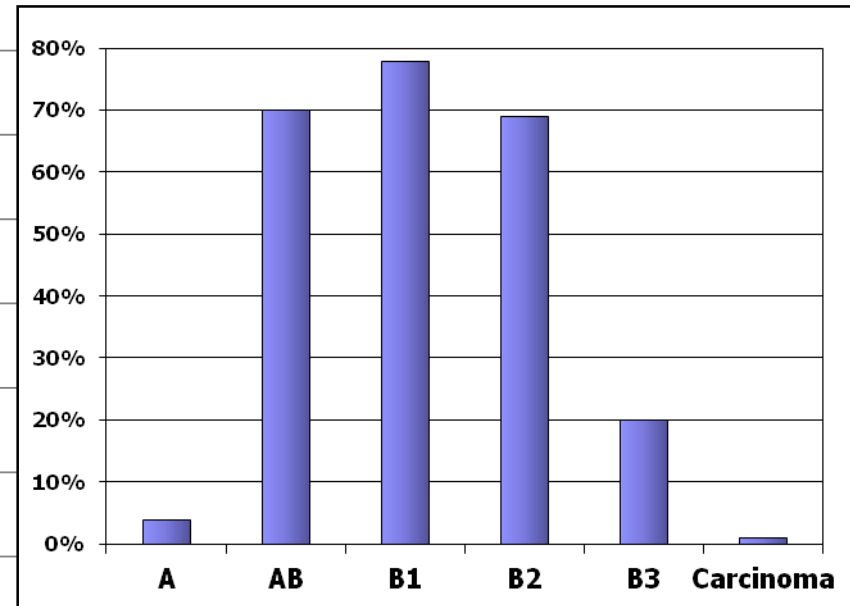
# Il timoma associato a MG ha funzione timopoietica



Sottotipi di timoma associati a MG

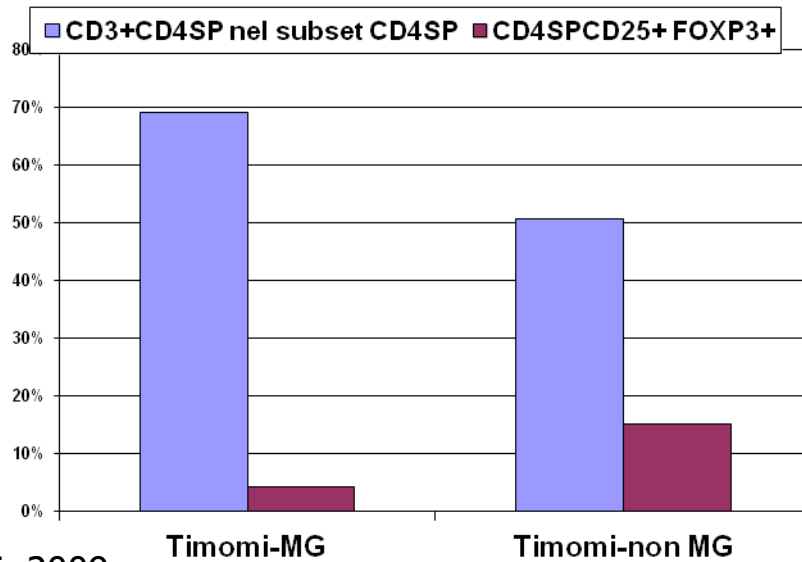


Timopoiesi (% di timociti CD4+CD8+)

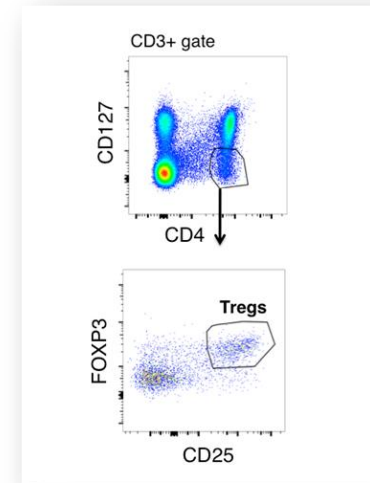


# Patogenesi della MG timoma-associata

- Espressione nel timoma di singole subunità dell'AChR e di proteine del muscolo striato
- Esportazione di linfociti T maturi CD4<sup>+</sup> autoreattivi e ridotta produzione di Treg associate alla presenza di MG (Evoli & Lancaster, 2014)



Fattorossi, 2009



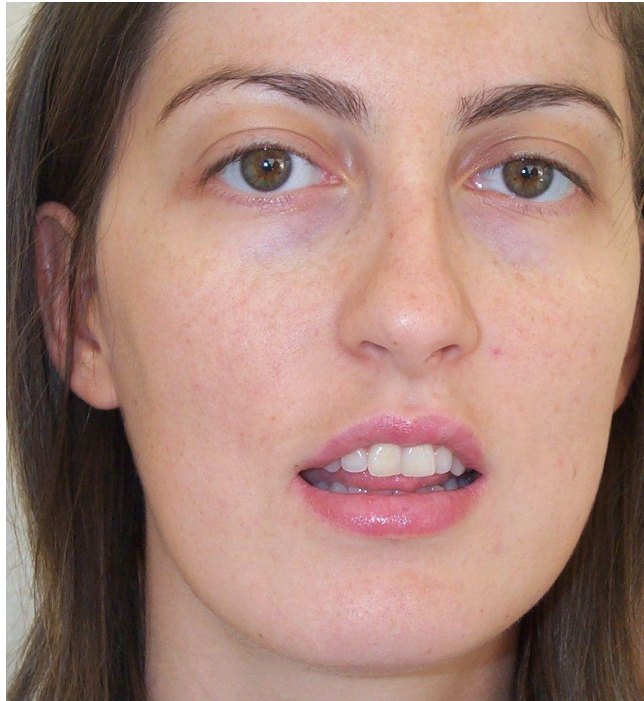
Alterazioni presenti sia nei timomi primitivi che nelle recidive tumorali

# MG generalizzata anti-AChR positiva

	<b>Early-onset</b>	<b>Associata a timoma</b>	<b>Late-onset</b>
Età di esordio	≤ 50 aa.	40-60 aa. (prevalentemente)	> 50 aa.
M:F	1:4	1:1	1.5:1
Patologia timica	iperplasia	timoma AB e B	normale per l'età (rara iperplasia)
Ab anti-titina	<10%	80-90%	50-60%
Ab anti-RyR	-	50-70%	20-30%

