

Università degli Studi di Parma

Dipartimento di Bioscienze

Scuola di Dottorato di Ricerca in Biotecnologie

XXVII° Ciclo

**MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL
RECETTORE VLA4 IN RELAZIONE A DIVERSE
TERAPIE FARMACOLOGICHE IN PAZIENTI
AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA**

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Annamaria Buschini

Dottoranda

Dott.ssa Valeria Regina

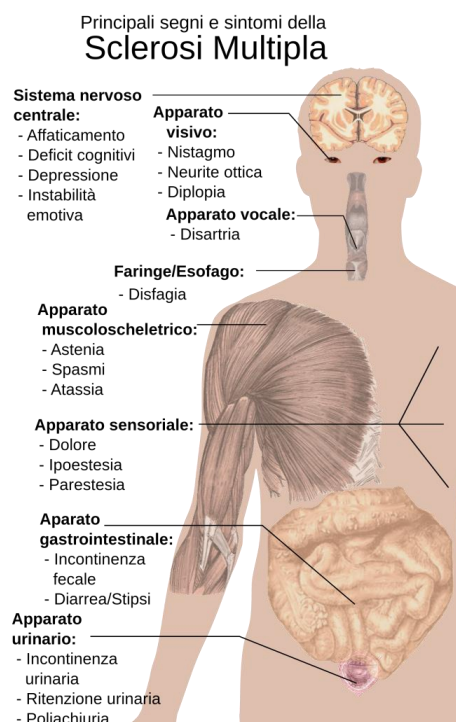
Sommario

1	INTRODUZIONE.....	4
1.1	FATTORI AMBIENTALI	7
1.2	FATTORI GENETICI.....	9
1.3	RUOLO DELLE CELLULE IMMUNITARIE NELLA SM	11
1.3.1	Barriera Ematoencefalica	11
1.3.2	Ruolo Delle Linfociti T.....	13
1.3.3	Ruolo delle Linfociti B.....	17
1.3.4	Ruolo delle cellule NK.....	20
1.3.5	Cellule presentanti l'antigene (APCs).....	22
1.4	PATOGENESI.....	26
1.5	Trattamenti farmacologici.....	31
1.5.1	Terapie di prima linea.....	33
1.5.2	Terapie di seconda linea.....	38
1.5.3	Sviluppo di nuovi trattamenti.....	45
1.6	Sviluppo di anticorpi anti-farmaco nelle terapie per la sclerosi multipla	47
2	Materiali e metodi.....	50
2.1	Soggetti arruolati nello studio.....	50
2.2	Arruolamento dei pazienti	51
2.3		52
2.4	Separazione dei linfociti da sangue intero	52
2.5	Citofluorimetria a flusso	53
2.6	Separazione dei linfociti T mediante separazione magnetica (magnetic cell sorting)	55
2.7	Estrazione RNA totale.....	56
2.8	Retrotrascrizione.....	56
2.9	Real Time PCR	57
2.10	Analisi citofluorimetriche.....	59

3	<i>RISULTATI</i>	61
3.1	<i>Controlli</i>	61
3.1.1	<i>Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+</i> <i>61</i>	
3.1.2	<i>Determinazione dei livelli di espressione superficiale di</i> <i>CD49d</i>	61
3.1.3	<i>Determinazione della fluorescenza media</i>	62
3.1.4	<i>Casi particolari nei controlli</i>	63
3.2	<i>Pazienti</i>	65
3.2.1	<i>Paziente 1</i>	65
3.2.2	<i>Paziente 2</i>	69
3.2.3	<i>Paziente 3</i>	73
3.2.4	<i>Paziente 4</i>	76
3.2.5	<i>Paziente 6</i>	78
3.2.6	<i>Paziente 7</i>	81
3.2.7	<i>Paziente 8</i>	84
3.2.8	<i>Paziente 9</i>	86
3.2.9	<i>Paziente 10</i>	88
3.2.10	<i>Paziente 11</i>	90
3.2.11	<i>Paziente 12</i>	92
3.2.12	<i>Paziente 13</i>	95
3.2.13	<i>Paziente 14</i>	97
3.2.14	<i>Paziente 15</i>	99
3.2.15	<i>Paziente 16</i>	101
4	<i>DISCUSSIONE</i>	104
5	<i>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</i>	115
6	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	118

1 INTRODUZIONE

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune progressiva che interessa il sistema nervoso centrale. Nella maggior parte dei casi colpisce giovani adulti, infatti l'esordio avviene in genere tra i 20 e 40 anni, con difetti neurologici circoscritti e transitori. I pazienti affetti da SM mostrano una grande varietà di sintomi causati da lesioni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) con manifestazioni a livello motorio, sensoriale, visivo o delle funzioni del Sistema Nervoso Autonomo (SNA). Le lesioni appaiono maggiormente nella sostanza bianca, ma occasionalmente anche nella sostanza grigia. Di conseguenza, i sintomi mostrano una grande eterogeneità sia inter che intra-individuale che vanno dal leggero formicolio alle dita alla estrema stanchezza o perdita completa della vista a seconda della localizzazione della lesione [fig.1][Compston et al., 2008].



Comunemente, i pazienti presentano una sindrome clinicamente isolata (CIS), seguita da ricadute seriali con intervalli di tempo variabili. Il numero di recidive annuali e gli intervalli di tempo tra di essi varia tra i pazienti [Compston et al., 2008]. Non tutti i pazienti hanno una malattia attiva dopo una singola CIS, ma il rischio di un altro episodio è maggiore se le lesioni si presentano nella sostanza bianca [Fisniku et al., 2008].

Esistono principalmente quattro varianti cliniche della malattia [fig.2]:

- a) Recidiva – Remittente (SM – RR): con il termine recidiva si intende una situazione di fase attiva del disturbo che si manifesta con la comparsa di nuovi sintomi o con l'aggravarsi di quelli preesistenti; la fase di remissione corrisponde invece ad uno stato di quiescenza in cui non vi è progressione della disabilità [Dutta e Trapp, 2011].
- b) Secondaria Progressiva (SM – SP): l'andamento della malattia è caratterizzato dalla riacutizzazione e recupero dei sintomi, ma con il tempo può trasformarsi in un decorso cosiddetto “secondariamente progressivo”, ossia con progressione dei deficit anche nei periodi che intercorrono tra una ricaduta e l'altra.
- c) Primaria Progressiva (SM – PP): caratterizzata dal fatto che i sintomi si accumulano nel tempo in modo graduale senza la comparsa di un vero e proprio attacco e senza remissioni; il decorso è molto lento [Lublin e Reingold, 1996].
- d) Recidiva Progressiva: caratterizzata da occasionali attacchi; ne esistono due forme meno frequenti: una benigna, lievemente o non invalidante, la quale evolve in alcuni casi in una forma progressiva; una maligna, caratterizzata da

un decorso rapidamente progressivo che porta a disabilità completa in poco tempo [National multiple sclerosis society, n.d.].

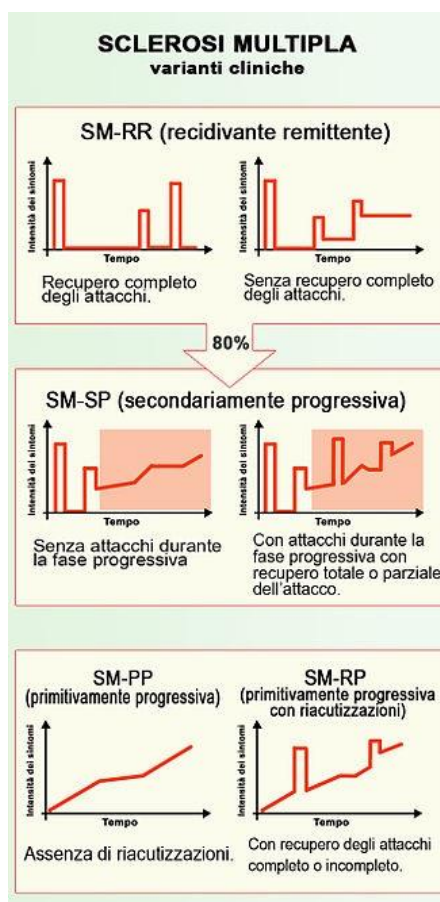


Fig. 2 Varianti cliniche della sclerosi multipla [www.wikipedia.org]

Le conseguenze sull'autonomia e sulla qualità della vita degli individui affetti da SM sono variabili in base alla natura stessa della malattia. Il costo sociale di questa patologia è molto elevato, sia a causa della giovane età dei pazienti affetti che possono rimanere inabili alla produttività, ma anche per l'elevato costo delle terapie farmacologiche e delle apparecchiature di supporto vitale dispensate dal Sistema Sanitario Nazionale (SSN).

1.1 FATTORI AMBIENTALI

Alcuni studi genetici effettuati su famiglie con soggetti affetti da SM supportano l'ipotesi della predominanza genetica nello sviluppo della patologia, altri invece dimostrano che i soli fattori genetici non possono essere responsabili dell'insorgenza o dell'esacerbazione della patologia. Diversi studi su coppie di gemelli omozigoti mostrano come, a fronte di un patrimonio genetico identico, vi sia solo il 33% di probabilità che entrambi sviluppino la malattia. Altre informazioni supportano l'idea che esistano anche fattori ambientali in grado di agire come agenti scatenanti, tra i quali anche la provenienza geografica del soggetto, infatti maggiore è la latitudine e maggiore è il rischio di sviluppare la malattia [Fig.3][Simpson et al., 2011]. Inoltre se un individuo migra da un paese a basso rischio verso uno ad alto rischio prima della pubertà avrà la stessa possibilità di sviluppare la malattia del paese ospitante e viceversa. Se la migrazione avviene dopo la pubertà, il rischio rimane invariato rispetto a quello del paese di origine [Compston et al., 2008].

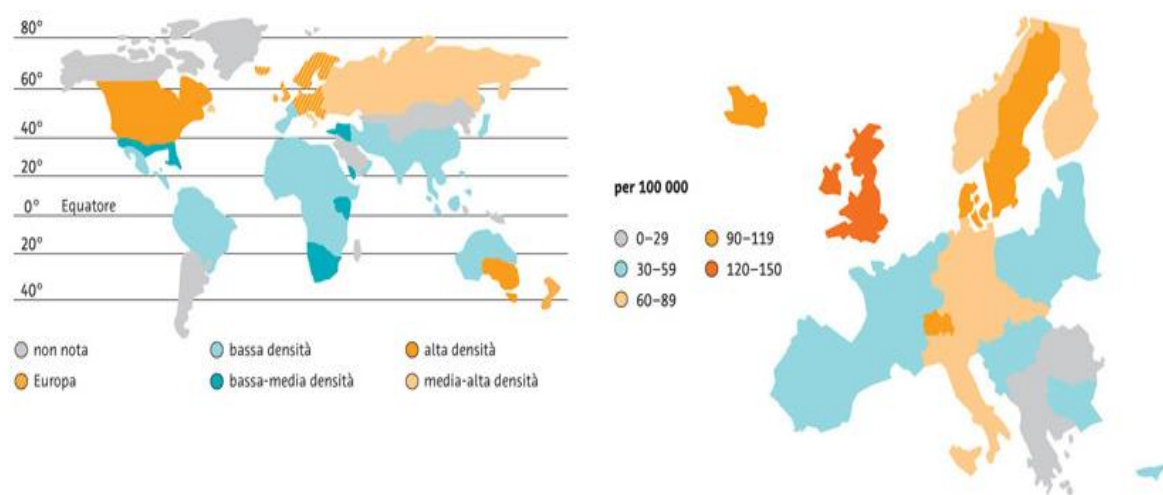


Fig.3 Distribuzione a livello mondiale ed europeo della sclerosi multipla [www.wikipedia.org]

Studi hanno evidenziato come anche il periodo di nascita influisca sulla suscettibilità alla patologia, i nati in primavera hanno maggior rischio dei nati

in autunno [Grytten et al., 2013]. Tra i fattori ambientali che sono stati investigati troviamo la vitamina D. Una delle ipotesi è che un deficit di vitamina D₃ incrementi il rischio di SM, questa ipotesi potrebbe essere correlabile alla diminuzione dei livelli ematici di questa vitamina con l'aumento di latitudine. Ad esempio, studi di ecologia mostrano che l'aumento dell'esposizione alla luce del sole è inversamente correlato con il rischio di SM [Ascherio et al., 2007]. La luce solare è la più comune fonte nell'uomo di vitamina D₃ che diviene forma attiva (1,25- diidrossivitamin D₃ - 1,25(OH)2D₃) attraverso la conversione di 7-deidrocolesterolo o provitamina D₃ negli strati più profondi della pelle. E' dimostrato come la vitamina D₃ possa ridurre il rischio di SM proprio osservando come il deficit di questa vitamina sia latitudine dipendente. Altra considerazione è stata fatta studiando le popolazioni che consumano grandi quantitativi di pesce ricco di vitamina D₃ [Brustad et al., 2004]. Utilizzando il modello animale per SM (EAE- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) sono stati dosati diversi quantitativi di 1,25(OH)2D₃ ed è stato osservato un'associazione tra andamento della patologia e dosaggio della vitamina [Lemire et al., 1997; Cantorna et al., 1996]. Gli effetti della vitamina D₃ si pensa che siano indirizzati verso la risposta adattativa del sistema immunitario ma, ad oggi, non è chiaro il meccanismo.

Anche l'infezione da Epstein Barr Virus (EBV) sembra essere un altro fattore di rischio fortemente correlato alla SM [Ascherio et al., 2007; Hestvik et al., 2010]. Da diversi studi si evince che i soggetti che presentano sieropositività per EBV hanno una maggiore incidenza di SM rispetto agli individui che presentano sieronegatività per lo stesso virus [Ascherio et al., 2007]. Ciò, però, non indica che chi è sieropositivo per EBV svilupperà la SM [Holmøy et al.,

2008]. Esiste un incremento di rischio di sviluppo di SM se nella storia d'infezioni del soggetto si ha la presenza di mononucleosi e un temporaneo incremento del titolo di anticorpi EBV nel siero [Ascherio et al., 2001]. I pazienti affetti da SM sono infettati da EBV in tarda età con maggior frequenza rispetto ai soggetti di controllo [Martyn et al., 1993]. Si è ipotizzato che EBV possa mimare le proteine basiche mieliniche (MBP) che sono, a loro volta, antigeni patogenici presentati da HLA DRB1*1501; questo meccanismo potrebbe rappresentare un possibile punto d'incontro tra fattori ambientali e genetici [Lang et al., 2002]. Anche se l'associazione con SM è stata ben studiata, il ruolo di EBV nella patologia rimane incerto. Tuttavia, appare sempre più probabile una correlazione tra infezione da EBV, e inizio della patologia [Ascherio et al., 2007]. Molti altri fattori ambientali sono oggetto di ricerche scientifiche, alcuni di questi sono il fumo di sigarette, dieta ricca di grassi saturi e povera di polinsaturi, ormoni sessuali e status socioeconomico [Marrie et al., 2004; Ascherio et al., 2007].

1.2 FATTORI GENETICI

L'ipotesi che la SM abbia una componente ereditaria è supportata da studi condotti su famiglie che mostrano come i soggetti imparentati abbiano una probabilità di sviluppare la patologia del 20%-33% superiore al normale (0,1%-0,5%); il rischio aumenta di 10-12 volte nel caso di soggetti legati da stretta parentela (primo, secondo o terzo grado) [Robertson et al., 1996; Carton et al., 1997]. Per i fratelli o figli di pazienti con SM, il rischio è stato stimato pari al 3% -5% [Sadovnick et al., 1998], con incremento della probabilità fino al 25% nel caso di gemelli monozigoti

[Willer et al., 2003; Mumford et al., 1994]. Il primo allele che è stato identificato già agli inizi degli anni '70 come responsabile della triplicazione di rischio di sviluppare la patologia era lo Human Leukocyte Antigen (HLA) di classe II alplotipo HLA-DRB 1501 [Svejgaard, 2008; Sawcer et al., 2011]. Negli ultimi anni si sono moltiplicati gli studi di Genome Wide Association Studies (GWAS) che utilizzano polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Nella comparazione del genotipo di soggetti controllo e pazienti, è emerso che molti possono essere gli alleli coinvolti con un maggior rischio di sviluppo della patologia, mentre altri sembrano presentare una modesta associazione o possono ricoprire funzioni protettive, come l'allele HLA-A 0201 [Gourraud et al., 2012; Hafler et al., 2007]. I ricercatori, con l'aiuto del consorzio GWAS, hanno identificato oltre 50 loci suscettibili, molti dei quali sono associati alla modulazione della risposta immunitaria, inclusi geni codificanti per i recettori dell'interleuchina 2 (IL-2) e dell'interleuchina 7 (IL-7) [Hafler et al., 2007; Sawcer et al., 2011]. Altri importanti geni sono quelli coinvolti nel pathway delle citochine, in particolare CXCR5, IL-12A, IL-12 β , IL-12R β 1; alcuni sono associati con le citochine del Tumor Necrosis Factor α (TNF α), così come i geni codificanti per molecole co-stimolatorie come CD80, CD86, CD37. Gli studi GWAS hanno identificato anche altri geni che sono importanti oggi per alcune target therapy per la SM come IL-2R α (bersaglio di daclizumab) e VCAM1 (antagonista di natalizumab), ma anche geni relativi al fattore ambientale implicato nella sintesi della vitamina D₃ [Sawcer et al., 2011]. Tuttavia, a differenza di altri disturbi neurologici come il morbo di Alzheimer (AD) o di Parkinson (PD), ci sono poche prove che questi fattori genetici siano completamente penetranti; si crede, invece, che l'ereditarietà della SM sia governata esclusivamente da centinaia di migliaia di varianti genetiche comuni

come ad esempio, polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) con frequenze alleliche minori (MAF). Analisi di base di origine ontologica dei geni hanno confermato che i loci che determinano una maggiore suscettibilità alla malattia hanno un ruolo nell'immunità mediata delle cellule T mentre il ruolo primario di neurodegenerazione, un'ipotesi lungamente discussa, appare essere trascurabile [Sawcer et al., 2011]. E' interessante notare come molti loci identificati come responsabili di un maggiore rischio per la SM sono gli stessi che sembrano determinanti in altre malattie autoimmuni come il morbo di Crohn e il diabete di tipo I, mentre sono trascurabili le somiglianze con patologie primariamente neurodegenerative come Alzheimer o Parkinson [Welter et al., 2014]. La ragione di tale differenza non è ancora chiarita. Recentemente è stato stimato che i loci per ora conosciuti spiegano solo il 27% dei casi di SM [Beecham et al., 2013]. Si suppone che modificazioni epigenetiche, come la metilazione del DNA, le modificazioni istoniche e l'espressione dei noncoding RNA, possano in parte spiegare i rimanenti casi [Petronis, 2010; Grossniklaus et al., 2013].