# Indicazione alla timectomia nella AChR-MG early-onset

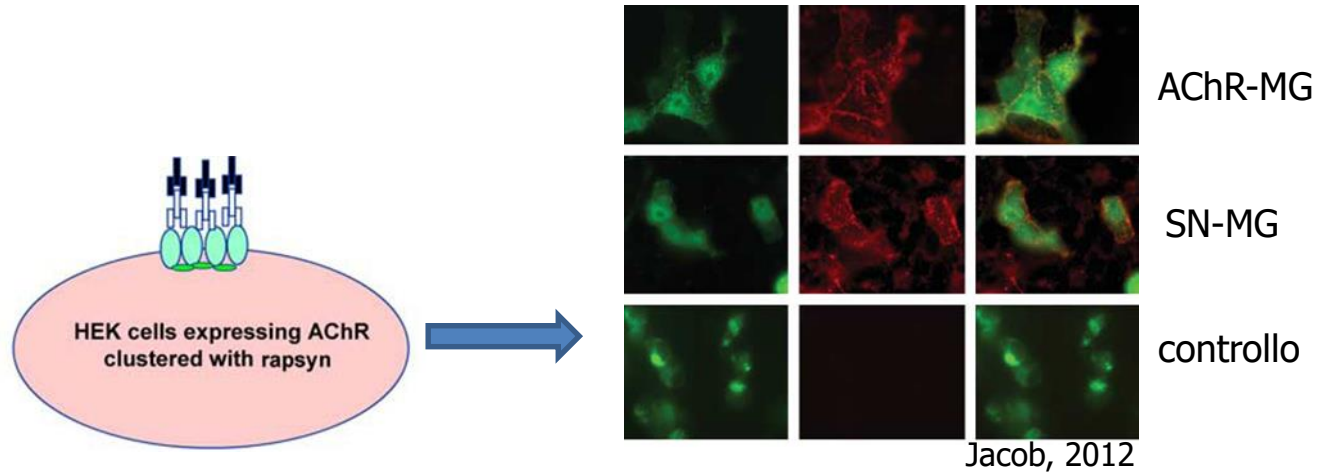
Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. N Engl J Med 2016



In altre forme di MG la terapia è prevalentemente immunosoppressiva



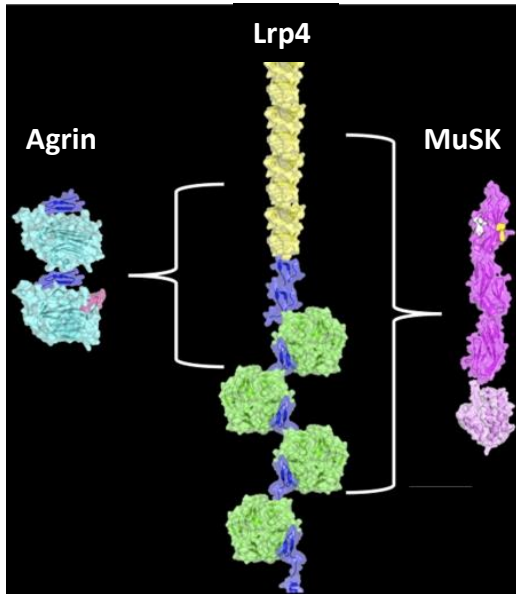
# Anticorpi anti-AChR "clustered"



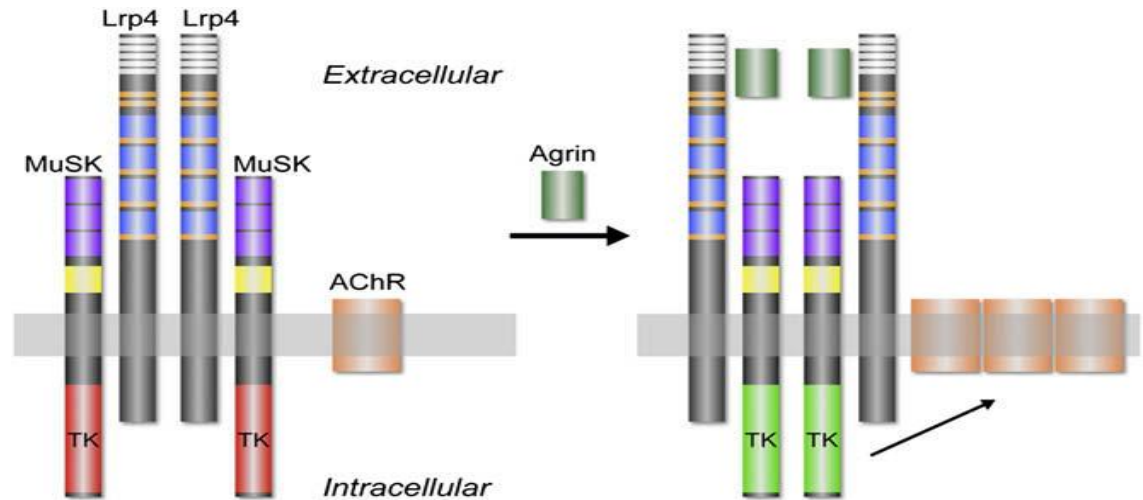
## Aspetti clinici

- Variabilità clinica ma con prevalenza di forme oculari (Devic, 2014) e generalizzate lievi (Rodriguez Cruz, 2015; Zhao, 2015)
- Questi anticorpi sono IgG1 che attivano il complemento e possono essere associati a iperplasia timica (Leite, 2008; Devic, 2014) e timoma (Devic 2014; Zhao, 2015)
- La forma clinica associata ha la stessa patogenesi della MG AChR-positiva al RIA ed analoghe caratteristiche cliniche



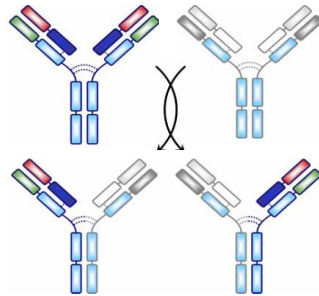
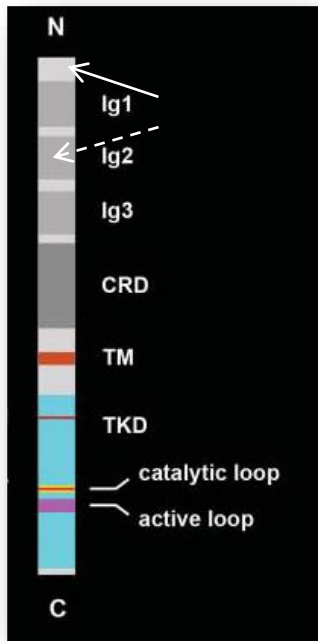


## Complesso agrina-MuSK-Lrp4

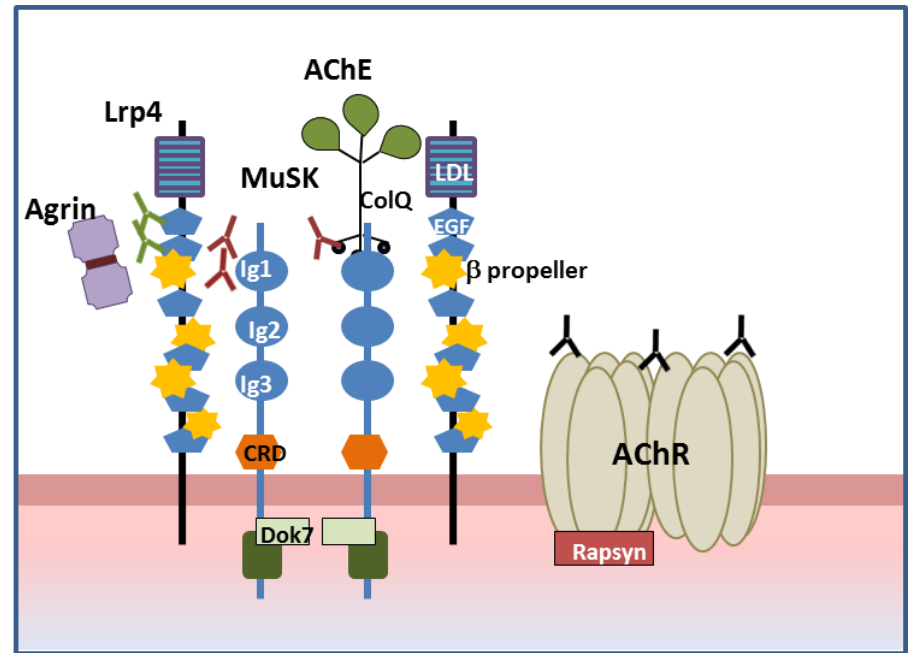


- L'attivazione di MuSK - mediante l'agrina ed il suo co-recettore Lrp4 - è cruciale per la formazione ed il mantenimento della struttura post-sinaptica
- La fosforilazione di MuSK innesca reazioni intracellulari indispensabili per la formazione dei clusters di AChR

# Gli Ab anti-MuSK sono IgG4



- blocco del legame MuSK-LRP4 con riduzione dell'attivazione di MuSK (Huijbers, 2013)
- blocco del legame MuSK-ColQ con riduzione dell' AChE nello spazio sinaptico (Kawakami, 2011; Mori, 2012)



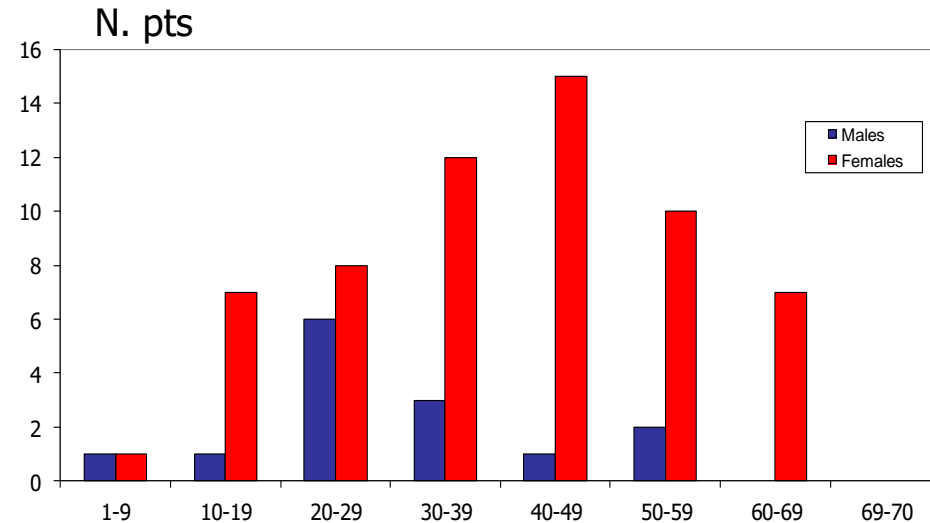
# Aspetti clinici della MG con Ab anti-MuSK

5-8% di tutti i casi di MG

% degli anti-MuSK nella MG AChR-va:

- 2% in Scandinavia - 49% in Italia e Turchia

possibile ruolo di fattori ambientali ed etnici



- MG quasi sempre generalizzata
- sintomi più focali che nella AChR-MG con prevalente coinvolgimento dei mm. bulbari, assiali e respiratori
- scarsa risposta agli anticolinesterasici ed effetti collaterali da ipersensibilità colinergica
- assenti o lievi alterazioni timiche (3 casi di timoma finora descritti)

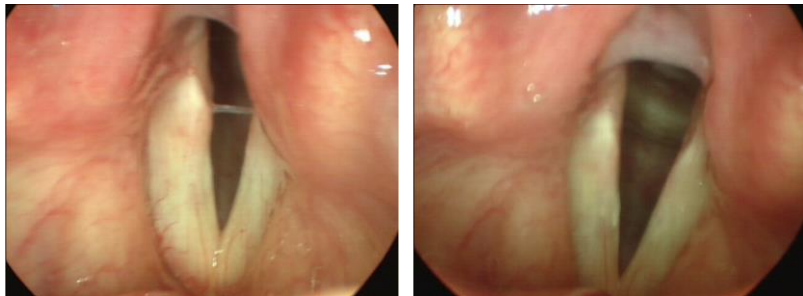
## Aspetti clinici della MG con anticorpi anti-MuSK



Atrofia linguale con disartria marcata



Sorriso «verticale»