1.3 RUOLO DELLE CELLULE IMMUNITARIE NELLA SM

1.3.1 Barriera Ematoencefalica

La distruzione della barriera ematoencefalica (BBB) è uno degli eventi fondamentali che sembrano essere coinvolti nella formazione delle lesioni cerebrali tipicamente presenti nei pazienti affetti da sclerosi multipla. Una miglior conoscenza di questa complessa struttura è essenziale per la comprensione della patogenesi della malattia [Engelhardt, 2008]. La barriera

ematoencefalica è una unità anatomo-funzionale che separa il sangue dal parenchima cerebrale. Alla formazione della barriera contribuiscono uno strato endoteliale non fenestrato, in continuità con la membrana basale e proiezioni citoplasmatiche di astrociti. La BEE costituisce una vera e propria barriera tra il circolo sanguigno e il sistema nervoso centrale che agisce come “filtro biologico selettivo”, consentendo o impedendo alle sostanze (ioni, glucosio, proteine etc.) di passare dal sangue al parenchima cerebrale e dal sangue al liquido cerebro-spinale (CSF). Grazie a questa funzione regolatrice e selettiva, la BEE preserva la delicata omeostasi chimico-fisica dell'ambiente fluido cerebrale. La BEE svolge pertanto un ruolo protettivo nei confronti del CSF e del tessuto nervoso. Mantiene, infatti, stabile l'ambiente ionico e preserva il basso gradiente aminoacidico dei neurotrasmettitori eccitatori (acidi glutammico, acido aspartico e glicina) caratteristico del fluido extracellulare cerebrale.

Ciò è essenziale per un'affidabile trasmissione sinaptica e un'efficiente attività di neuroregolazione. Inoltre, previene l'ingresso di sostanze tossiche per le cellule, quali metaboliti e neurotossine sia endogene che xenobiotiche, potenzialmente anche mortali. Così facendo, favorisce la longevità del SNC e impedisce una prematura morte e neurodegenerazione cellulare (Begley, 2004).

La BEE è formata dall'endotelio dei capillari cerebrali, dai processi perivascolari degli astrociti che circondano le cellule dell'endotelio e dai periciti, cellule connettivali contrattili che le circondano parzialmente.

La caratteristica costituzione anatomica della BEE è responsabile delle sue peculiarità funzionali, quali la limitata permeabilità alla maggior parte delle sostanze e il limitato trasporto paracellulare e trans-cellulare. I capillari cerebrali sono anatomicamente diversi da quelli periferici sistemici in quanto

le cellule che li compongono formano un endotelio continuo, non fenestrato, e con un ridotto numero di cellule pinocitiche. Sono, inoltre, presenti giunzioni strette – tight junctions – che impediscono la libera diffusione dei soluti dal comparto ematico (periferico o sistemico) a quello liquorale e cerebrale (intratecale), sia a livello dei capillari cerebrali che dell'epitelio corioideo. Gli astrociti e i periciti che si trovano attorno alle cellule endoteliali, essendo a loro volta separati dalla membrana basale mediante una matrice extracellulare di collagene, contribuiscono a garantire un'ulteriore compattezza a questa unità anatomo-funzionale (Abbot et al., 2010). A lungo si è ritenuto che questa struttura fosse unicamente deputata a svolgere un'azione passiva nella sorveglianza immunologica, tuttavia oggi numerose sono le evidenze che ne hanno ben caratterizzato la sua fondamentale dinamicità [Kivisäkk et al., 2003; Ransohoff et al., 2003]. La migrazione di leucociti oltre la barriera ematoencefalica ed il conseguente instaurarsi di un processo infiammatorio acuto, appare essere fortemente implicato nella formazione delle caratteristiche lesioni del sistema nervoso centrale rilevate nei pazienti affetti da SM. [Bechmann, 2007].

1.3.2 Ruolo Delle Linfociti T

I linfociti T riescono a riconoscere un antigene solo se esso viene "presentato" sulla superficie di una cellula complessata con le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), e non quindi nella sua forma solubile. I linfociti T possiedono un sistema di recettori, TCR/CD4-CD8, tramite i quali riescono a riconoscere il peptide antigenico, presente in un complesso con le proteine dell'MHC. Inoltre i superantigeni possono anche attivare in modo

piuttosto aspecifico una grande popolazione di cellule T legandosi direttamente alle molecole MHC espresse su queste cellule senza che sia necessario il processamento. Queste sostanze sono prodotte da vari microorganismi come ad esempio streptococchi e stafilococchi. I peptidi espressi sulla cellula assieme alle proteine dell'MHC non derivano solo da antigeni, ma anche dal metabolismo cellulare, dopo digestione nel proteasoma, e possono essere quindi anche "molecole self", vale a dire proprie dell'organismo stesso e non provenienti da organismi estranei. Nel caso in cui una cellula sia infettata da virus, il virus stesso ineluttabilmente induce la cellula a produrre delle proteine che servono alla proliferazione virale e alcune di queste proteine virali vengono lise dai proteosomi e presentate sulla cellula infetta provocando il marcamento per un linfocito di tipo T della cellula infettata. I linfociti T non hanno però solo una funzione effettrice capace di eliminare cellule tumorali, infette e organismi patogeni, ma hanno anche una funzione regolatrice tramite la produzione di linfocine, molecole che sono alla base di fenomeni di cooperazione cellulare nella risposta immunitaria. Le cellule a funzione effettrice possiedono la molecola di riconoscimento CD8 (sono dette CD8+) e sono i linfociti T citotossici (CTL); le cellule con funzione regolatrice sono marcate dalla CD4 (dette CD4+) e sono i linfociti T helper (CTH).

L'immunità specifica (nota anche come immunità acquisita o immunità adattativa) è costituita prevalentemente da cellule della linea linfoide (della serie T e B) e da cellule accessorie. I linfociti T si suddividono in linfociti T helper CD4+ e linfociti T citotossici (CTL) CD8+. La funzione effettrice dei primi è quella di coordinare il complesso della risposta immune attivando linfociti CD8+ e macrofagi (T-helper 1) o linfociti B (T-helper 2) e di sostenere

il processo infiammatorio. Tale attività è svolta attraverso interazioni cellula-cellula o mediante rilascio di particolari fattori solubili detti citochine.

La funzione effettrice dei linfociti CD8⁺ è quella di lisare le cellule infette grazie alla produzione delle linfochine. I linfociti B attivati si specializzano invece in cellule secernenti anticorpi (plasmacellule). Le cellule accessorie sono le cellule reclutate dal compartimento innato del sistema immunitario. A differenza dell'immunità aspecifica o innata l'immunità specifica o acquisita è stata selezionata dall'evoluzione per la sua capacità di adattarsi dinamicamente alla variabilità di agenti ambientali riconosciuti come un pericolo per l'organismo. Tale variabilità è ovviamente una caratteristica peculiare di molti microrganismi infettivi in continua co-evoluzione con il sistema immunitario che cerca di distruggerli [Hatterer et al., 2008; Laman and Weller, 2013].

Il ruolo delle cellule T è sempre stato considerato centrale nella patogenesi della SM, molto dovuto al modello animale sperimentale EAE ma anche grazie alla stretta associazione con i geni delle HLA di classe II [Gourraud et al., 2012]. Il modello animale EAE è largamente usato come modello per la sclerosi multipla, si origina immunizzando topi o altri roditori con peptidi mielinici o attraverso infusione di cellule T reattive contro la mielina [Holmøy et al., 2008]. In questo modo si causa una acuta reazione autoimmune contro la mielina nell'animale che provoca effetti molto simili a quelli osservati nella sclerosi multipla. Anche se questo modello è molto utilizzato nello studio della SM, va sottolineato come la patogenesi della malattia sia molto più complessa rispetto a quella realizzata nel modello EAE [Steinman, 2001].

Per un lungo tempo si è pensato che linfociti T auto-reattivi secernenti interferone γ (IFN γ) fossero i responsabili dello stato d'infiammazione e,

quindi, delle lesioni tipiche della SM [Compston et al., 2008]. Diverse ricerche suggeriscono che anche altre cellule e sottogruppi di esse sono coinvolte nell'infiammazione, un particolare ruolo è assegnato alle cellule T helper 17 (Th17) [McFarland et al., 2007]. Queste cellule secernono citochine pro-infiammatorie IL-17, IL-16 che sono regolate da IL-23 [Langrish et al., 2005; Steinman, 2007]. Comunemente si pensa che la patologia abbia origine in seguito ad una disregolazione del comparto deputato alla sorveglianza immunitaria che si manifesta con una risposta di tipo autoimmune [Dolei et al., 2014; Compston et al., 2008]. Dal momento che il modello EAE è rappresentativo di una forma acuta d'infiammazione, è stato usato per esplorare quali cellule siano importanti per questo processo. Nel topo con EAE si è osservato come siano necessarie le cellule CD4⁺Th17 per lo sviluppo della patologia [Komiyama et al., 2006]. Lo studio delle lesioni in campioni di pazienti affetti da SM conferma una maggiore presenza di linfociti CD4⁺ secernenti IL-17 in prossimità delle lesioni attive. In queste lesioni sono presenti anche linfociti CD8⁺ esprimenti IL-17 [Tzartos et al., 2008]. Il recettore per le chemochine CCR6 espresso sulle cellule Th17 facilita il passaggio attraverso il plesso coroideo nel liquido cefalorachidiano (CFS) e lo spazio perivascolare mediante l'interazione con CCL20/MIP-3 α espresso sull'endotelio [Reboldi et al., 2009]. Le cellule Th17 possono anche produrre GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) promosso dalle cellule presentanti l'antigene (APCs) che secernono IL-23, [El-Behi et al., 2011; Codarri et al., 2011]. Le cellule Th17 possono anche incrementare la permeabilità della barriera ematoencefalica a causa della distruzione delle giunzioni endoteliali mediante la secrezione di IL-17 e IL-22 e attraverso l'interazione con l'endotelio permettendo un ulteriore richiamo di CD4⁺ e di

altre cellule immunitarie. Conseguentemente, iniziata la cascata infiammatoria patologica, si avranno infiltrazioni perivascolari e danno ai neuroni e alle cellule della glia [Dolei et al., 2014; Tzartos et al., 2008]. Una delle molecole che danno inizio al processo flogistico è Granzyme B che è secreto dalle cellule Th17 [Kebir et al., 2007]. Tuttavia, per ottenere l'accesso al parenchima, le cellule devono attraversare le cellule della glia. Ciò è permesso dalle cellule APC perivascolari e dai macrofagi secernenti metalloproteinasi della matrice (MMP)-2 e MMP-9, che sono gelatinasi in grado di scindere distroglicano, un recettore di membrana che permette l'ancoraggio degli astrociti alla membrana basale. Quando nel modello murino EAE è stato prodotto un knock down di MMP-2 e MMP-9, i topi sono diventati resistenti alla EAE e le cellule T sono rimaste bloccate nella zona perivascolare [Agrawal et al., 2006].

1.3.3 Ruolo delle Linfociti B

I linfociti B sono cellule del sistema immunitario che giocano un ruolo primario nell'immunità umorale dell'immunità acquisita (al contrario dei linfociti T che sono fondamentali nell'immunità cellulare). La principale funzione dei linfociti B è quella di produrre anticorpi contro uno specifico antigene svolgendo anche il ruolo di APC (cellula presentante l'antigene) ed eventualmente evolversi in linfociti B memoria dopo attivazione dovuta all'interazione con un antigene. I linfociti B sono cellule che, in seguito a stimolazione, sono capaci di proliferare e trasformarsi in cellule effettrici, le plasmacellule, queste ultime capaci di produrre anticorpi.

Il loro nome deriva dal luogo in cui sono stati scoperti la prima volta, un organo degli uccelli chiamato "borsa di Fabrizio". Sebbene con le scoperte successive si

notò che i linfociti B erano prodotti anche nell'uomo, la B del nome è rimasta per ricordare il luogo in cui sono generati cioè bone marrow (midollo osseo in inglese). Dopo una maturazione che si svolge dapprima nel midollo, poi nella milza per finire negli organi linfoidi secondari i linfociti B diventano in grado di produrre anticorpi o immunoglobuline che sono proteine specifiche che riescono ad identificare in maniera precisa e pressoché univoca specifici antigeni. Il rilascio di anticorpi specifici per un antigene causa l'uccisione dei microbi che lo esprimono tramite diverse vie (complemento, fagocitosi ecc...) [Franciotta et al., 2008]

La prova del coinvolgimento delle cellule B nella patogenesi della SM è la presenza di immunoglobuline (come la IgG1) nel CFS; rilevate con focalizzazione isoelettrica o elettroforesi su gel in ben il 95% dei pazienti a cui è stata diagnosticata la patologia. La presenza di anticorpi anti-mielina rilevati in alcuni studi, non può considerarsi una prova dello sviluppo della SM. Le cellule B possono contribuire alla patologia attraverso la presentazione dell'antigene, interazioni cellulari o produzione di immunoglobuline da plasmacellule, anche se l'attività delle cellule B possono rappresentare una risposta alla reazione autoimmune, piuttosto che un'induzione primaria [Hestvik, 2010]. Recenti studi indicano che nella SM, come nell'artrite reumatoide, i linfociti B si aggregano su strutture linfonodi-like negli organi target. Questo processo di aggregazione è mediato dall'espressione di lymphoid-homing chemochine. Sono stati ritrovati accumuli linfociti B infettati con il virus Epstein-Barr (EBV) nei follicoli intrameningiali e nelle lesioni alla materia bianca nei pazienti affetti da SM che possono essere probabilmente il target della risposta immunitaria citotossica. Questo potrebbe spiegare il continuo attivazione dei linfociti T e B nella SM, ma apre

anche un nuovo scenario sulla possibile patogenicità degli autoanticorpi [Franciotta et al., 2008]. Nell'uomo non sono stati individuati antigeni anti MBP (proteolipid protein) o MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) come nel caso del modello animale EAE, nonostante i diversi tentativi per identificarli [Hestvik, 2010, Dolei et al., 2014]. Diversi antigeni sono stati indagati, ma nessun di essi è stato considerato come il responsabile della patogenesi. La mielina o peptidi derivati dalla mielina sono stati presi in considerazione a causa della somiglianza tra EAE e MS, ma le risposte a questi antigeni hanno dimostrato di essere aspecifiche e possono suggerire che diversi antigeni siano coinvolti e / o una vasta diffusione di epitopi di essi si originano dopo l'inizio della malattia [Dolei et al., 2014, McFarland et al., 2007; McMahon et al., 2005].

Un antigene recentemente suggerito come buon candidato per spiegare la patogenesi della SM è la $\alpha\beta$ -cristallina, che contrariamente alle componenti precedentemente valutate, non è presente nella mielina umana, ma viene rilevato nelle prime lesioni attive in pazienti con SM, ed essi presentano anche anticorpi specifici contro questa proteina nel CFS [Holmøy et al., 2008].

Quando il gene che codifica $\alpha\beta$ -cristallina viene silenziato nel topo modello, si sviluppa una EAE infiammatoria più intensa con una maggiore presenza di citochine proinfiammatorie [Ousman et al., 2007]. Questo suggerisce un potenziale ruolo di protezione che può essere interrotto da una risposta immunitaria alterata. Un'altra proteina candidata, non direttamente associata con la mielina, è la neurofascina, espressa sugli assoni. Anticorpi anti-neurofascina sono stati rilevati in pazienti affetti da SM, questo potrebbe indicare la presenza di danno assonale [Mathey et al., 2007].