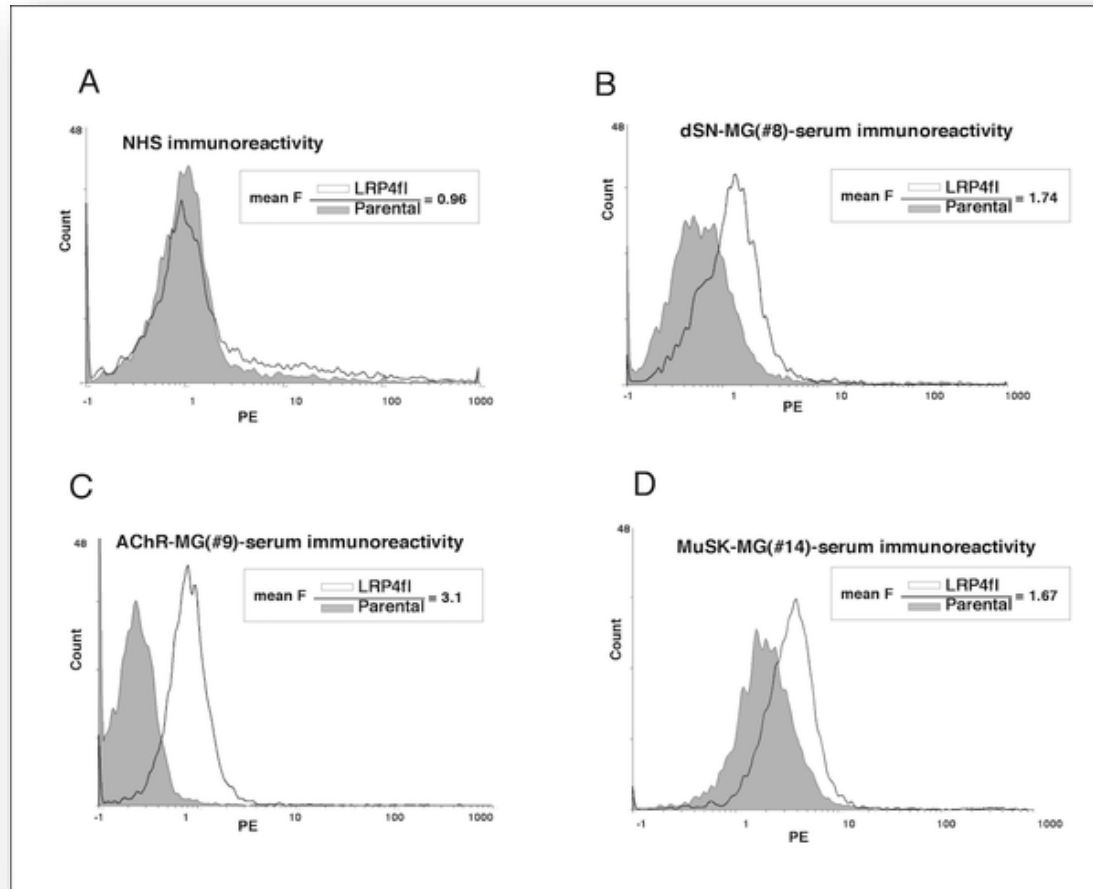


Paresi laringea migliorata dopo plasmaferesi



Oftalmoparesi pseudo-internucleare

# MG associata ad anticorpi anti-Lrp4



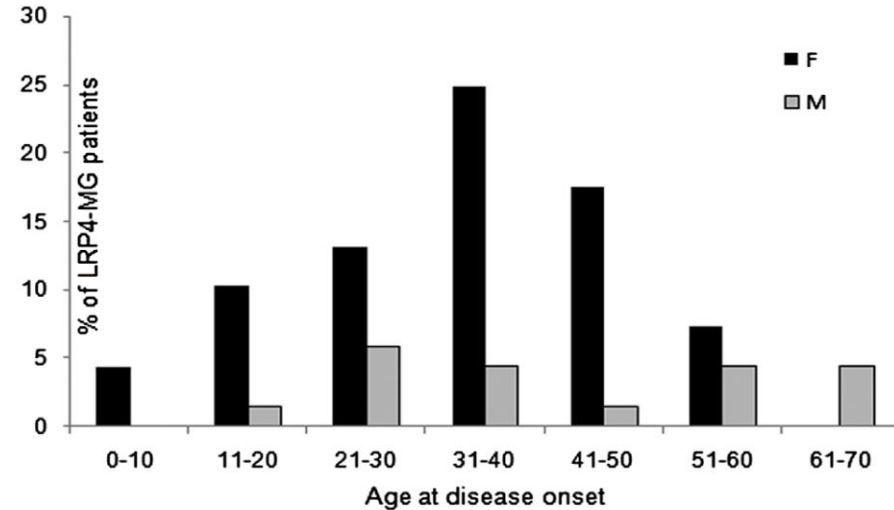
Marino, 2015

Risultati positivi in 8/55 pazienti con MG AChR/MuSK negativa (14%)  
3/23 AChR-MG (13%) and 3/23 MuSK-MG patients (13%)

# MG con anticorpi anti-Lrp4

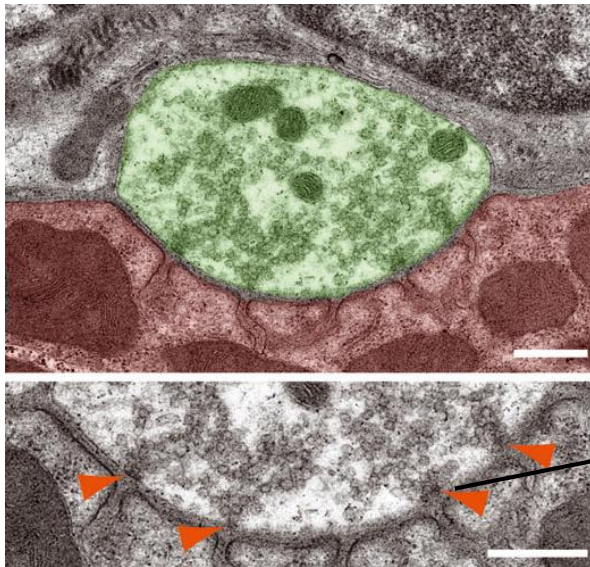
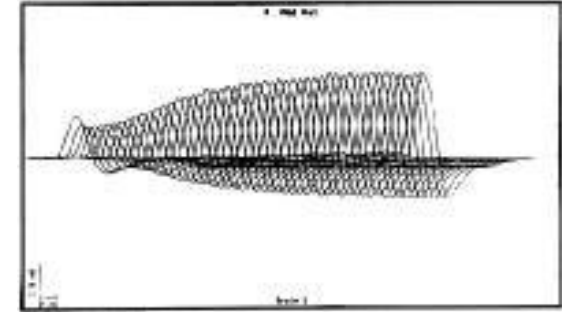
Ab anti-Lrp4 sono IgG1 e in vitro interferiscono con il legame Lrp4-agrina (Zhang, 2012)

- fino al 22% of forme oculari
- prevalenza di forme generalizzate lievi-moderate
- iperplasia timica nel ~30% dei pazienti timectomizzati
- un singolo caso di timoma
- clinicamente simile alla MG con anticorpi anti-AChR