1.3.4 Ruolo delle cellule NK

Le cellule NK sono grandi linfociti granulari che possiedono la capacità di lisare cellule bersaglio spontaneamente, senza una preventiva sensibilizzazione [Herberman, 1989]. Le cellule NK hanno anche caratteristiche immunoregatorie, tra cui la secrezione di citochine, chemochine [Maghazachi, 2000 & 2010]. Funzionalmente, queste cellule sono importanti nella risposta immunitaria alle infezioni virali e nel controllo della crescita di cellule tumorali [Yang et al., 2006; Maghazachi et al., 1998].

Le attività di queste cellule sono regolate da recettori attivatori ed inibitori che determinano l'azione che la cellula svolgerà [Maghazachi, 2005]. Nel sangue umano, le cellule NK costituiscono circa dal 2% al 18% del totale dei linfociti circolanti [Maghazachi, 2005 e 2003] e possono essere classificate in sottogruppi a seconda del tipo di recettori espressi sulla superficie di membrana. CD16⁺CD56⁻ costituiscono circa 85-90% delle cellule NK circolanti, sono altamente citotossiche ma producono pochissime citochine. CD16⁻CD56⁺ sono meno citotossiche ma sono produttori di elevati livelli di citochine [Rolin et al., 2014]. Le cellule NK posso essere classificate anche in base al pool di citochine espresse, infatti le NK1 esprimono IFN γ mentre le NK² esprimono IL-5 e IL-13 [Peritt et al., 1998]. In alcuni studi, le cellule NK, vengono suddivise in sottogruppi più piccoli e più specializzati come nel caso di NK22 che secerne IL-22 e le si trova nei tessuti linfoidei e nel tratto gastrointestinale [Cella et al., 2009]; oppure come NK17/NK1 che secernono IL-17 e IFN γ ma solo quando sono stimulate con IL-2 [Pandya et al., 2011].

Il ruolo delle cellule NK nelle malattie autoimmuni è stato ampiamente studiato, è disponibile on-line un database in cui sono riportate tutte le

associazioni (negative o positive) che sono state osservate nelle diverse patologie [Gandhi et al., 2011; Segal, 2007]. Nel modello animale EAE, la deplezione di NK, causa delle ricadute (relapsing) più severe e la patologia a livello del SNC è molto più pronunciata [French et al., 2004; Matsumoto et al., 1998]. Questo suggerisce che le cellule NK svolgano in realtà un ruolo protettivo specialmente dal momento che la loro deplezione comporta un aumento dell'attività delle cellule T CD4+[Hao et al., 2010]. Gli animali modello EAE con deficit del recettore per le chemochine CX3CR1 mostrano una più severa manifestazione di EAE. Questo recettore è necessario per il reclutamento delle cellule NK nel SNC, quindi la sua mancanza e la relativa comparsa di sintomi molto più accentuati indica come il passaggio delle NK rappresenti un importante evento per il miglioramento e il controllo della patologia autoimmune [Xu et al., 2005].

L'attività delle cellule NK è variabile e generalmente bassa nei pazienti affetti da SM rispetto agli individui sani. Periodi di riduzione del numero di cellule NK nel sangue è stato associato con un'alta incidenza di ricadute. In alcuni studi, è emersa una correlazione tra alta attività delle cellule NK e il totale delle lesioni rilevabili attraverso RMN (risonanza magnetica nucleare) [Grunebaum et al., 1989]. La riduzione del numero di cellule NK che possono attraversare, mediante migrazione, diversi tessuti incluso il SNC, potrebbe indicare il ruolo patologico delle cellule NK. Infatti, la riduzione dell'attività delle cellule NK potrebbe essere un fattore di rischio per nuovi attacchi. In recenti studi, i ricercatori hanno trovato una riduzione del numero di CD8_{low}CD56⁺CD3⁻CD4⁻ in pazienti con la forma CIS non trattati in comparazione con i controlli sani [De Jager et al., 2008]. Non è ancora chiaro come le cellule NK possano mediare i loro effetti, sia che essi siano positivi che negativi. Si suppone che

possano instaurarsi interazioni tra le cellule NK e le cellule dendritiche [Maghazachi, 2013 e 2012].

1.3.5 Cellule presentanti l'antigene (APCs)

1.3.5.1 *Cellule Dendritiche*

Le cellule dendritiche sono una classe di cellule derivate dal midollo osseo, derivanti da progenitori mieloidi. Agiscono essenzialmente in coordinazione sia con la risposta immunitaria adattativa che quella innata. Le cellule dendritiche sono denominate anche Antigen Presenting Cells (APCs – Cellule Presentanti l'Antigene), sono presenti nel tessuto linfoide e non linfoide come anche nel circolo sanguigno [Wu et al., 2007]. Dopo l'attivazione mediante legame con un antigene, le cellule dendritiche possono migrare dal tessuto residente o sito dell'infiammazione verso i linfonodi dove iniziano a differenziarsi nell'espressione di chemochine, incluse CCR7 [Sozzani et al., 1998; Cella et al., 1997]. Conseguentemente all'attivazione delle cellule dendritiche, esse maturano esprimendo elevati livelli di MHC di classe II, nonché marcatori come CD80, CD86 e CD40. Queste modifiche sono indispensabili per il ruolo della presentazione dell'antigene alle cellule T naïve, evento essenziale per l'avvio della risposta immunitaria adattativa. L'accumulo di cellule dendritiche all'interno del sistema nervoso centrale (SNC) è molto elevato a causa della continua necessità di immunosorveglianza di un organo così importante come il SNC. Dal momento che il SNC possiede già delle cellule presentanti l'antigene (microglia e astrociti), ci si è domandati da dove provenissero le cellule dendritiche, se esistevano dei precursori residenti del SNC o se si erano infiltrati dalla periferia [Matyszak et al., 1996; Rosicarelli et

al., 2005]. Funzionalmente, le cellule dendritiche sono essenziali per l'attivazione dei linfociti T CD4+ e CD8+. L'attivazione avviene attraverso il riconoscimento di TLR e sono così capaci di mediare la presentazione dell'antigene così come la secrezione di citochine che possono influenzare lo sviluppo della risposta adattativa. Sebbene sono state identificate cellule dendritiche mature nel cervello con stato infiammatorio molto avanzato in pazienti con SM, paradossalmente, studi recenti, hanno dimostrato come queste stesse cellule non abbiano la capacità di stimolare le cellule T e neppure di sopprimerne la funzione [Fischer et al., 2001; Serafini et al., 2000; Suter et al., 2003].

1.3.5.2 Astrociti

Gli astrociti sono un tipo non tradizionale di cellule APC residenti nel cervello. Sono la famiglia di cellule più presente nel cervello con molteplici funzioni, primariamente non legate alle funzioni effettrici delle cellule APC.

Brevemente, sono coinvolti nel mantenimento della barriera emato encefalica (BBB), metabolismo del glutammato, stabilizzazione della concentrazione di potassio extracellulare e produzione di fattori trofici per la sopravvivenza di neuroni e glia. Gli astrociti hanno una morfologia stellata e risiedono in modo relativamente stazionario sia nella sostanza grigia e sia nella sostanza bianca del SNC [Kimelberg, 2010]. Gli astrociti non sono comunemente associati con la risposta immunitaria ma deve essere considerata, a causa della loro abbondanza nel SNC, la loro risposta ad uno stato infiammatorio. E' stato largamente dimostrato che il loro ruolo immunitario nel SNC è di tipo regolatorio mentre il loro contributo nel presentare l'antigene e attivare le

cellule T è ancora molto controverso [Nair et al., 2008]. Anche se gli astrociti sono deboli APC, rivestono un importante ruolo nella regolazione delle cellule T e nel loro reclutamento producendo potenti livelli di citochine e chemochine. Rivestono anche le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, questa loro posizione le rende i principali attori nel reclutamento dei leucociti del sistema circolatorio. Uno stato infiammatorio induce gli astrociti a produrre citochine che aumentano la permeabilità della barriera ematoencefalica, facilitando l'infiltrazione dei leucociti [Farina et al., 2007]. In risposta a segnali come IFN- γ e TNF- α , gli astrociti up-regolano ICAM-1 e VCAM-1, molecole di adesione che favoriscono la migrazione dei leucociti [Lee et al., 2000; Pozner et al., 2005].

1.3.5.3 Microglia

La neuroinfiammazione è un'infiammazione a carico del SNC che si osserva in diverse patologie come ICTUS, infezioni di varie origini e patologie neurodegenerative [Glass et al., 2010]. Questi processi sono caratterizzati dall'attivazione di cellule denominate microglia, con la conseguente permeabilità della barriera ematoencefalica seguita dalla filtrazione delle cellule immunitarie nel parenchima del SNC e secrezione di citochine infiammatorie. Tali eventi portano al danno neuronale e alla morte delle cellule stesse. L'attenzione degli scienziati si è rivolta alla microglia a causa del suo ruolo centrale nella neuroinfiammazione, diversi studi si sono concentrati sui meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nei disordini neurodegenerativi. A questo riguardo, l'attivazione della microglia sembra essere regolata da processi biologici ancora non ben conosciuti. Anche se le cellule della microglia

sono molto simili ai macrofagi periferici, esse presentano delle differenze molto importanti. Per esempio, la distruzione della barriera ematoencefalica viene rilevata dalle cellule della microglia che vengono attivate da proteine sieriche [Ransohoff and Perry, 2009]. A differenza dei macrofagi che sono costantemente sostituiti da nuovi progenitori mieloidi, le cellule microgliari non subiscono turnover nel cervello, tuttavia proliferano se attivate [Kettenmann et al., 2011 and Ransohoff and Perry, 2009].

In un cervello sano, la microglia svolge azione di controllo continuo dell'ambiente circostante [Nimmerjahn et al., 2005]. Le cellule microgliali esprimono molecole di superficie e secernono fattori solubili che influenzano le funzioni degli astrociti e dei neuroni [Kettenmann et al., 2011], promuovendo la clearance dei detriti cellulari e degli aggregati proteici [S. Lee et al., 2010], .

Se nel cervello si manifesta un evento infiammatorio, le cellule della microglia si comportano come i macrofagi periferici. La risposta infiammatoria ad un agente patogeno ha inizio dalla stimolazione del recettore TLR. I più importanti tra questi sono, TLR4 e TLR2 che sono espressi dalla microglia e sono specificatamente associati con la neuroinfiammazione e la clearance degli aggregati proteici coinvolti in alcune patologie neurodegenerative [Kim et al., 2013 and Reed-Geaghan et al., 2009].

1.4 PATOGENESI

Durante il decorso della sclerosi multipla molteplici processi di infiammazione e neurodegenerazione si alternano e si sovrappongono generando placche sclerotiche che rappresentano il tratto distintivo di questa patologia. L'avvicinarsi di questi processi è piuttosto complesso e l'esatto ordine degli eventi che si verificano nel corso della malattia rimane ancora da chiarire [Fig.4] [Loma e Heyman, 2011]. I target della risposta autoimmune è la mielina che riveste i neuroni. L'ingresso delle cellule immunitarie del SNC dipende dal loro stato di attivazione, e dalla loro capacità di rispondere a segnali, quali citochine e chemochine che le inducono ad attraversare la barriera ematoencefalica [Dhib-Jalbut, 2007]. Nelle lesioni attive della SM si riscontra un accumulo perivascolare di linfociti CD4+ e CD8+, monociti, linfociti B e macrofagi [Hafler et al., 2005]. Le attuali conoscenze patogenetiche sulla SM suggeriscono che alla base della componente flogistica della malattia vi sia un processo immunologico mediato dalle cellule T, ma per lo sviluppo delle placche di demielinizzazione diverse componenti immunitarie vengono coinvolte [Loma e Heyman, 2011].

L'attivazione dei linfociti T avviene a livello dei linfonodi periferici ed è dovuta al riconoscimento di peptidi antigenici da parte di recettori TCR presenti sulla superficie dei linfociti CD4+. Questi antigeni vengono presentati al linfocita in associazione a molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHCII) e molecole accessorie, da parte di cellule presentanti l'antigene (APC) [Abbas, 2012]. La natura dell'autoantigene che induce la SM non è ancora nota, ma peptidi antigenici rilevanti nella SM e nella EAE derivano da proteine associate alla mielina, quali la proteina proteolipidica della mielina

(PLP) [Greer e Pender, 2008], la glicoproteina oligodendrocitica della mielina (MOG) [O'Connor et al., 2005] e la proteina basica della mielina (MBP) [Warren e Catz, 1993]. Cellule T reattive nei confronti della mielina sono state ritrovate nel sangue, nel fluido cerebrospinale e nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da SM [Weissert, 2013].

In seguito all'attivazione nei tessuti periferici, i linfociti T autoreattivi e i monociti sono in grado di migrare e legarsi alla barriera ematoencefalica. In questa fase sono coinvolte due molecole di adesione linfocitaria VLA-4 (Very Late Antigen 4) e LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) e i loro partner di legame presenti a livello vascolare e intercellulare VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) e ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) rispettivamente [Dhib-Jalbut, 2007]. Il legame delle integrine con i recettori ICAM-1 o VCAM-1 permette al leucocita un'adesione stabile, bloccandone il normale "rolling" lungo il vaso e inoltre porta all'attivazione di una serie di proteine chinasi che andranno ad alterare temporaneamente le giunzioni tra le cellule endoteliali, permettendo al leucocita il passaggio attraverso il vaso [Abbas, 2012]. L'ingresso dei linfociti nel SNC può essere inoltre facilitato a causa della degradazione della membrana basale sottostante il tessuto endoteliale, che può avvenire ad opera di metalloproteinasi di matrice (MMPs). Questi enzimi vengono prodotti da diversi tipi cellulari, tra cui monociti, macrofagi, linfociti T, cellule endoteliali, nonché cellule del SNC quali microglia, astrociti e oligodendrociti [Dhib-Jalbut, 2007]. L'attività di questi enzimi è normalmente regolata da un inibitore tissutale delle MMP (TIMPs). In particolare un aumento dei livelli di una metalloproteinasi specifica, la gelatinasi B, è stato associato alla EAE ed è correlato ad un aumento del danno alla barriera ematoencefalica e ad una maggiore

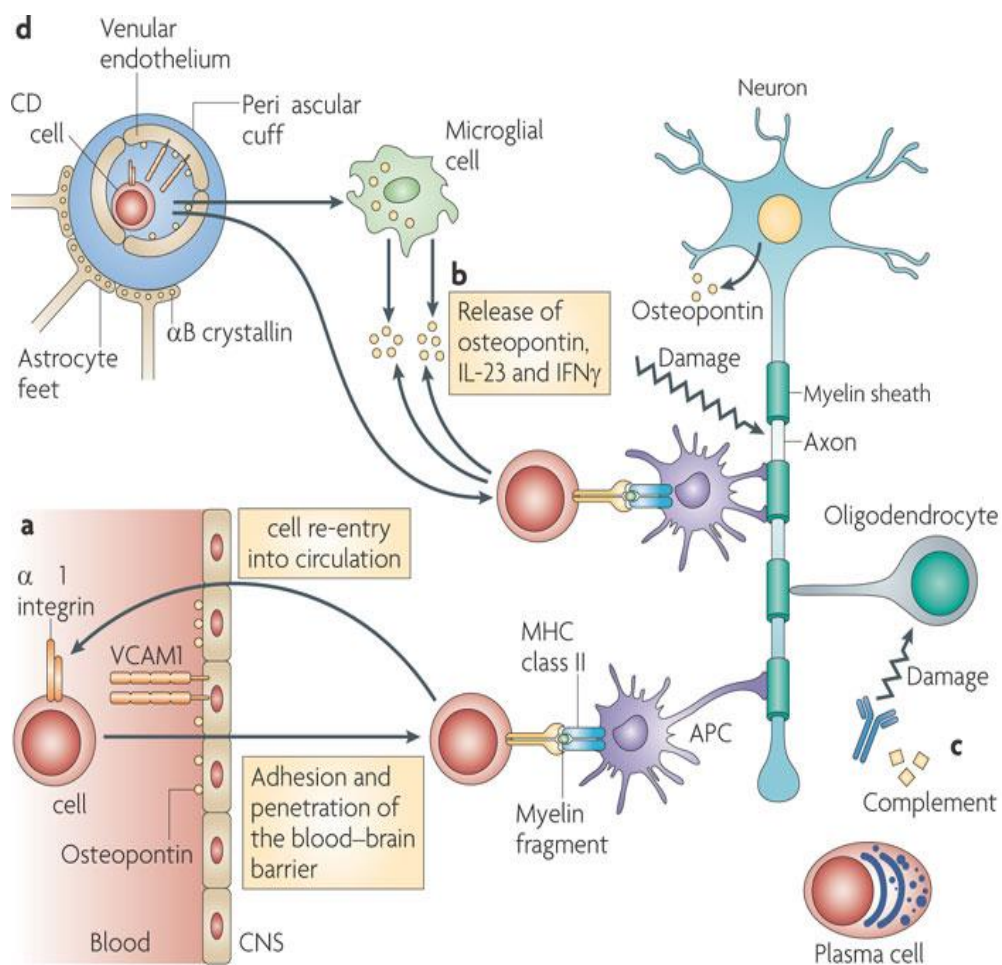
permeabilità per le cellule immunitarie [Lee et al., 1999]. Una volta all'interno del SNC i linfociti T attivati possono causare danno assonale sia in modo diretto che indirettamente. Uno degli effetti indiretti è dovuto alla secrezione da parte dei CD4+ di numerosi prodotti pro infiammatori, come IL-2, uno stimolatore autocrino di divisione cellulare e IFN, che va ad attivare macrofagi e microglia e induce il differenziamento dei Th0 in Th1. A loro volta i macrofagi attivati rilasciano IL-12 che induce i Th1 a secernere più IFN, amplificando l'effetto della risposta [Parkin e Cohen, 2001].