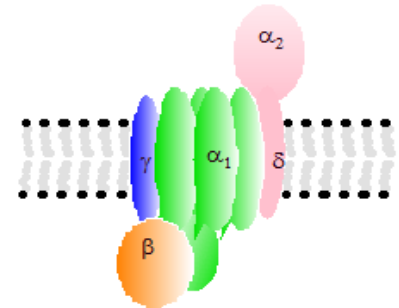
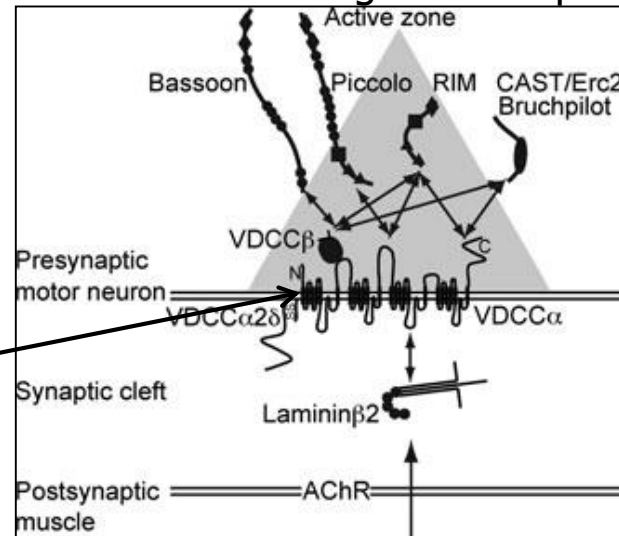
Zisimopoulou, 2014

# La sindrome miastenica di Lambert-Eaton è un disturbo presinaptico



Nishimune, 2012

## Le active zones target anticorpale



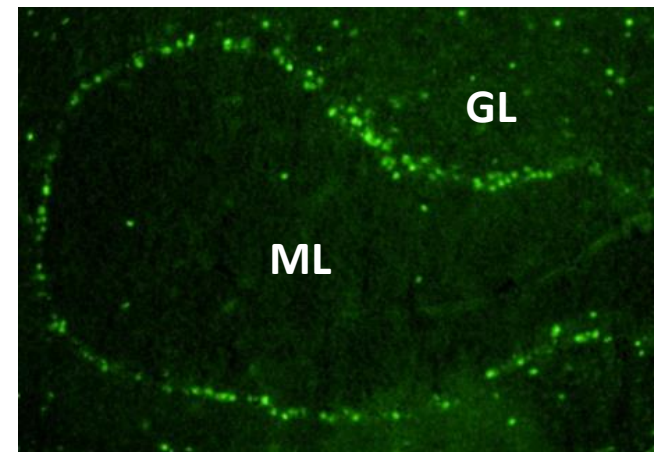
- Ab contro il VGCC P/Q ( $Ca_v2.1$ ) sono dosati nel siero dei pazienti con un RIA che utilizza VGCC marcati con  $I^{125}$ - $\omega$  conotossina
- Gli Ab causano perdita di canali mediante modulazione antigenica con perdita delle active zones e riduzione del "contenuto quantale"

## LEMS malattia paraneoplastica nel 50% dei casi

Solitamente associata a microcitoma polmonare (SCLC)

- Le proteine SOX, fattori di trascrizione della famiglia *sry-like high-mobility group box*, sono espresse nel microcitoma
- Ab anti-SOX Ab (prevalentemente anti-SOX1) sono markers di LEMS paraneoplastica (Sabater, 2008; Titulaer 2009)

La LEMS può associarsi ad altri Ab (anti-Hu) ed a malattie neurologiche paraneoplastiche (degenerazione cerebellare ed encefalomyelite)



anti-glial nuclear antibody (AGNA)



# Neuromiotonia (NMT)

NMT è un disturbo da ipereccitabilità del n. periferico e appartiene allo spettro delle malattie da Ab contro il complesso del VGKC

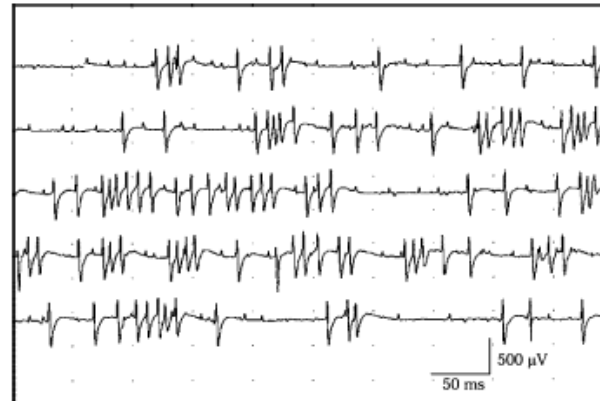
Miochimie, fascicolazioni, crampi, contratture, pseudomiopia, > del tasso sierico di CK, ipertrofia muscolare, iperidrosi

EMG: Attività muscolare spontanea

- scariche miochimiche
- scariche neuromiotoniche

NMT acquisita

- idiopatica (sindrome di Isaacs)
- paraneoplastica (timoma, linfomi)

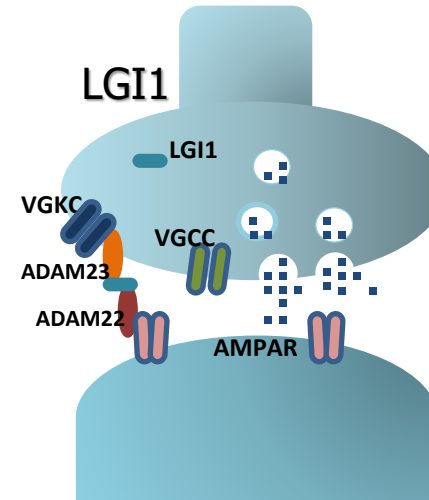
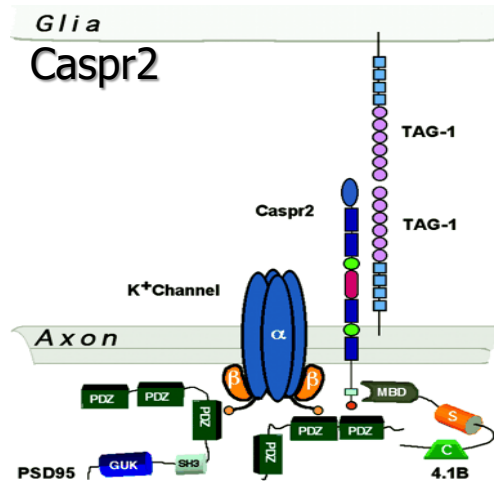


Nel 20% dei casi associata ad alterazioni del CNS:

- sindrome di Morvan: NMT, insonnia, alterazioni del comportamento, disautonomia
- encefalite limbica: disturbo amnesico, crisi epilettiche, sintomi psichiatrici



# Principali antigeni associati al VGKC



## Ab anti-Caspr2:

- sindrome di Morvan (Irani, 2012)
- encefalite multifocale, encefalite limbica
- disturbi ipercinetici (O'Toole, 2013)