Il danno diretto agli oligodendrociti e alla mielina è causato da numerose cellule e prodotti cellulari. Le cellule della microglia e i macrofagi attivati causano danno attraverso il rilascio di composti tossici che inducono apoptosi. I prodotti delle cellule della microglia che sono responsabili della tossicità neuronale comprendono IL-1 β , IL-6, TNF- α e l'ossido nitrico (NO) [Jack et al., 2005]. L'ossido nitrico, prodotto dall'enzima NO sintasi viene sintetizzato anche dai macrofagi attivati, l'espressione di questo enzima risulta essere abbondante ai margini delle lesioni della SM. L'ossido nitrico si può combinare con il superossido a formare perossinitrito, il quale è in grado di nitrosilare ammine e solfati presenti nelle proteine e nei lipidi. Nitrolisine sono infatti riscontrate a livello delle placche e rappresentano assieme ai frammenti di MBP dei marker del danno alla mielina [Wang et al., 2004].

Anche i linfociti CD8+ e le cellule $\gamma\delta$, insieme agli anticorpi e al complemento possono mediare gli attacchi alla mielina. Nelle lesioni le cellule CD8+ sono presenti in sovrannumero rispetto ai CD4+ e sono in grado di riconoscere gli antigeni presentati in associazione agli MHC di classe I che possono essere sovraespressi sulla superficie dei neuroni danneggiati. I linfociti citotossici

CD8+ hanno la capacità di lisare direttamente il target attraverso la secrezione di granuli litici. Anche se meno conosciuto il ruolo di cellule $\gamma\delta$ nella SM, esse hanno la capacità di lisare gli oligodendrociti attraverso il rilascio di perforine [Sospedra e Martin, 2005].

Anche i linfociti B e gli anticorpi da loro prodotti possono contribuire allo sviluppo delle placche. Anticorpi anti MOG e anticorpi diretti contro la MBP sono infatti stati isolati da lesioni della SM [Weissert, 2013]. Nel SNC sia gli astrociti che i Th1 producono chemochine e delle 10 famiglie di recettori di chemochine, CCR1 e CCR2, sembrano essere correlati con la SM [Dhib-Jalbut, 2007]. Sembra infatti che pazienti con la SM abbiano ridotti livelli di chemochina CCL2 nel fluido cerebrospinale in confronto ai soggetti sani. Ciò è dovuto al fatto che vi è un sostanzioso numero di cellule infiltrate che portano il recettore per CCL2 [Fox et al., 2006]. Le cellule T regolatorie (Treg), un particolare tipo di cellule CD4+, sono anch'esse coinvolte nella patogenesi della SM. Il ruolo di questi linfociti è quello di regolare i CD4 effettori, Th1, Th2 e Th17 portando ad una soppressione dell'attività di questi ultimi [Loma e Heyman, 2011]. Dai dati ottenuti sembra che il numero di cellule Treg sia pressoché uguale nei pazienti e nei controlli, sebbene nei primi la funzionalità di queste cellule risulti ridotta [Haas et al., 2005].



Nature Reviews | Immunology

Fig.4 Ipotetico meccanismo patogenetico della SM. (a) meccanismo di extravasazione verso il SNC delle cellule immunitarie. (b) Secrezione di segnali chimici all'interno del cervello prodotte dal sistema immunitario e che danneggiano gli oligodendrociti. (c) Plasmacellule producono anticorpi anti mielina. (d) Gli astrociti producono fattori che potrebbero indurre regressione nella experimental autoimmune encephalitis (EAE) [Compston et al., 2008]

1.5 Trattamenti farmacologici

La sclerosi multipla come già descritto è una malattia ad origine multifattoriale, con un quadro patogenetico molto complesso, tali caratteristiche rendono difficoltosa la ricerca di un trattamento risolutivo per i pazienti affetti da questa patologia. Ad oggi, infatti, non esiste una cura definitiva, tuttavia numerosi farmaci sono stati messi a punto negli anni allo scopo di rallentare il decorso clinico della malattia, ridurre la gravità e la durata degli attacchi e curarne la sintomatologia. Si possono distinguere tre categorie principali di farmaci per il trattamento della SM:

- Farmaci per contrastare gli attacchi: quando si verifica una ricaduta, vengono somministrati per pochi giorni o settimane farmaci steroidei, allo scopo di ridurre la durata dell'attacco e limitarne i danni. Questi farmaci determinano un miglioramento clinico rapido ma non duraturo [Troiano et al, 1987].
- Terapie a lungo termine (farmaci di prima e seconda linea): si tratta di molecole che svolgono un' azione immunomodulante o immunosoppressiva nei pazienti, allo scopo di rallentare la progressione della patologia e ridurre l'accumulo di disabilità nel tempo [Khan et al., 2002]. I farmaci definiti immunomodulanti regolano la risposta del sistema immunitario, senza però diminuirla [Khan et al., 2002]. Al contrario i farmaci immunosoppressori esplicano la loro azione terapeutica generando un abbassamento della risposta immunitaria [Gonsette, 2003].

- Farmaci per la cura della sintomatologia: questi farmaci agiscono sui sintomi della malattia ma non intervengono sui meccanismi alla base della patologia, sono quindi somministrati al fine di migliorare la qualità della vita del paziente ma non rallentano il progredire della malattia [Thompson, 1996].

Attualmente per il trattamento della sclerosi multipla recidiva remittente è approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) l'uso degli immunomodulanti a base di interferone beta (IFN β -1a Avonex®, IFN β -1a Rebif®, IFN β -1b Betaseron®, Extavia®), e glatiramer acetato [Goodin et al., 2002]. Studi clinici dimostrano che questi farmaci portano ad una riduzione del tasso di recidiva del 29-34% rispetto a pazienti trattati con placebo e mostrano una modesta efficacia nel rallentare la progressione della disabilità [Goodin et al., 2002].

Altri farmaci approvati per il trattamento della malattia, sono natalizumab, mitoxantrone, ciclofosfamide e fingolimod. Tuttavia per motivi di sicurezza sono considerati farmaci di seconda linea, utilizzati solo in determinati condizioni, ad esempio nel caso in cui non vi sia una risposta del paziente ai trattamenti di prima linea [Chun e Hartung, 2010] o quando la patologia è talmente aggressiva da dover essere contrastata subito con farmaci con una potente azione contro il sistema immunitario. Esistono anche altri tipi di trattamento anche se non ufficialmente approvati.

1.5.1 Terapie di prima linea

1.5.1.1 *Interferone beta*

A livello fisiologico l'interferone beta (IFN β) è una citochina pleiotropica che viene secreta da tutte le cellule nucleate in risposta ad un'infezione virale.

Esistono due forme dell'interferone beta attualmente disponibili in commercio, l'interferone beta-lb, ottenuto mediante tecniche di ingegneria genetica da cellule batteriche (*Escherichia coli*) e l'interferone beta-la, ottenuto da cellule di mammifero (cellule ovariche di cinese hamster) [Dhib-Jalbut e Marks, 2010]. L'interferone beta-lb, essendo un prodotto batterico, a differenza della molecola naturale non è glicosilato, nonostante questa attività biologica è analoga a quella dell'interferone naturale, ma risulta circa 10 volte meno potente [Antonetti et al., 2002]. Si ritiene che ciò sia causato dalla mancanza della porzione glicosilata che rende l'interferone beta lb tendente a formare aggregati molecolari, riducendone la solubilità [Runkel et al., 1998]. L'interferone beta-la, ottenuto da cellule di mammifero, presenta invece una struttura chimica analoga a quella dell'interferone beta naturale [Dhib-Jalbut e Marks, 2010].

Attraverso il legame con i recettori IFN di tipo I presenti sulla superficie cellulare, l'interferone beta attiva una cascata di segnalazione che culmina con l'espressione di prodotti genici ad effetto antivirale, antiproliferativo e immunomodulatorio [Dhib-Jalbut e Marks, 2010]. I meccanismi che sono alla base dell'azione terapeutica dell'IFN β non sono ancora pienamente compresi, tuttavia si ipotizza che agisca riducendo l'attivazione dei linfociti T, regolando la produzione di citochine in favore di un effetto antiinfiammatorio, ostacolando l'adesione dei linfociti T all'endotelio della barriera

ematocencefalica impendendone l'extravasazione e infine inducendo le cellule T regolatorie (Treg) [Dhib-Jalbut e Marks, 2010].

La terapia con IFN β inibisce l'attivazione delle cellule T e la loro proliferazione in diversi modi. Innanzitutto attraverso la downregolazione dell'espressione delle molecole MHC II e di molecole costimolatorie, interferisce con la fase di processamento dell'antigene e successiva presentazione al linfocita T che è indispensabile per la sua attivazione [Jiang et al., 1995]. Allo stesso tempo stimola l'espressione di CTL4, una molecola costimolatoria intracellulare e della proteina Fas sulla superficie dei linfociti CD4+. Come dimostrato da Hallal-Longo et al. la sovrapproduzione di queste due molecole conduce all'apoptosi delle cellule T autoreattive [Hallal-Longo et al., 2007]. Inoltre l'interferone media l'attività del recettore di chemochine CCR7, una molecola cruciale per l'ingresso dei linfociti T nei linfonodi periferici. L'aumento di espressione di CCR7 indotto dal farmaco sui linfociti T autoreattivi potrebbe in un certo modo veicarli a livello degli organi linfoidei secondari e così facendo prevenirne l'invasione nel SNC [Vallittu et al., 2007] con effetti chiaramente benefici per il paziente.

Come precedentemente accennato l'azione dell'interferone si esplica anche nella regolazione della produzione di citochine, in particolare inibisce la produzione di citochine infiammatorie Th1 indotte, quali IFN- γ e IL-12 e promuove invece la risposta antinfiammatoria mediata dai linfociti Th2 [Wang et al., 2000].

Il farmaco agisce inoltre a livello della barriera ematoencefalica, causando un aumento della concentrazione della molecola di adesione VCAM-1 solubile (sVCAM-1) [Fig.5]. In questo modo può bloccare l'adesione dei leucociti all'endotelio e quindi impedirne l'extravasazione. Infatti l'aumento del

sVCAM-1 andrebbe a saturare la molecole di adesione VLA4 presente sulla superficie dei leucociti con conseguente mancanza di adesione alla parete endoteliale e fuoriuscita del linfocita dal vaso sanguigno [Graber et al., 2005]

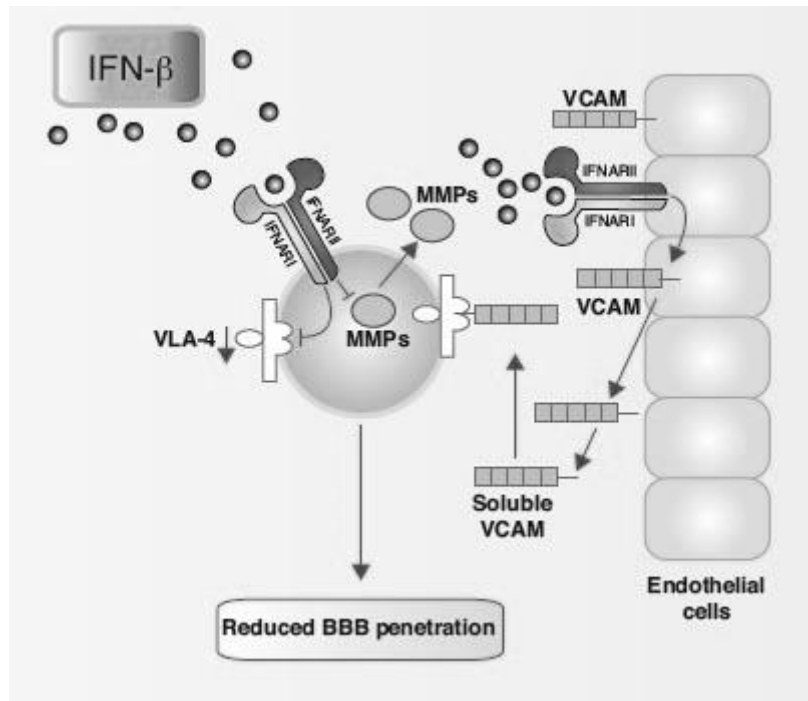


Figura 5- Rappresentazione schematica di come l'IFN β agisce sulla barriera emato-encefalica.
[\[https://www.interferonsource.com/content/interferon-beta-and-multiple-sclerosis/\]](https://www.interferonsource.com/content/interferon-beta-and-multiple-sclerosis/)

Un' altra molecola che viene sovraespressa in presenza di interferone è CD73, un ectoenzima prodotto dalle cellule endoteliali e dai linfociti periferici, il cui ruolo è quello di produrre adenosina, che secondo diversi studi condotti su modelli sperimentali di encefalite autoimmune svolge un ruolo antinfiammatorio e neuroprotettivo [Airas et al., 2007].

La terapia con IFN beta inoltre promuove l'espressione ad alti livelli di un importante fattore di attivazione dei linfociti B (BAFF), come rivelano analisi del siero di pazienti con MS trattati, che in confronto a soggetti di controllo sani mostrano un valore del 50% superiore di BAFF [Krumbholz et al., 2008]. Alti livelli di questo fattore sono stati riscontrati in diverse malattie autoimmuni mediate da cellule B [Stohl et al., 2003]. Quindi l'aumento di questo fattore di sopravvivenza dei linfociti B potrebbe favorire lo sviluppo di

anticorpi IFN-neutralizzanti e questo potrebbe spiegare la diversità di risposta dei pazienti all'interferone [Gandhi et al., 2008].

Nello studio clinico PRISMS è stata valutata l'efficacia del trattamento con interferone beta 1a su 560 pazienti con sclerosi multipla recidiva remittente, i dati ottenuti hanno confermato l'effetto terapeutico del farmaco mostrando una riduzione delle ricadute del 27%, un aumento del tempo di latenza per la prima ricaduta e un incremento del numero di pazienti liberi da recidiva [Ebers, 1998].

Successivi studi clinici quali INCOMIN e EVIDANCE hanno cercato di individuare il miglior dosaggio di somministrazione dell' interferone, confrontando diversi regimi terapeutici. Nello studio INCOMIN è stata confrontata la terapia di interferone beta 1b somministrato per via sottocutanea a giorni alterni con un dosaggio di 250 µg, contro la somministrazione per via intramuscolare di 30 µg di interferone beta 1a una volta alla settimana [Durelli et al., 2002]. Mentre nel trial EVIDENCE è stata confrontata la somministrazione di interferone beta 1a tre volte a settimana a concentrazione di 44 µg contro un dosaggio di 30 µg una volta alla settimana [Schwid et al., 2005]. In entrambi si ha avuto una riduzione statisticamente significativa delle recidive e delle lesioni attive T2 alla risonanza magnetica, con la somministrazione della dose maggiore di interferone [Durelli et al., 2002; Schwid et al., 2005].

Malgrado l'apparente successo, l'efficacia clinica del farmaco è ristretta a un sottogruppo di pazienti con RRMS che rappresentano all'incirca il 30% del totale. Inoltre molto spesso possono insorgere effetti collaterali quali sintomi influenzali, fatica, depressione e patologie più gravi che possono portare alla cessazione del trattamento [Borden et al., 2007].

1.5.1.2 Glatiramer acetato

Il Glatiramer acetato (anche conosciuto come GA, Copaxone, Copolimero-1, COP) è un farmaco costituito da un insieme di peptidi a sequenza casuale composti da quattro aminoacidi, L-tirosina, L-glutammato, L-alalina e L-lisina in un preciso rapporto molare, a formare sequenze di lunghezza compresa tra i 40 e 100 residui amminoacidici [Farina et al., 2005]. I quattro amminoacidi che compongono il farmaco simulano la composizione amminoacidica della proteina basica della mielina (MBP), ossia uno degli auto antigeni implicati nella patogenesi della malattia e della corrispondente forma sperimentale [Weber et al., 2007]. La somiglianza con la MBP fa sì che il farmaco funga da “falso bersaglio” per le cellule T autoreattive dirette verso la mielina, che in questo modo vengono distolte dal target principale, riducendo i danni a carico del sistema nervoso centrale [Farina et al., 2005]. Inoltre diversi studi dimostrano che il trattamento con GA promuove lo sviluppo di cellule Th2, le quali possono rilasciare citochine antiinfiammatorie e sostanze neuro protettive, tamponando l'attività dei linfociti T autoreattivi circostanti, in un processo noto come bystander suppression [Aharoni et al., 2000; Neuhaus et al., 2000].

Inizialmente utilizzato come strumento di studio della EAE, si vide che il farmaco, in realtà, inibiva la manifestazione patologica [Arnon et al., 1989]. Studi clinici condotti negli anni 90 permisero di dimostrare che il farmaco era in grado di ridurre il tasso di ricaduta del 30% in pazienti trattati [Johnson et al., 1995], per tale motivo dal 1995 è stato approvato per il trattamento della SM in molti paesi, ed è ad oggi uno dei farmaci più utilizzati per il trattamento della SM recidiva remittente [Weber et al., 2007]. Il farmaco viene somministrato giornalmente tramite iniezione sottocutanea [Farina et al., 2005].

1.5.2 Terapie di seconda linea

1.5.2.1 Mitoxantrone

Il mitoxantrone è un agente citotossico, largamente utilizzato come antineoplastico per il trattamento di numerosi tumori, tra cui il cancro al seno, leucemie e linfoma non Hodgkin . Il farmaco è un agente intercalante e come tale agisce a livello nucleare legandosi alla molecola di DNA, impedendone la replicazione e trascrizione e quindi riducendo la proliferazione cellulare [Martinelli et al., 2009]. Inoltre inibisce l'attività dell'enzima topoisomerasi II, interferendo con il meccanismo di riparazione del DNA [Martinelli Boneschi et al., 2013].

Dal 2000 il mitoxantrone è stato approvato dalla Food and Drug Administration come farmaco per il trattamento della sclerosi multipla progressiva [Martinelli Boneschi et al., 2013]. La prima evidenza dell'efficacia del mitoxantrone nel trattare la sclerosi multipla è derivata da studi condotti sui modelli animali di encefalomyelite autoimmune sperimentale, i quali mostrarono che la somministrazione intravenosa del farmaco era in grado di rallentare l'evoluzione della malattia [Lublin et al., 1987]. L'effetto terapeutico è dovuto alle proprietà immunosoppressive del farmaco che è in grado di indurre una immunosoppressione generalizzata, inibendo la proliferazione delle cellule coinvolte nelle reazioni immunitarie, quali linfociti B, linfociti T e macrofagi [Martinelli et al., 2009]. Inoltre provoca una diminuzione della produzione di citochine pro infiammatorie e inibisce la degradazione della mielina mediata dai macrofagi [Martinelli et al., 2009]. È un agente immunosoppressivo a lunga durata d'azione, che una volta somministrato per via

endovenosa viene rapidamente assorbito dai tessuti ed è rilasciato gradualmente [Ehninger et al., 1986]. Uno degli effetti collaterali rilevanti di questo farmaco è la sua azione tossica nei confronti dei tessuti cardiaci, per questo motivo solo determinati soggetti con forme aggressive di SM recidiva remittente o SM secondaria progressiva sono sottoposti a questa terapia [Fox, 2006].

1.5.2.2 Ciclofosfamide

Un altro agente immunosoppressore che viene utilizzato nel trattamento della SM è la ciclofosfamide. Questo farmaco utilizzato come antineoplastico, viene inoltre impiegato da circa 40 anni per il trattamento delle forme più gravi di SM, sebbene non faccia parte dei farmaci approvati dalla FDA [Rinaldi et al., 2009]. Questa molecola è un agente alchilante, somministrato come profarmaco, viene convertito nel fegato nella forma attiva che agisce inserendo gruppi alchilici a livello del DNA. Tutto ciò può portare ad un errato appaiamento delle basi azotate e rotture all'interno dei filamenti, che possono generare errori durante la fase di replicazione cellulare e quindi hanno effetto citotossico e antiproliferativo [Awad e Stüve, 2009]. Il farmaco agisce principalmente su cellule in attiva divisione, comprese quelle del sistema immunitario, è dimostrato infatti che alte dosi di ciclofosfamide riducono marcatamente la risposta immunitaria e generano un effetto antiinfiammatorio [Rinaldi et al., 2009].

Gli effetti tossici di tale farmaco, in particolare a livello vescicale ed il rischio di sviluppare neoplasie, ostacolano l'impiego della ciclofosfamide come farmaco di prima linea [Weiner e Cohen, 2002].

1.5.2.3 Fingolimod

Fingolimod (conosciuto anche come FTY720) è un composto innovativo, è il primo farmaco per il trattamento della sclerosi multipla somministrato per via orale [Chun e Hartung, 2010], a differenza degli altri trattamenti che invece necessitano di somministrazione sottocutanea o intramuscolare e quindi più invasiva. E' il capostipite di una nuova classe di molecole che agiscono sul sistema immunitario: i modulatori dei recettori della sfingosina 1 fosfato (S1PR) [Gasperini e Ruggieri, 2012]. Il farmaco è un analogo strutturale della sfingosina, una molecola il cui ruolo è quello di mediare il traffico cellulare tra gli organi linfoidi e il sangue. Il farmaco svolge il suo effetto terapeutico sequestrando i linfociti nei linfonodi, impedendo loro di migrare nel sistema nervoso centrale e attaccare la mielina che riveste le fibre nervose [Groves et al., 2013]. Dal 2011 il farmaco è commercializzato anche in Europa e viene utilizzato per il trattamento di forme molto attive di RRMS o in pazienti che non rispondono alla terapia con interferone [Maciejek et al., 2013]. Nel dicembre del 2011 si è verificato un caso di morte improvvisa in seguito all'assunzione del farmaco [Lindsey et al., 2012], successivamente sono stati riportati altri casi di morte alcuni dei quali in seguito ad attacco cardiaco [Vargas e Perumal, 2013]. Sebbene al momento della sua autorizzazione nessun caso di decesso si era verificato negli studi clinici, è noto che il farmaco può causare una transitoria bradicardia che potrebbe portare a un blocco atrioventricolare [Vargas e Perumal, 2013]. Tuttavia attualmente non è chiaro se vi sia una correlazione tra tali decessi e l'utilizzo del farmaco.

1.5.2.4 Natalizumab

Natalizumab (Tysabri®, Biogen Idec Inc., Cambridge MA) è un anticorpo monoclonale umanizzato con struttura IgG4 diretto contro il dominio $\alpha 4$ della $\alpha 4\beta 1$ integrina nota anche come VLA-4 [Fig.6] [Niino et al., 2006].

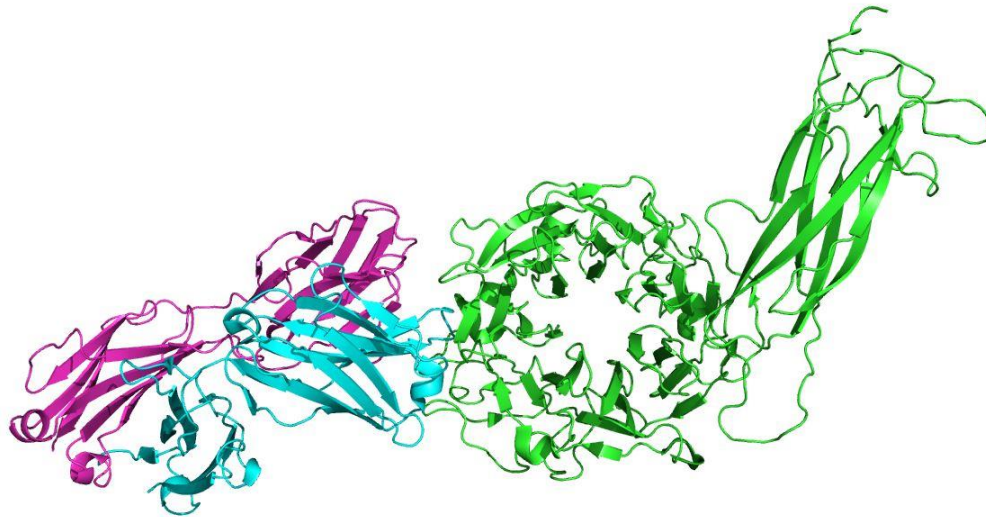


Figura 6 - Cristallografia della subunità $\alpha 4$ (in verde) di VLA4 complessata con la porzione Fab di natalizumab (in blu è rappresentata la catena pesante, mentre in rosa la catena leggera). (Yu et al., 2013; PDB ID: 4IRZ)

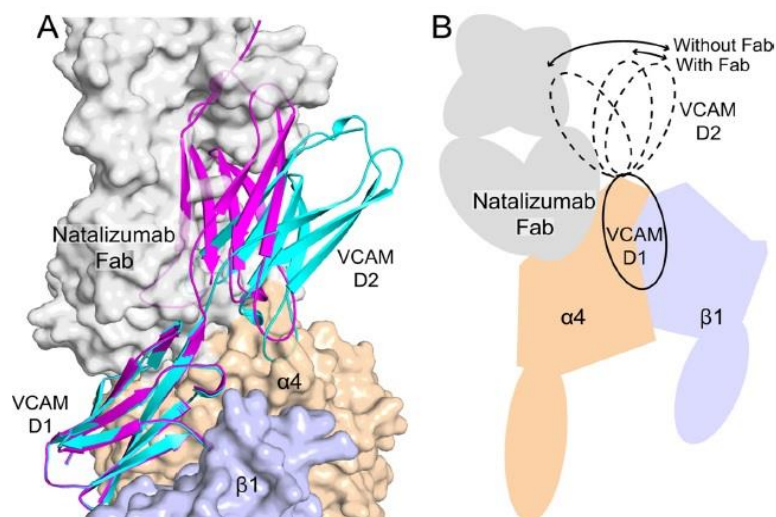


Figura 1 - (A) Modello di interazione natalizumab-VLA4. (B) Spiegazione grafica della stereochimica di natalizumab nel suo sito di legame di VLA4 in concomitanza con VCAM1 (Yu et al., 2013; PDB ID: 4IRZ)

VLA-4 è una molecola d'adesione espressa sulla superficie di linfociti, monociti e eosinofili, essa interagisce con la molecola VCAM1 presente nel tessuto endoteliale [Lobb and Hemler, 1994]. L'interazione tra queste due proteine permette l'adesione dei leucociti alla parete endoteliale e la successiva extravasazione nel tessuto infiammato [Ley et al., 2007]. Natalizumab attraverso il legame con l' $\alpha 4$ -integrina inibisce l'interazione tra VLA-4 e VCAM1 [Fig.7] impedendo la migrazione dei leucociti autoreattivi dai vasi sanguigni ai tessuti target [Rice et al., 2005] [Fig.8].

Comparato con altri anticorpi umani IgG, l'anticorpo IgG4 ha il vantaggio di possedere un'emivita relativamente lunga [Mountain e Adair, 1992]. L'emivita di Natalizumab alle dosi utilizzate è all'incirca di 11 giorni [Sheremata et al., 1999].

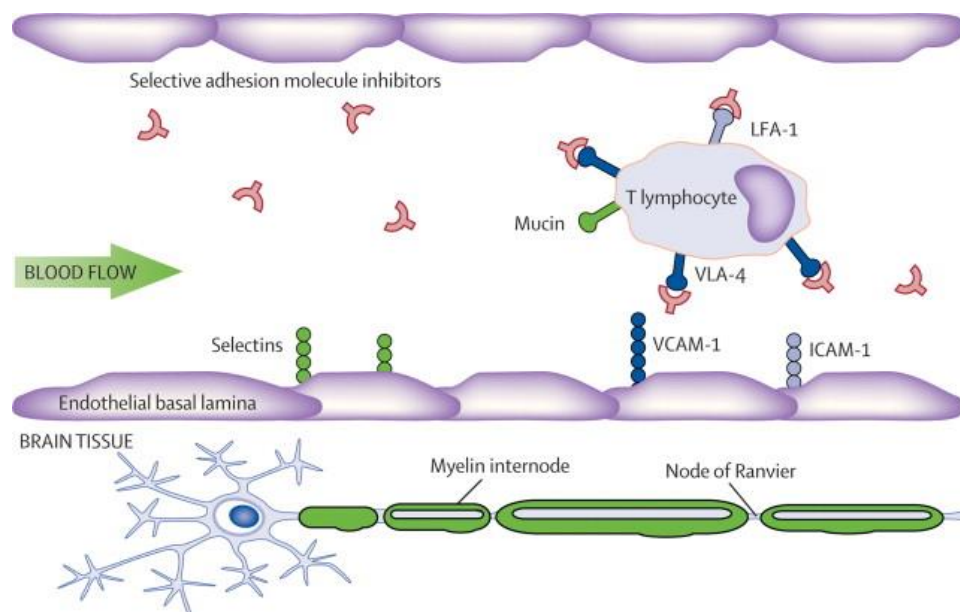


Figura 8 - Inibizione della tras migrazione dei linfociti T dal sangue al cervello ad opera di natalizumab [Polman et al., 2006]

Nel 1991 Yednock et al. mostrarono l'azione terapeutica del farmaco in topi modello della SM e lo studio evidenziò che il bersagliamento di $\alpha 4$ -integrina poteva prevenire lo sviluppo di lesioni demielinizzanti [Yednock et al. 1992]. Successivi studi quali AFFIRM, trial monoterapico [Polman et al., 2006], e

SENTINEL, trial di co-somministrazione con interferone beta la [Rudick et al., 2006], testarono la validità clinica dell'anticorpo su pazienti con SM recidiva remittente.

Il farmaco è stato approvato nel novembre 2004 dalla Food and Drug Administration per il trattamento della SM recidiva remittente in USA. Pochi mesi dopo la casa farmaceutica ne annunciò il ritiro dal mercato, dopo che a due pazienti affetti da SM e uno con morbo di Crohn venne diagnosticata la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) [Van Assche et al., 2005; Langer-Gould et al., 2005].

La PML è una malattia mortale che porta a demielinizzazione del sistema nervoso centrale, causata dal poliomavirus umano JC [Van Assche et al., 2005]. Nonostante il virus sia presente in circa il 70% della popolazione adulta [Iii et al., 1992], la PML è una patologia molto rara, che si sviluppa in pochi casi, in particolare in soggetti in cui il sistema immunitario è compromesso come ad esempio pazienti affetti da HIV, individui che hanno subito trapianti, malati reumatici [Major, 2010]. In seguito ad infezione primaria in molti casi il virus permane latente nel fegato e negli organi linfoidi [Sørensen et al., 2012], successivamente un eventuale riattivazione del virus può renderlo in grado di infettare e lisare gli oligodendrociti del SNC causando la PML [Berger e Kahlili 2011].

Alcuni studi sostengono che ci sono pazienti più a rischio di altri di sviluppare la malattia, sebbene infatti non vi sia una certezza, sono stati individuati tre fattori di rischio da tenere in considerazione: la durata del trattamento con natalizumab, una precedente terapia con agenti immunospressivi e la presenza di anticorpi anti JVC [Sørensen et al., 2012]. Sembra che il rischio aumenti notevolmente dopo due anni dall' inizio dalla terapia con natalizumab, con una

stima di 5 su 1000 pazienti trattati contro i 0,2-2,8 stimati dai trial clinici nel corso di 24 mesi è [Sørensen et al., 2012]. Biogen Idec ha inoltre stimato che un trattamento con agenti immunosoppressivi precedente alla terapia con Tysabri, come avviene nel 45% dei casi, aumenti il rischio di PML di tre o quattro volte rispetto ai pazienti che non hanno subito tale trattamento [Vermersch et al., 2011]. Infine la valutazione della presenza di anticorpi anti JVC in un campione di sangue concorre a stimare il grado di rischio del paziente, poiché l'infezione virale è indispensabile per l'incorrere della malattia. A tale scopo Gorelik et al. hanno messo a punto un metodo affidabile e sensibile basato su un Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) per determinare la presenza degli anticorpi diretti contro il poliomavirus [Gorelik et al., 2010].

Al fine di soppesare il rischio di PML è stata costituita una commissione di esperti (Independent Adjudication Committee - IAC) che, sulla base dei dati dei trial condotti, ha stimato l'incidenza della malattia pari a 1,0 casi di PML ogni 1000 trattati (IC: 95% 0,2-2,8) su una popolazione che aveva ricevuto il farmaco per un periodo medio di 17,9 mesi [Yousry et al., 2006]. A seguito di tale stima, nel 2006 il farmaco è ritornato sul mercato statunitense con l'obbligo di inserire i pazienti trattati all'interno di un programma di monitoraggio creato ad hoc, il TOUCH programme [Sørensen et al., 2012]. Nello stesso anno è stato introdotto in Europa [Sørensen et al., 2012] e da allora circa 38000 pazienti sono in cura con questo farmaco ma si sono verificati nuovi casi di PML. Per questo motivo il ministero della salute italiano ha decretato che natalizumab deve essere somministrato solo se le tradizionali terapie non danno risultati apprezzabili e comunque dopo un certo periodo di sospensione dall'interferone beta 1a ("AIFA Agenzia Italiana del Farmaco.