## Ab anti-LGI1:

- encefalite limbica con iponatremia (Lai, 2010)
- crisi distoniche facio-brachiali (Andrade, 2011)

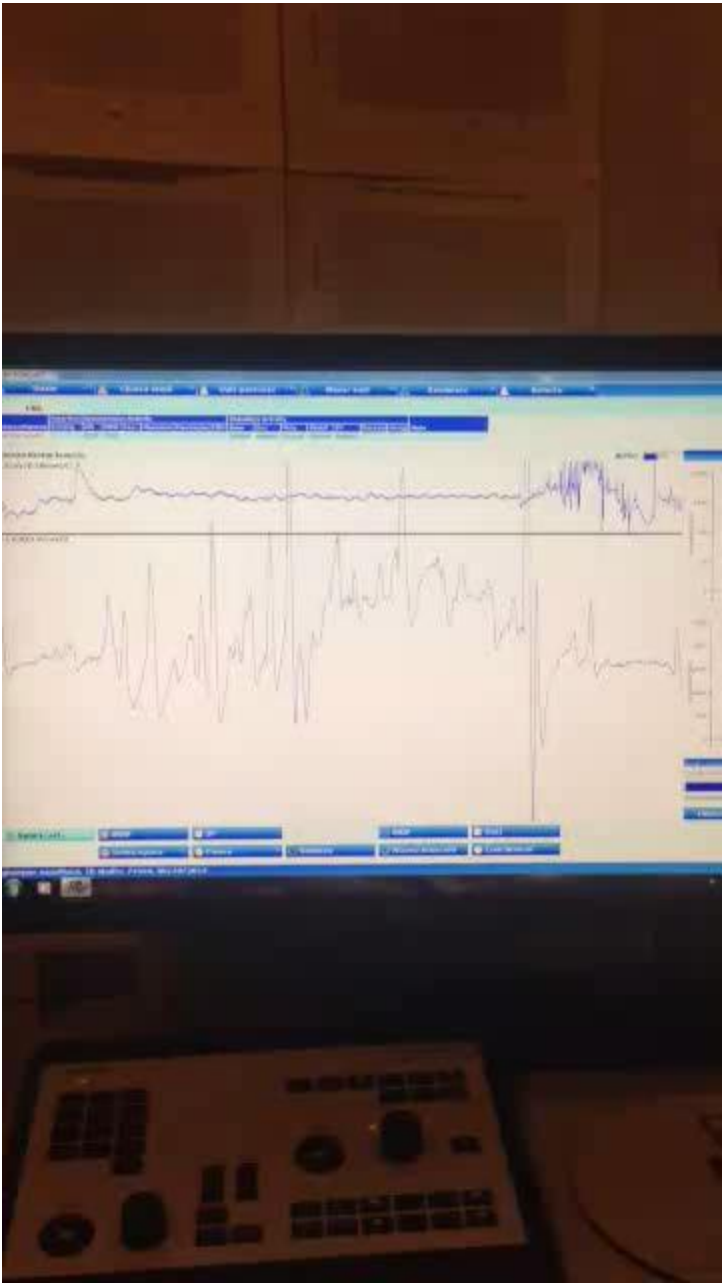
Altri possibili antigeni associati al complesso del VGKC

# Caso clinico

G. N., maschio, 59 aa., medico, storia di I.A. in trattamento

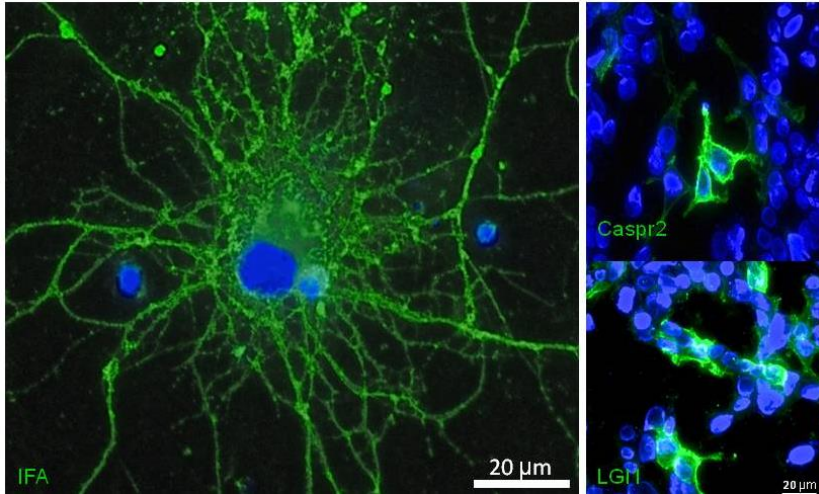
- *dal novembre 2013*, esordio graduale di:
    - fascicolazioni diffuse agli arti, tronco e mm. mimici; crampi
    - deficit di forza prossimale agli arti; parestesie urenti agli arti inferiori
    - disturbi del sonno: sonniloquio, agitazione motoria
- 
- ricovero → diagnosi: "malattia del motoneurone e parasonnie"  
(RM cranio, es. liquor: negativi)
  - *nei mesi successivi*:
    - persistenza di fascicolazioni, crampi e parasonnie
    - incontinenza urinaria ed impotenza
    - allucinazioni visive ("mia moglie è sul lampadario")
    - fasi alterne di aggressività e apatia, comportamento disinibito
  - giunge alla nostra osservazione nel *settembre 2014*





# Caso clinico

Ab anti-Caspr2 (1:1920) e anti-LGI1 (1:240)



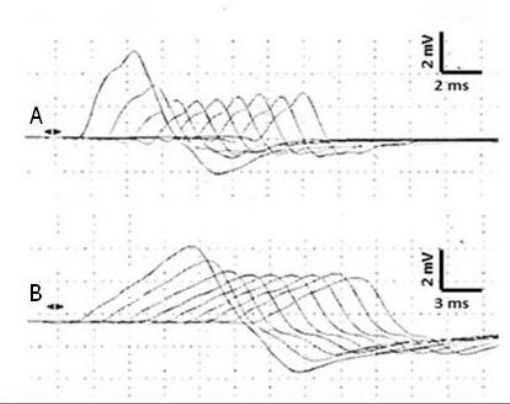
Diagnosi di timoma



Diagnosi di miastenia gravis

Ab anti-AChR: 9.5 nM (v.n. <0.5)

SNR: Decremento del CMAP



deltoide (A) ECD (B)

Terapia:

- Ac. valproico con miglioramento della sindr. di Morvan
- Prednisone
- Timectomia (timoma B3)