DETERMINAZIONE 7 dicembre 2006 - Regime di rimborsabilità e prezzo di vendita della specialità medicinale «Tysabri» (natalizumab). (Determinazione/C n. 115/2006). (GU n. 292 del 16-12-2006). 7-12-2006," n.d.).

1.5.3 Sviluppo di nuovi trattamenti

Negli ultimi anni il mondo della ricerca ha riservato notevole spazio alla messa a punto di terapie alternative per il trattamento della sclerosi multipla. Attualmente sei farmaci sono in fase di sperimentazione e sono entrati o hanno superato la fase II o fase III degli studi clinici. Tre di questi, laquinimod, teriflunomide e dimetil fumarato sono farmaci a somministrazione orale, mentre alemtuzumab, daclizumab e rituximab appartengono alla categoria degli anticorpi monoclonali [Castro-Borrero et al., 2012].

Laquinimod è un composto sintetico ad azione immunomodulante, disponibile per via orale. Le sue proprietà terapeutiche e antiinfiammatorie sono dovute al fatto che promuove la down regolazione dei fattori di trascrizione dei geni MHC di classe II, stimola la produzione di fattori neurotrofici, promuove la secrezione dell'IL-4 (una citochina antiinfiammatoria) da parte dei linfociti CD4+ e induce l'apoptosi dei CD8+ e cellule B [Thöne and Gold, 2011].

Un altro composto che sembra essere promettente per il trattamento della RRSM è il teriflunomide, il metabolita attivo del leflunomide, un composto da tempo utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide. Questo agente possiede proprietà immunosoppressive e antiinfiammatorie poiché inibisce la sintesi delle basi pirimidiniche del DNA, interferendo quindi con la proliferazione delle cellule in attiva divisione, compresi i linfociti T, linfociti B e macrofagi [Warnke et al., 2009].

Un'ulteriore terapia basata su somministrazione per via orale prevede l'uso del dimetil fumarato (BG-12), un derivato dell'acido fumarico. Questo farmaco ha dimostrato avere un effetto neuroprotettivo in studi condotti su modelli animali, principalmente poiché agisce promuovendo l'attivazione del fattore Nrf2 che attiva pathway coinvolti nella risposta allo stress ossidativo [Gold et al. 2012]. BG-12 sembra inoltre possedere proprietà immunomodulanti, sebbene il meccanismo rimanga in parte sconosciuto, si crede che inibisca l'azione delle cellule immunitarie promuovendo l'espressione di citochine antiinfiammatorie, quali IL-10, IL-4 e IL-5 [Castro-Borrero et al., 2012].

Alemtuzumab, è un anticorpo monoclonale umanizzato, utilizzato negli Stati Uniti e in Europa per il trattamento della leucemia linfatica cronica e linfoma delle cellule B. Il target cellulare di questo anticorpo è CD52, una proteina di superficie espressa dai linfociti maturi, macrofagi e monociti. L'interazione del farmaco col target porta alla lisi dei linfociti attraverso un processo di citotossicità anticorpo dipendente [Rommer et al., 2008]. Dagli studi clinici effettuati su pazienti con RRSM l'anticorpo si è rivelato efficace nel contrastare le ricadute in comparazione all'interferone beta 1a [Cohen et al. 2012].

Il daclizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro la catena α del recettore dell'inteleuchina 2 (CD25), una proteina trans membrana presente sulla superficie dei linfociti T attivati. L'attivazione del recettore comporta la secrezione di citochine pro infiammatorie da parte dei linfociti T, incrementando così la proliferazione linfocitaria. Al contrario il blocco del recettore attraverso il farmaco presumibilmente si riflette in un abbassamento della risposta immunitaria [Martin, 2008]. I risultati sperimentali sembrano essere incoraggianti sia per quanto riguarda il trattamento di pazienti con

RRSM che in soggetti con SPMS, dove è stato riscontrato un chiaro miglioramento. In un futuro daclizumab potrebbe quindi rappresentare una valida opzione per il trattamento di questa categoria di pazienti [Rommer et al., 2008].

Rituximab, è invece un anticorpo monoclonale chimerico (uomo-topo) utilizzato nella pratica clinica per il trattamento di linfomi non-Hodgkin e alcune forme di artrite reumatoide. Esso viene usato in ricerca anche nel trattamento di molte malattie autoimmuni, tra cui la sclerosi multipla [Rommer et al., 2008]. Rituximab ha come target CD20, un antigene presente sulla superficie di linfociti pre-B, linfociti B, ma non su plasmacellule e cellule staminali del midollo osseo. Mediante il legame con il target rituximab promuove l'eliminazione dei linfociti B attraverso un processo citotossicità cellulo mediata e citotossicità complemento dipendente [Bar-Or et al., 2008].

1.6 Sviluppo di anticorpi anti-farmaco nelle terapie per la sclerosi multipla

Tutte le preparazioni biofarmaceutiche sono potenzialmente immunogeniche e necessitano una valutazione del rischio di sviluppare anticorpi neutralizzanti (NABs) che oltre a influire sull'efficacia della terapia possono portare allo scatenarsi di reazioni avverse.

Nel caso dell'IFN- β è stata rilevata la presenza di alti titoli di NABs in un numero consistente di pazienti. L'incidenza varia a seconda del tipo di preparazione farmaceutica e dal tipo di somministrazione (sottocutanea o intramuscolare). I dati ottenuti confrontando diversi trial clinici rivelano che i pazienti sottoposti a trattamento con IFN- β 1b intramuscolo sviluppano NABs

nel 28-47 % dei casi, mentre nella terapia con IFN- β la somministrazione sottocutanea la percentuale di casi si riduce al 12-25%. Mentre solo nel 2-6% dei pazienti sottoposti a terapia con IFN- β somministrato per via intramuscolare si sviluppano anticorpi neutralizzanti [Coleman et al., 2004].

Lo sviluppo di NAbs diretti contro l'IFN- β si riflette in una soppressione dell'attività biologica del farmaco in tempi brevi, nonostante la perdita dei benefici terapeutici si manifesti a livello clinico dopo un anno o più dalla comparsa degli anticorpi. In tale periodo di tempo si può assistere ad un peggioramento della condizione del paziente, con un aumento della frequenza di ricadute e progressione della disabilità neurologica [Farrell et al., 2007]. Le linee guida europee prevedono che i pazienti sottoposti a trattamento con IFN- β vengano periodicamente monitorati per la presenza di NAbs e i soggetti che sviluppano anticorpi persistenti devono cessare il trattamento con IFN [Sørensen et al. 2005].

Anche in pazienti trattati con natalizumab è stata riscontrata la presenza di anticorpi neutralizzanti, seppur in un minor numero di casi rispetto ai soggetti trattati con IFN- β . Nello studio AFFIRM gli anticorpi sono stati ritrovati nel sangue di 57 pazienti su un totale di 625, quindi nel 9% dei casi. Di questo gruppo il 3% è risultato positivo in modo transiente (i NAbs sono stati riscontrati una sola volta), mentre il 6% ha mostrato una positività persistente (gli anticorpi sono stati rilevati due o più volte in un intervallo di tempo superiore alle 6 settimane) [Calabresi et al., 2007]. Nei pazienti persistentemente positivi è stata riportata, in confronto ai pazienti anticorpo negativi, una riduzione dell'efficacia terapeutica del farmaco evidenziata da una progressione della disabilità, tasso di ricaduta maggiore e aumento delle lesioni cerebrali rilevabili con risonanza magnetica. Inoltre in questi pazienti vi

è una maggior probabilità di manifestare reazioni avverse correlate all'infusione, (intese come reazioni che compaiono nell'arco di 2 ore dall'infusione col farmaco) con un incidenza del 76% contro il 20% di pazienti NAb negativi. Nei soggetti risultati positivi in modo transiente invece sembra che vi sia un recupero della piena efficacia terapeutica all'incirca dopo 6 mesi di trattamento [Calabresi et al., 2007].

In generale lo sviluppo degli anticorpi anti-natalizumab si verifica entro 24 settimane dall'inizio della terapia come riportato in un recente studio che evidenzia inoltre una correlazione inversa tra i livelli di natalizumab nel siero dei pazienti e la presenza di anticorpi neutralizzanti. Un basso livello di natalizumab nel siero e alti livelli di anticorpi, anche in questo caso, sono stati associati a ricadute e sviluppo di nuove lesioni [Vennegoor et al., 2013].

Anticorpi neutralizzanti sono stati riscontrati anche in pazienti in terapia con glatiramer acetato, tuttavia non è ancora stata dimostrato se la presenza degli stessi influisce a livello terapeutico [Fox et al., 2007].

2 Materiali e metodi

2.1

Soggetti arruolati nello studio

Sono stati reclutati pazienti affetti da sclerosi multipla nella variante recidivo-remittente (SM-RR), progressiva e soggetti di controllo provenienti dal reparto di Neurologia dell'Ospedale di Vaio-Fidenza. Il gruppo di studio è costituito da 15 pazienti e 13 soggetti di controllo. Il reclutamento dei pazienti viene eseguito in sede ospedaliera valutandone la severità della malattia, per far ciò viene utilizzata la scala di disabilità EDSS (Expanded Disability Status Score), metodo internazionale impiegato per stimare la disabilità e quindi la gravità e la progressione della malattia. I pazienti sono stati sottoposti a screening completo del sangue e del liquido cefalo-rachidiano (CSF) alla ricerca di infezioni in atto o pregresse. I clinici hanno valutato il numero di ricadute annue e quelle che si sono presentate durante il cambio terapeutico. Inoltre, sono stati valutati i pazienti rispondenti o non rispondenti alle terapie prescritte. Il gruppo di studio selezionato comprende pazienti di sesso maschile e femminile, con età che varia tra i 23 e i 46 anni.

I pazienti possono essere classificati in base alla storia farmacologica in :

- non rispondenti alla terapia con IFN- β o GA che passano al trattamento con natalizumab;
- coloro che hanno una patologia in stato avanzato e molto aggressiva che necessitano di natalizumab come prima terapia;

- rispondenti a IFN- β e che proseguono la suddetta terapia;
- Non rispondenti alla terapia con natalizumab;
- Pazienti con forme RRSM e forme progressive.

Ai soggetti partecipanti alla ricerca è stato richiesto di firmare moduli di consenso informato validato dal comitato bioetico di Parma in data 30/06/2010 verbale n°6/10

2.2 Arruolamento dei pazienti

I gruppo di pazienti selezionati comprende soggetti di sesso maschile e femminile, rispondenti e non rispondenti alle terapie di prima linea, pazienti che sospendono tali terapie per passare al trattamento con natalizumab, e soggetti che iniziano il trattamento con natalizumab come primo approccio farmacologico; le percentuali sono riportate in tabella 1. Le caratteristiche cliniche, anagrafiche e farmacologiche dei pazienti sono elencate in tabella 1.

	Maschi	Femmine
Sesso %	26%	74%
Trattamento IFN- β responder e no responder	100%	75%
Trattamento GA (no responder)	0%	12,50%
Senza Trattamento	0%	12,50%
EDSS (0-6)	2 (75%)	4 (75%)
	1 (25%)	6 (25%)
Trattamento natalizumab	0%	80%

Tabella 1 – Caratteristiche dei pazienti selezionati.

2.3 *Separazione dei linfociti da sangue intero*

Per effettuare la separazione dei linfociti da sangue intero il campione ematico viene inizialmente diluito in terreno di coltura cellulare RPMI. In una Falcon da 50 ml vengono diluiti 10 ml di sangue con uguale quantità di RPMI, ottenendo così un volume totale di 20 ml. Contemporaneamente vengono preparate quattro provette contenenti 2,5 ml di Lymphoprep (il rapporto tra sangue diluito e Lymphoprep è 2:1). Dopo di che si procede alla stratificazione di 5 ml di sangue diluito sui 2,5 ml di Lymphoprep; è necessario eseguire questo passaggio lentamente, aggiungendo 1 ml di campione per volta in modo da ottenere due strati ben definiti (Fig 9). Il campione viene quindi centrifugato a 800g per 30 minuti a 20°C in modo da ottenere la separazione dei linfociti mediante gradiente di densità. All'interno delle provette saranno visibili diversi strati, dei quali quello corrispondente ai linfociti si presenta come un anello di colorazione molto chiara posto circa nel centro della provetta (Fig 10). Si procede a raccogliere quindi l'anello con una Pasteur sterile il cui contenuto sarà trasferito in una nuova Falcon da 15 ml.

Si aggiunge terreno di coltura (RPMI) fino al raggiungimento di un volume totale di 8 ml, dopo aver risospeso le cellule il campione viene centrifugato ad 800g per 10 minuti a 20°C; terminato questo secondo processo ed eliminato il surnatante, viene aggiunto terreno completo: RPMI+ 20% FBS (siero fetale bovino) +1% glutammina +1% penicillina e streptomicina, fino al raggiungimento di un volume pari a 3 ml. Quest'ultimo passaggio viene ripetuto in modo da effettuare due lavaggi. Il pellet cellulare viene poi risospeso in 1 ml di terreno completo.

Infine 10 µl di campione vengono prelevati e addizionati a 10µl di Trypan blu per il conteggio della vitalità al microscopio ottico.

Il campione verrà suddiviso in aliquote: alcune saranno congelate con una concentrazione di $3 \cdot 10^6$ cells/ml, mentre altre dalla concentrazione totale di $5 \cdot 10^6$ cells/ml saranno sottoposte a separazione magnetica mediante biglie.

2.4 Citofluorimetria a flusso

Per valutare l'espressione di VLA-4 a livello della superficie cellulare ed il grado di saturazione del recettore con natalizumab è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica. Questa tecnica permette la misurazione e la caratterizzazione morfologica ed immunofenotipica di cellule sospese in un mezzo fluido. Rende possibile una rapida misurazione di proprietà multiple di singole cellule, permettendo un'analisi qualitativa e semi-quantitativa.

Una sospensione cellulare monodispersa (nel nostro caso leucociti) viene iniettata in un sistema fluidico il quale tende, in opportune condizioni idrodinamiche, a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura, dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser. L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genera dei segnali. Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati che provvede alla loro

visualizzazione su monitor, rappresentazione grafica, e definizione statistica.

Il campioni utilizzati per l'analisi contengono 2×10^5 cellule in sospensione in terreno RPMI 20%FBS. La sospensione viene trasferita in tubi per l'analisi citofluorimetrica e viene quindi centrifugata a 300g per 10 minuti al fine di eliminare il surnatante. Il pellet viene poi risospeso in 100µl di buffer costituito da PBS + 0,5% FBS. Vengono a questo punto aggiunti gli anticorpi, ciascuno coniugato con un diverso cromoforo, che legano quattro dei recettori presenti sui linfociti: CD3-PerCP, CD4-PE, CD8-APC e CD49d-FITC (Miltenyi Biotec). La marcatura consente al citofluorimetro di rilevare quali e quante cellule presentano un determinato recettore di membrana.

Le quantità di anticorpo utilizzate sono riportate in tabella:

Tipo di anticorpo	Volume di anticorpo
CD3-PerCP	1 µl
CD8-APC	1 µl
CD4-PE	2 µl
CD49d-FITC	5 µl

Il campione viene lasciato in incubazione con l'anticorpo per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Si effettua poi un lavaggio con 1 ml di buffer e dopo aver centrifugato a 300g per 10 min il surnatante viene eliminato. Il pellet viene risospeso in 300µl di buffer prima di essere analizzato al citofluorimetro. E' stato impostato un tetto massimo di 10000 cellule,

arrivato a questo numero lo strumento blocca automaticamente il flusso e elabora i dati numerici.

2.5 *Separazione dei linfociti T mediante separazione magnetica (magnetic cell sorting)*

La separazione dei linfociti T dalle altre popolazioni linfocitarie è stata effettuata utilizzando il Pan T Cell Isolation Kit II di Miltenyi Biotec. Questa specifica popolazione viene utilizzata per valutare l'espressione genica di VLA4.

Tale metodica prevede la marcatura del campione con un cocktail di anticorpi biotinilati (anti-CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56, -CD123 e -Glicoforina A) diretti verso differenti popolazioni cellulari (linfociti B, linfociti NK, cellule dendritiche, monociti, granulociti, eritrociti) esclusa quella dei linfociti T. Dopo un'incubazione di 10 minuti a 4-8°C, al campione viene aggiunto l'anticorpo secondario che, in questo caso, è l'anti-biotina a cui è legata una microbiglia. La mix viene incubata per 15 minuti a 4-8° C. Successivamente si procede con la separazione magnetica, in cui il campione marcato viene fatto passare attraverso una colonna al cui interno sono presenti delle microbiglie di metallo (la colonna è fissata ad un magnete). La forza magnetica tratterrà le cellule legate alle biglie mentre le cellule non marcate, quindi la popolazione di linfociti T, sarà eluita dalla colonna. Questo tipo di separazione viene definita untouched e permette di ottenere una popolazione cellulare priva di qualsiasi anticorpo legato. In questo modo le cellule possono essere utilizzate per altre metodiche senza che ci sia la possibilità di interferenza delle microbiglie.

2.6 Estrazione RNA totale

L'estrazione dell'RNA dalla popolazione di linfociti T è stata effettuata utilizzando il kit GeneJET RNA Purification Kit (Fermentas). Tale procedura di estrazione prevede che le cellule siano lisate e omogeneizzate in un buffer di lisi, contenente DTT 2 mM (ditiotreitolo) e guanidina tiocianato, un sale caotropico in grado di denaturare le RNasi endogene, proteggendo così l'RNA dalla degradazione. Il lisato viene quindi mixato con etanolo al 96% e caricato all'interno di una colonnina di purificazione. L'agente caotropico e l'etanolo favoriscono l'adesione dell'RNA estratto alla membrana di silice, mentre il lisato viene eluito dalla colonna. Successivamente le impurità vengono rimosse dalla colonnina attraverso dei lavaggi con soluzioni tamponate. Infine l'RNA viene eluito dalla colonnina mediante l'aggiunta di H₂O nucleasi free.

La valutazione della concentrazione di RNA estratto è stata eseguita con uno spettrofotometro (Eppendorf) ad una assorbanza pari a 260 nm (A₂₆₀).

2.7 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione è stata effettuata su 1µg di RNA di ciascun campione. In ogni tubo di reazione sono stati aggiunti i seguenti reagenti alle quantità riportate:

Reagenti	Quantità
Oligo T	1 µl
dNTP(10mM)	1 µl
Templato RNA	1 µg
H ₂ O RNase free	Fino a 10 µl

I campioni vengono quindi incubati per 5 min a 65°C e sono riposti successivamente in ghiaccio.

Si prepara poi una mix di reazione contenente :

Reagenti	Volume (per 1 reazione)
5X PrimerScript Buffer	4 µl
RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5 µl
Prime Script RTase (200U/µl)	1 µl
H ₂ O RNase free	Fino a 10 µl

Sono stati aggiunti 10 µl di mix a ciascun RNA templato, quindi i campioni sono stati incubati a 42°C per 60 min, successivamente a 65°C per 5 min e poi 4°C per 10 min e infine inattivata scaldando a 95°C per 5 min. I campioni vengono poi conservati a -20°C fino allo step successivo.

2.8 Real Time PCR

La quantificazione dell'espressione genica per VLA-4 nei pazienti e nei controlli, è stata effettuata attraverso la "Real Time PCR". Questa tecnica consiste in una reazione di PCR in cui, ad ogni amplificazione, viene introdotta all'interno della doppia elica di DNA una molecola di SYBR Green (agente fluorescente utilizzato nel nostro esperimento). Il SYBR Green è un agente intercalante e si lega preferenzialmente a DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$ ed emette luce verde $\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$. La valutazione dell'espressione di VLA-4 nei diversi campioni avviene confrontando i dati di fluorescenza ottenuti per il gene d'interesse nello stesso paziente ma sottoposto a trattamenti farmacologici differenti e ad

intervalli di tempo diversi, normalizzando i dati rispetto ad un gene house-keeping di riferimento: Act β (Actina β).

I primers utilizzati per l'amplificazione di VLA-4 sono oligonucleotidi di 24 bp costituiti dalle seguenti sequenze nucleotidiche:

VLA-4 Fw	ACTTCTGACGTGATTACAGGAAGC
VLA-4 Rv	TCTTTGCTGATTACAGGTTTCTG

Ogni reazione di PCR è stata eseguita in triplo, miscelando in un tubo da PCR i seguenti componenti:

Reagenti	Singola reazione
RT ² SYBR Green qPCR Master Mix	12.5 μ l
RT ² First-Strand cDNA (templato)	1.0 μ l
gene-specific 10 μ M PCR primer pair stock	1,0 μ l Fw 1,0 μ l Rv
H ₂ O	9.5 μ l
volume finale	25.5 μ l

I tubi sono stati quindi posti nel termociclatore e il programma è stato avviato con la seguente impostazione:

Cicli	Durata	Temperatura
1	10 minuti	95°C
	15 secondi	95°C
40	30-40 secondi	55°C
	30 secondi	72°C

2.9 Analisi citofluorimetriche

I campioni di linfociti dei soggetti di controllo e di tutti i pazienti descritti in tabella 2 sono stati analizzati tramite analisi citofluorimetrica. All'interno di una popolazione di 10000 cellule (comprendenti linfociti T, linfociti B, granulociti, eosinofili, basofili e neutrofili) sono state selezionate le cellule esprimenti il recettore CD3, ossia i linfociti T. Tra questi sono stati ulteriormente discriminati i linfociti T CD4+ e i linfociti T CD8+; ciò ci ha permesso di ottenere i valori percentuali (sulla popolazione di CD3+) delle due sottopopolazioni in ciascun soggetto e di calcolare il rapporto CD4+/CD8+. Inoltre dalla popolazione CD3+ sono stati selezionate le cellule esprimenti la subunità α del fattore di adesione linfocitario VLA-4, ossia CD49d, sulla popolazione totale di CD3+ e nelle due sottopopolazioni di CD4+ e CD8+.

Un ulteriore parametro analizzato è stato l'intensità di fluorescenza media (MFI) di CD49d nei due tipi di popolazione (CD4+/CD8+). L'intensità di fluorescenza media fornisce una valutazione di quanto un determinato antigene è espresso in una popolazione cellulare. Nel nostro caso analizzando il valore MFI di CD49d è possibile determinare se a livello di membrana, in ogni singola cellula, il recettore è più o meno rappresentato in

una condizione rispetto ad un'altra o nella popolazione dei CD4⁺ rispetto ai CD8⁺.

3 RISULTATI

3.1 Controlli

3.1.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4⁺ e CD8⁺

Nei controlli, in generale, la percentuale di linfociti T CD4⁺ e linfociti T CD8⁺, nella popolazione CD3, si mantiene costante tra soggetti ad eccezione dei soggetti C2, C13 dei quali si discuterà in seguito. Generalmente, i linfociti CD4⁺ sono maggiormente rappresentati rispetto ai CD8⁺, con un valore medio di rapporto pari a 1,65 (dalla media sono stati esclusi i soggetti C2, C13 e C15) [Tab.2].

controllo	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio
C1	1,10
C2*	10,13
C3	1,28
C4	2,68
C5	1,37
C6	0,88
C10	1,87
C11	1,73
C12	2,58
C13**	4,23
C14	0,86
C15***	2,71
C16****	2,18

Tabella 2 – Valori del rapporto CD4⁺/CD8⁺ nei controlli. *, **, ***, ****vedi capitolo 8.1.4

3.1.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Nei controlli troviamo che il recettore VLA4 è libero ed espresso in modo costitutivo. La media della percentuale di CD4⁺CD49d⁺ è di 4.79 mentre

quella di CD8+CD49d+ è di 7.86 sul totale delle cellule CD3+ [Tab.3]. Quindi le cellule CD8+ possiedono, generalmente, più recettore espresso sulla superficie rispetto alle cellule CD4+.

controllo	%CD4+CD49d+	%CD8+CD49d+
C1	5	7,3
C2*	25,9	4,3
C3	9,4	12
C4	9,1	7,6
C5	4,6	8,1
C6	2,4	13,5
C10	2,3	5,9
C11	2,8	7,2
C12	3,9	2,2
C13**	3,2	0,8
C14	3,6	6,9
C15***	9,3	6,4
C16****	5,6	2,6

Figura 3- Valori percentuali delle popolazioni di linfociti CD4+ e CD8+ nei soggetti di controllo valutati tramite analisi citofluorimetrica. ., **, ***, ****vedi capitolo 8.1.4*

3.1.3 Determinazione della fluorescenza media

Nei controlli analizzati è stato osservato un profilo di esposizione del recettore nelle diverse popolazioni linfocitarie analizzate, ossia i CD8⁺ e CD4⁺, quasi uguale. Infatti la media delle MFI dei CD4+CD49d+ è di 601 mentre la media di MFI delle cellule CD8+CD49d+ è di 692 [Tab. 4].

controllo	MFI CD8+CD49d+	MFI CD4+CD49d+
C1	727	787
C2*	703	754
C3	726	856
C4	675	875
C5	628	684
C6	477	548
C10	473	736
C11	527	511
C12	538	544
C13**	451	582
C14	635	689
C15***	495	705
C16****	692	845

Tabella4 – Valori di fluorescenza media nei controlli. *, **, ***, ****vedi capitolo8.1.4

3.1.4 Casi particolari nei controlli

Durante la ricerca sono stati analizzati diversi controlli con storie cliniche diverse e con trattamenti farmacologici pregressi o attuali che potrebbero aver alterato alcuni dati.

In particolare:

*C2: soggetto trapiantato da 21 anni sottoposto a trattamento farmacologico continuativo comprendente cortisone 4mg, ciclosporina 175 mg, cell cept 750mg (immuno depressivi) e Tranex 500mg (coagulante). La sua condizione comporta un'alterazione nel numero di CD4+ e CD8+ con una maggior numero di cellule della prima sottofamiglia e nella percentuale di cellule positive per CD49d. Ma il mix di farmaci non compromette il numero di recettori mediamente presentati da ciascuna cellula CD4+ e CD8+.

****C13:** soggetto sottoposto ad asportazione della tiroide a causa di un carcinoma. Familiarità con ipertiroidismo e patologie tiroidee autoimmuni. Trattato quotidianamente con Eutirox 100 e 125 mg. Questo soggetto presenta un disequilibrio delle popolazioni CD4+ e CD8+ con un numero maggiore delle cellule della prima famiglia. Le cellule CD8+ presentano poco recettore rispetto agli altri controlli mentre si ha una percentuale praticamente uguale per CD4+. Il mix di farmaci non compromettono il MFI delle due sottofamiglie di linfociti T

*****C15:** soggetto celiaco con figlio affetto da SM (paziente 3). Sottoposto più di venti anni fa ad asportazione della tiroide a causa di ipertiroidismo (non è possibile sapere se di origine autoimmune ma sicuramente familiare). Attualmente in trattamento quotidiano con Eutirox 100 mg e dieta priva di glutine. Si osserva un disequilibrio delle due subfamiglie di linfociti T analizzati e percentuale maggiore di cellule presentanti il recettore. Nessuna differenza nell'espressione fenotipica del recettore VLA4.

******C16:** soggetto con una leggera anemia falciforme. Non familiarità per patologie autoimmuni e non sottoposto a trattamenti farmacologici continuativi e/o quotidiani. Maggior numero di recettori presentati dalle cellule CD8+ in correlazione con dato MFI.

3.2 Pazienti

3.2.1 Paziente 1

Al paziente 1 sono stati effettuati quattro prelievi: il primo (T0) alla diagnosi della patologia e prima di qualsiasi trattamento farmacologico; il secondo (6m) dopo 6 mesi dall'inizio della terapia con natalizumab e i successivi a 10 mesi (10m) e 18 mesi (18m) di trattamento con l'anticorpo monoclonale. Il paziente 1 è una donna sarda nata nel 1981. Arrivata al Centro Sclerosi Multipla già in avanzato stato di disabilità (EDSS 4,5), è stata sottoposta direttamente a terapia con natalizumab come da prassi AIFA. Il prelievo a 10 mesi ha evidenziato una desaturazione del recettore VLA4 e, il mese successivo, la paziente ha affrontato una ricaduta con somministrazione di cortisone.

3.2.1.1 *Determinazione della percentuale di linfociti CD4⁺ e CD8⁺*

I dati ottenuti con analisi citofluorimetrica indicano come la terapia con natalizumab non modifichi il rapporto tra CD4⁺ e CD8⁺. Questa paziente mostra una disregolazione nella formula linfocitaria, infatti presenta in percentuale un numero molto maggiore di CD4⁺ rispetto alla popolazione

CD8⁺, con una media di rapporto pari a 4 [Grafico 1].

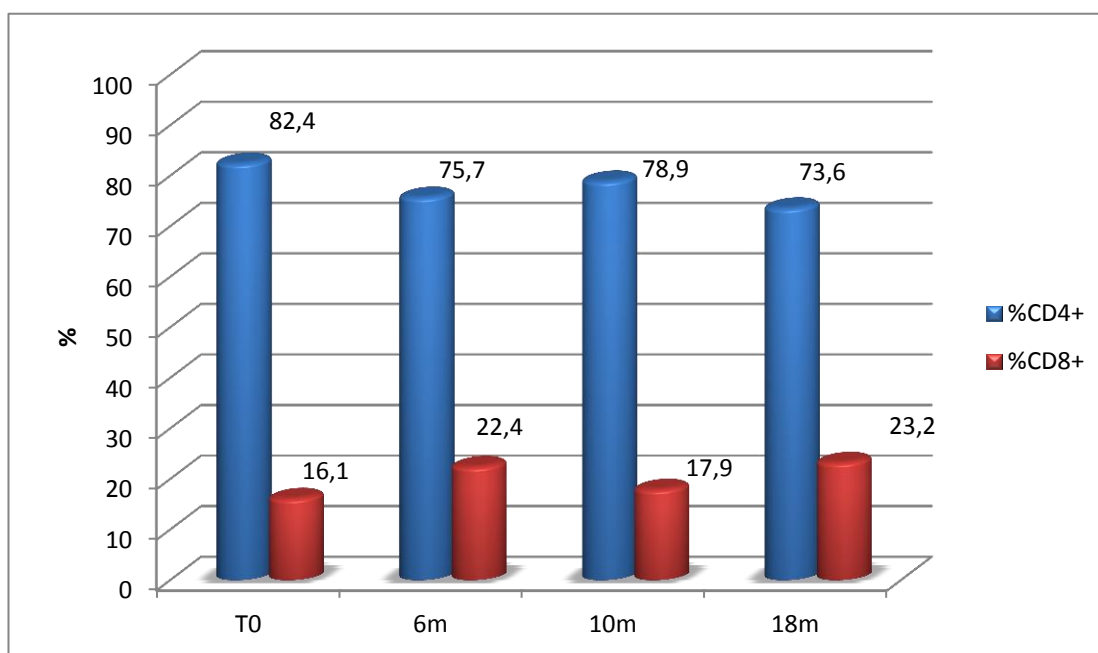


Grafico 1 – percentuale delle popolazione CD4+ e CD8+ in P1

3.2.1.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Allo stato iniziale (T0), la paziente mostra una percentuale di cellule presentanti il recettore inversa rispetto ai controlli. Infatti nei soggetti sani è la popolazione CD8⁺ ha presentare maggiormente il recettore VLA4, mentre, in questa paziente, le cellule maggiormente positive sono quelle CD4⁺ [Grafico 2]. Al momento non è possibile dare una spiegazione per questa espressione fenotipica, ma la stessa situazione si riscontra anche durante la terapia con natalizumab. Come prevedibile, il farmaco va a mascherare il recettore e quindi, con indagine citofluorimetrica, le cellule risultano saturate. Ciò è indicato dalla diminuzione di recettore individuato dall'anticorpo anti-VLA4. I dati riferiti al prelievo dopo 10 mesi (10m) mostrano una desaturazione del recettore VLA4 soprattutto sulla superficie dei linfociti CD4⁺. Un mese dopo questo prelievo, la paziente ha avuto una

ricaduta trattata con farmaci steroidei. Dopo 18 mesi di trattamento con natalizumab (18m) le cellule CD4+ positive anche per il recettore VLA4 calano drasticamente mentre le cellule CD8 positive rimangono sostanzialmente invariate durante tutta la terapia con il farmaco.