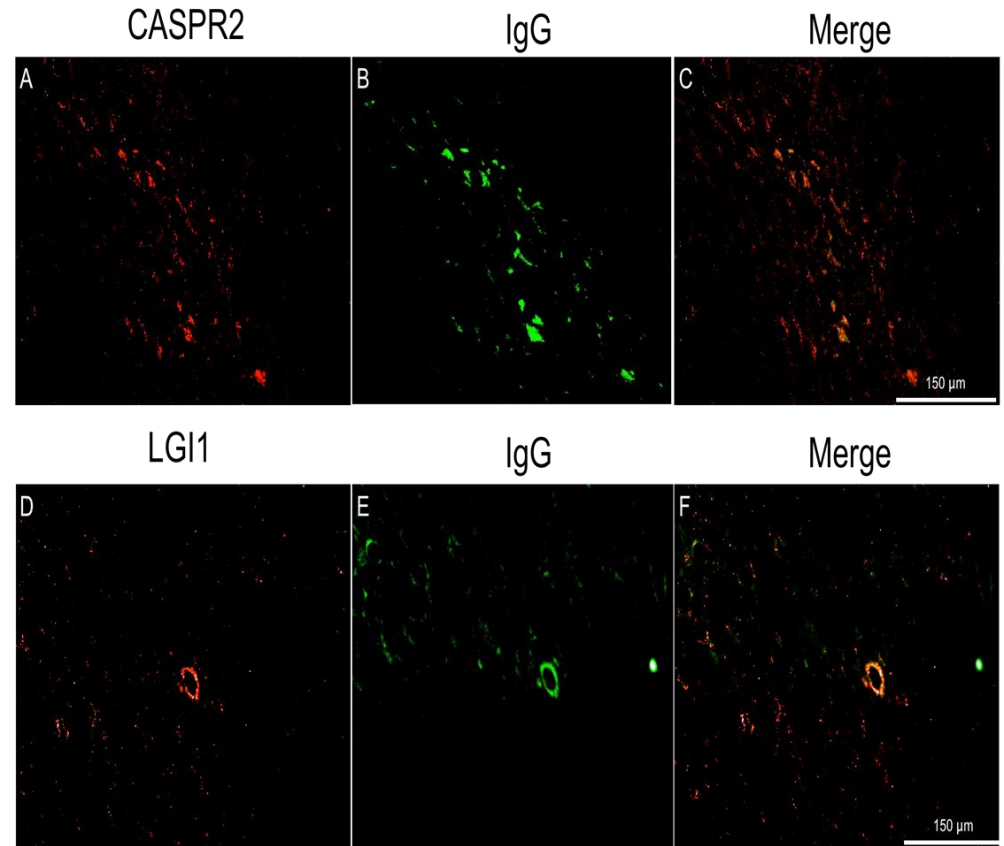
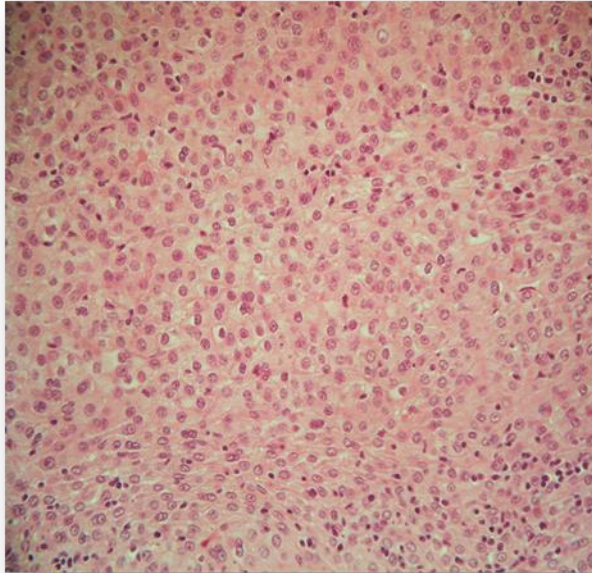
Nelle settimane successive alla timectomia:

peggioramento della MG, con crisi respiratoria, tracheotomia, trattamento con plasmferesi e prednisone ad alte dosi

Attualmente il paziente è in buon compenso (chiusura della tracheotomia), ha ripreso la sua attività, continua la terapia per la MG e per il timoma.

Anti-Caspr2 positivi (1:240), anti-LGI1 non dosabili

## Timoma B3



Espressione di Caspr2 e (meno intensa) di LGI1 nel tessuto tumorale



A.S., maschio, 32 aa.

Esordio subacuto di alterazioni del comportamento,  
disturbo mnesico, crisi generalizzate

- CFS: > proteine e pleiocitosi di grado lieve
- RM cranio: iperintensità ippocampale bilaterale in T2

Diagnosi di timoma B2

Riscontro di LGI1 (alto titolo) e Caspr2 nel siero

Marcato miglioramento dopo CHT e timentomia

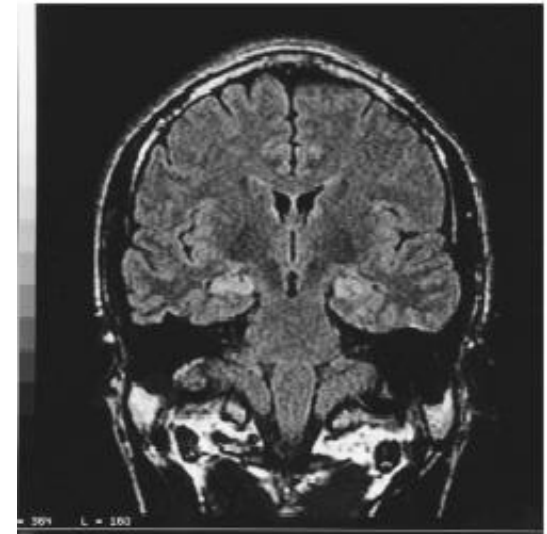
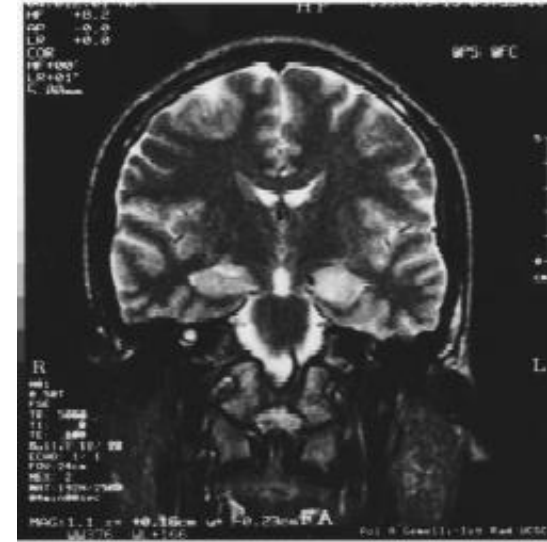
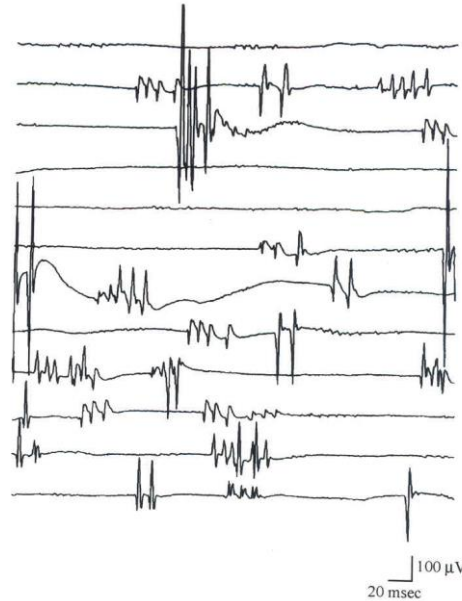
4 mesi dopo la timentomia  
esordio di NMT

9 mesi dopo la timentomia,  
esordio di AChR-MG

Terapia immunosoppressiva

Attualmente:

- segni clinici di MG
- crisi focali in trattamento  
con carbamazepina



2 aa. dopo la timentomia, sia LGI1 che Caspr2-Ab erano negativi  
10 aa dopo, in coincidenza con recidiva di timoma, positività degli Ab anti-Caspr2

# Encefaliti autoimmuni

- **Ab contro antigeni intracellulari (Ab onconeurali)**
  - Contro antigeni nucleari/nucleolari/citoplasmatici
  - Non patogeni, ma markers di un danno CD8<sup>+</sup>T-mediato
  - Predittivi della presenza di un tumore
  - Più specifici per il tumore associato che per la patologia neurologica
- **Ab contro antigeni di superficie (sinaptici)**
  - Contro determinanti extracellulari di canali ionici/recettori
  - Patogeni
  - Non predicono l'associazione con tumore
  - Spesso associati con encefaliti non paraneoplastiche

# Ab onconeurali e patologie associate

	Malattie associate	Antigene	Tumore
Hu (ANNA-1)	Encefalomielite, encefalite limbica, encefalite del tronco, degenerazione cerebellare, neuronopatia sensitiva, neuropatia autonoma	proteine di legame dell'RNA	Microcitoma polmonare (SCLC)
Yo (PCA-1)	Degenerazione cerebellare	proteine regolatorie trascrizione DNA	Tumori ginecologici
Ri (ANNA-2)	Opsoclono-mioclono, distonia, atassia cerebellare, neuropatia	proteina Nova di legame dell'RNA	Ca mammario, SCLC
CV2/CRMP5	Encefalite, corea, neuropatia	CRMP5	SCLC, timoma
Ma1, Ma2 (Ta)	Encefalite limbica, encefalite del tronco, encefalite diencefalica	proteine nucleolari trascrizione RNA	Tumori testicolari
Anfifisina	PERM, sindrome stiff-person, encefalomielite, psoclono-mioclono	regione C-terminale	Ca mammario, SCLC, timoma
GAD65	PERM, sindrome stiff-person, encefalite limbica, epilessia	GAD	Generalmente non paraneoplastica
Tr (PCA-Tr)	Degenerazione cerebellare	DNER	Linfoma di Hodgkin
Zic-4	Degenerazione cerebellare	fattori di trascrizione	SCLC
ANNA-3	neuropatie, atassia cerebellare, mielopatia, encefalite limbica e del tronco	antigene nucleare	SCLC
PCA-2	Atassia cerebellare, encefalite limbica e del tronco, neuropatia autonoma	antigene citoplasmatico	SCLC
GFAP	meningoencefalomielite	isoforme $\alpha$ o $\delta$	Differenti tumori in 1/3 dei casi

# Ab anti-antigeni sinaptici e patologie associate

	Malattie associate	Antigene	Tumore
NMDAr	Encefalite con disturbi psichiatrici e cognitivi, discinesie, ipoventilazione centrale	subunità NR1	Teratoma ovarico spesso non-paraneoplastica
Antigeni Kv1 associati	Encefalite limbica, crisi distoniche	LGI1	raramente paraneoplastica timoma
	Sindrome di Morvan, NMT, encefalite limbica e non limbica, corea	CASPR2	Timoma
AMPAr	Encefalite limbica, sintomi psichiatrici	subunità GluA1/2	Timoma, Ca mammario
GABA <sub>B</sub> r	Epilessia (prevalente), encefalite limbica	subunità $\beta$ 1	SCLC
GABA <sub>A</sub> r	Encefalite, epilessia refrattaria, raramente sindrome stiff-person, opsoclono/mioclono	subunità $\alpha$ 1/ $\beta$ 3	Ca mammario, SCLC, timoma
Glyr	Sindrome stiff-person, encefalite del tronco	subunità $\alpha$ 1	Ca mammario, timoma raramente paraneoplastica
Antigeni Kv4.2- associati	Mioclono, sintomi psichiatrici, encefalite del tronco, diarrea	DPPX	-
mGluR5	Encefalite limbica	epitopi extracellulari	Linfoma di Hodgkin
mGluR1	Degenerazione cerebellare	epitopi extracellulari	Linfoma di Hodgkin
D2r	Disturbi del movimento, sintomi psichiatrici	epitopi extracellulari	-
Neurexina 3 $\alpha$	Disturbi di coscienza, epilessia, discinesie oro-facciali	-	-
IgLON5	Disturbi del sonno, corea, disartria, disfagia, episodi di ipoventilazione centrale	regione Ig-like 2	SCLC

# Encefaliti associate ad anticorpi sinaptici

Analogamente a quanto accade nella miastenia gravis:

- queste patologie possono essere idiopatiche o paraneoplastiche
- gli Ab sono patogeni e riconoscono l'antigene nativo
- la principale conseguenza dell'azione anticorpale è la riduzione dei recettori/canali per modulazione antigenica, ma alcuni Ab sono IgG4 (Caspr2, LGI1, IgLON5) e possono provocare un blocco funzionale
- determinate infezioni possono agire da trigger per le encefaliti da Ab anti-NMDAr e -D2r
- se riconosciute e trattate tempestivamente le encefaliti associate ad Ab sinaptici rispondono bene alla terapia immunosoppressiva



Raffaele Iorio  
Paolo Alboini  
Valentina Damato  
Emanuela Bartoccioni  
Flavia Scuderi  
Andrea Fattorossi  
Alessandra Battaglia