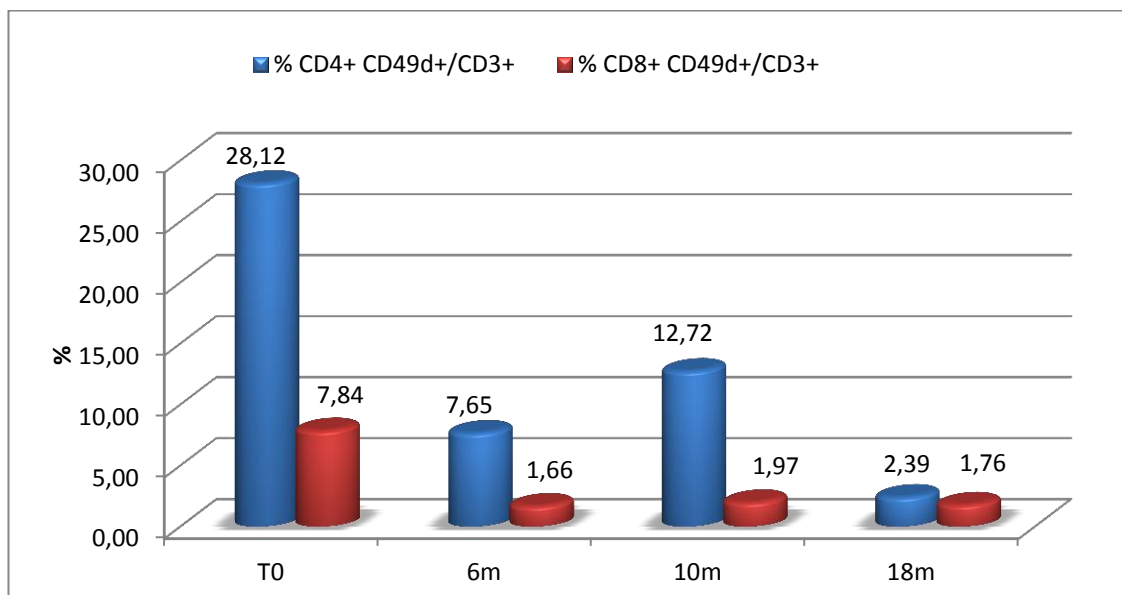


Grafico 2 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P1

3.2.1.3 Determinazione della fluorescenza media

La fluorescenza media indica la quantità di recettore espresso mediamente dalle cellule analizzate con il citofluorimetro. Come è possibile vedere dal grafico, al tempo T0 la quantità media di recettore espresso fenotipicamente dalle cellule CD4+ e CD8+ è molto simile. Questo rapporto rimane costante anche dopo 10 mesi di terapia con natalizumab ma diminuisce nel valore assoluto. Questo indica che le cellule presentanti i recettori non solo sono in percentuale un numero minore, ma che queste stesse cellule presentano anche meno recettore rispetto al T0. Dopo 18 mesi di terapia si ha un cambiamento nella situazione, infatti anche se le cellule positive per VLA4

diminuiscono enormemente, quelle stesse cellule presentano un maggior numero di recettore e l'equilibrio tra CD4+CD49d+ e CD8+CD49d+ che era rimasto pressoché identico durante i primi 10 mesi di trattamento con Tysabri, ora mostra un numero di recettore maggiore sulla superficie dei CD8+ [Grafico 3].

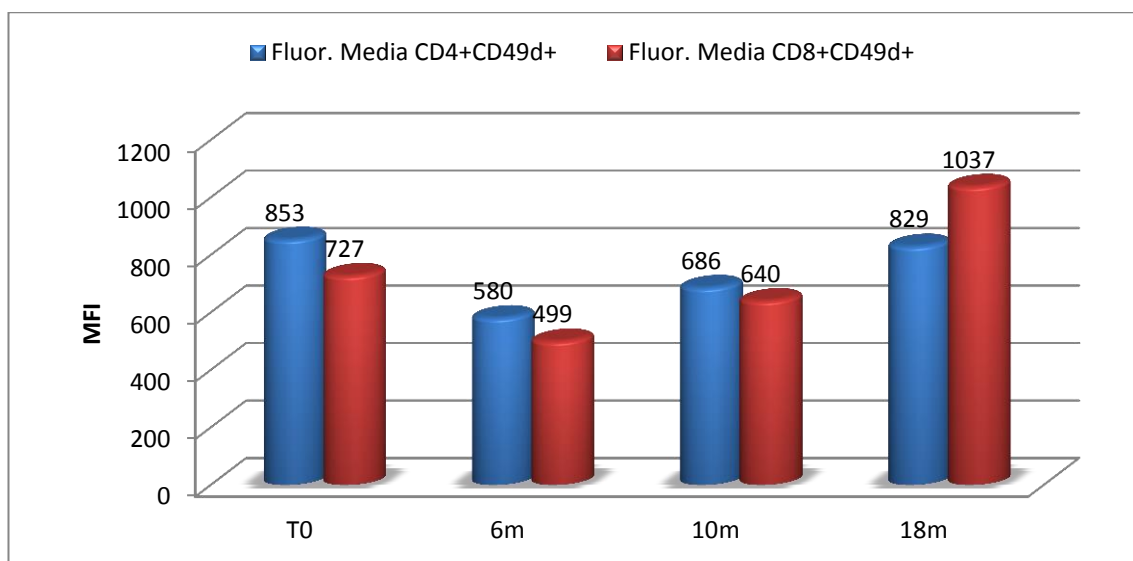


Grafico 3 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P1

3.2.1.4 Espressione genica di CD49d

Mentre l'analisi citofluorimetrica ha fornito informazioni importanti sull'espressione fenotipica del recettore VLA4 sulle due principali sottopopolazioni di linfociti T, l'analisi dell'espressione genica del gene VLA4 è stata condotta analizzando la produzione del corrispettivo mRNA mediante Real Time PCR. Come è possibile osservare nel grafico... considerato come livello "base" di trascrizione nella paziente i valori al tempo T0, nei primi 10 mesi di terapia con natalizumab l'espressione genica rimane costante e di poco superiore ai livelli prima del trattamento, mentre dopo 18 mesi si ha un aumento di più di tre volte. Questo rispecchia

il dato ottenuto con il citifluorimetro che indica una maggior numero in totale di recettori VLA4 espressi sulla superficie dei linfociti CD4+ e CD8+ [Grafico 4].

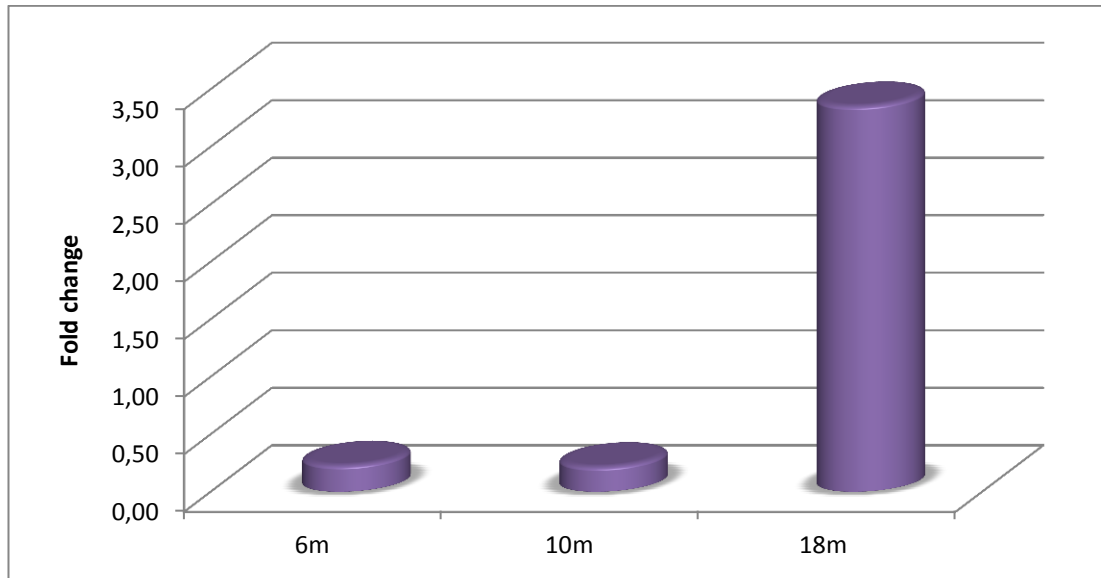


Grafico 4 – espressione genica di CD49d in P1 (fold change= 1 riferito al prelievo T0)

3.2.2 Paziente 2

Al paziente 2 sono stati effettuati sette prelievi: il primo (T0) dopo un anno di trattamento con IFN β , l'approccio farmacologico non ha portato i risultati desiderati non controllando l'avanzata della disabilità che era valutata nella scala EDSS pari a 4,5. Successivamente la paziente è stata seguita durante la pausa terapeutica obbligatoria con due prelievi, T1 e T2. Sono stati effettuati anche quattro prelievi durante la terapia con natalizumab rispettivamente dopo 1, 6, 16, 17 mesi (1m, 6m, 16m, 17m). Il paziente 2 è una donna sarda nata nel 1991. Arrivata al Centro Sclerosi Multipla nel 2011 e sottoposta a trattamento con IFN β , dopo un anno senza risultati apprezzabili e con un aumento delle lesioni a carico del cervello, viene sottoposta a trattamento con Tysabri.

3.2.2.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

Nel paziente 2 come nel paziente 1 è possibile notare come esista una disregolazione della percentuale delle due maggiori sottopopolazioni di linfociti T. Questa relazione rimane invariata nel tempo anche dopo diverse terapie farmacologiche [Grafico 5].

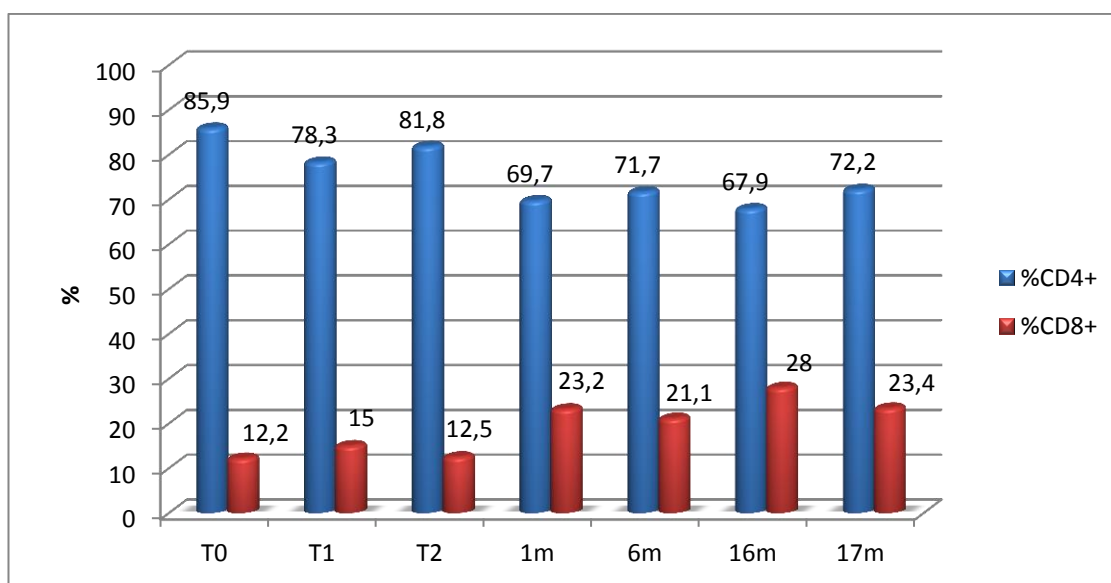


Grafico 5 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P2

3.2.2.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Nella paziente 2, durante la pausa terapeutica che corrisponde ai tempi T0, T1 e T2, si ha un aumento delle cellule presentanti il recettore VLA4 proporzionalmente al tempo di sospensione della terapia con IFN α . Già dopo il primo mese di trattamento con Tysabri, il numero delle cellule che presentano il recettore libero sono diminuite in modo notevole. Ciò indica come natalizumab si sia legato in modo efficiente ai recettori delle cellule sia CD4+ che CD8+ [Grafico 6].

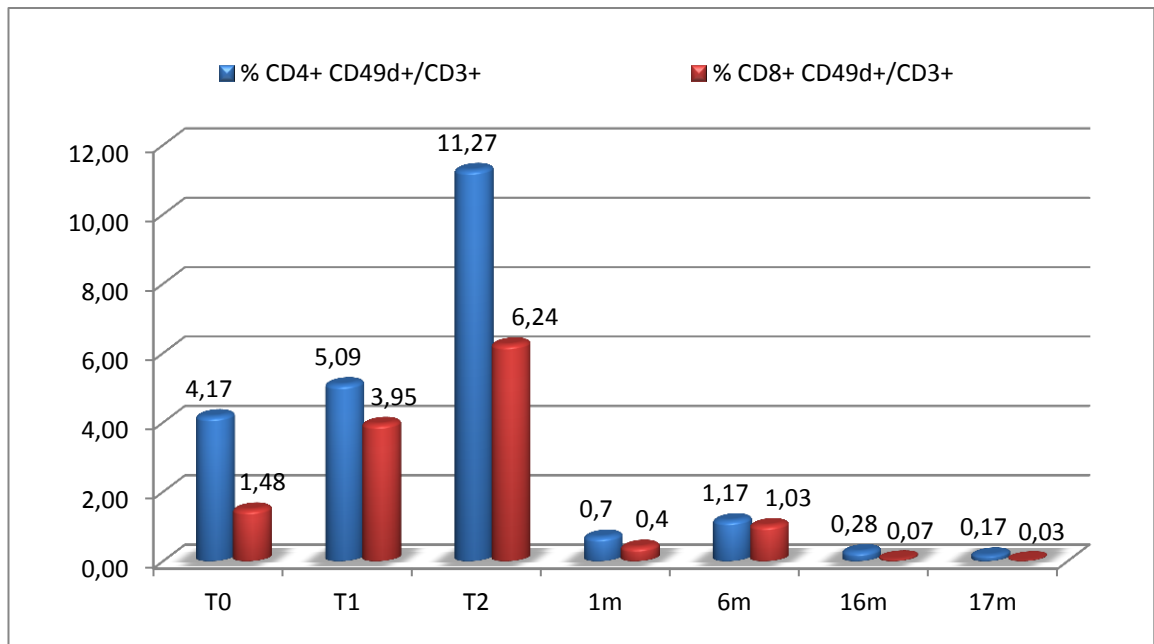


Grafico 6 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P2

3.2.2.3 Determinazione della fluorescenza media

Durante la sospensione della terapia con IFN α il numero di recettori sulle due subpopolazioni di linfociti T rimane uguale, ma durante la terapia con natalizumab si possono notare delle evidenti modifiche. Il primo mese di terapia con Tysabri sembra non comportare differenze significative sul numero di recettori ma, già dopo sei mesi l'espressione superficiale aumenta quasi del doppio. Successivamente, dopo 16 mesi, si ha una differenza di espressione superficiale: sulle cellule CD4+ si torna ad una situazione iniziale mentre i CD8+ mantengono livelli elevati di espressione. Dopo solo un mese da questo prelievo la condizione superficiale cambia radicalmente e le cellule CD4+ iniziano ad esprimere enormi quantitativi di recettore anche se le cellule che presentano questi molteplici recettori sono solo 0,17% di tutta la popolazione CD4+ sui CD3+. Stesso discorso vale per il numero di recettori presentati dalle cellule CD8+ che aumentano significativamente a

fronte di una percentuale di cellule positive di 0,03 sul totale delle cellule CD8+ sulle CD3+ [Grafico 7].

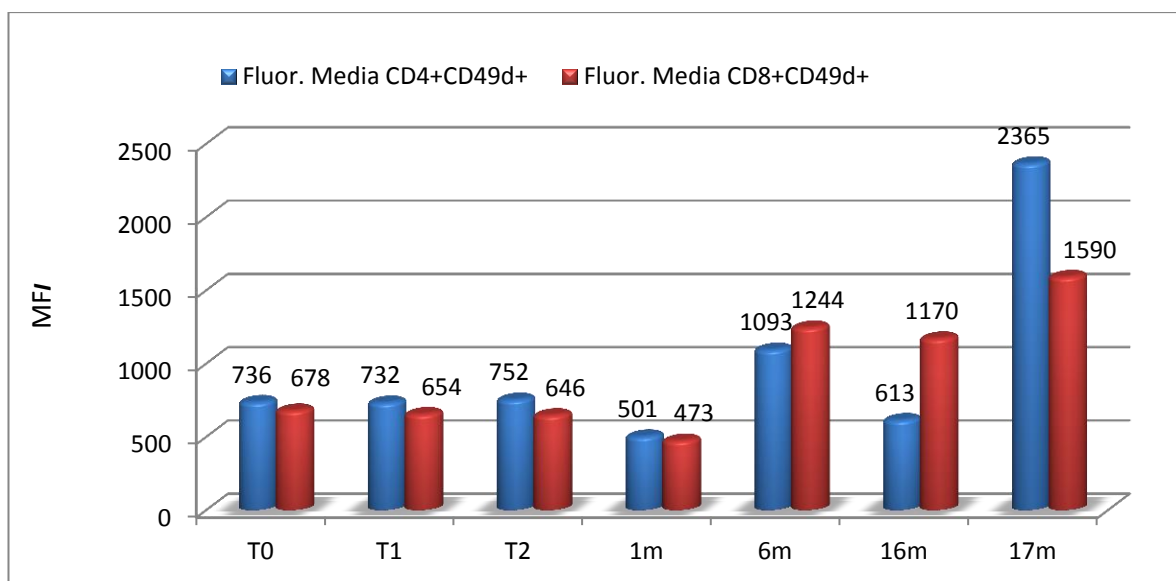


Grafico 7 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P2

3.2.2.4 Espressione genica di CD49d

L'espressione genica riscontrata in questa paziente rispecchia ciò che è stato rilevato attraverso l'analisi citofluorimetrica. Nei prelievi ai tempi T1 e T2 si evidenzia come l'espressione aumenti già dopo due settimane dalla sospensione della terapia interferonica (T1) e continui ad aumentare dopo quattro settimane (T2). Questo è prevedibile perché l'interferone va ad agire anche a livello trascrizionale inibendo la produzione di VLA4. Durante la terapia con natalizumab questa espressione si abbassa enormemente anche se le poche cellule positive per CD49d+ presentano moltissimi recettori.

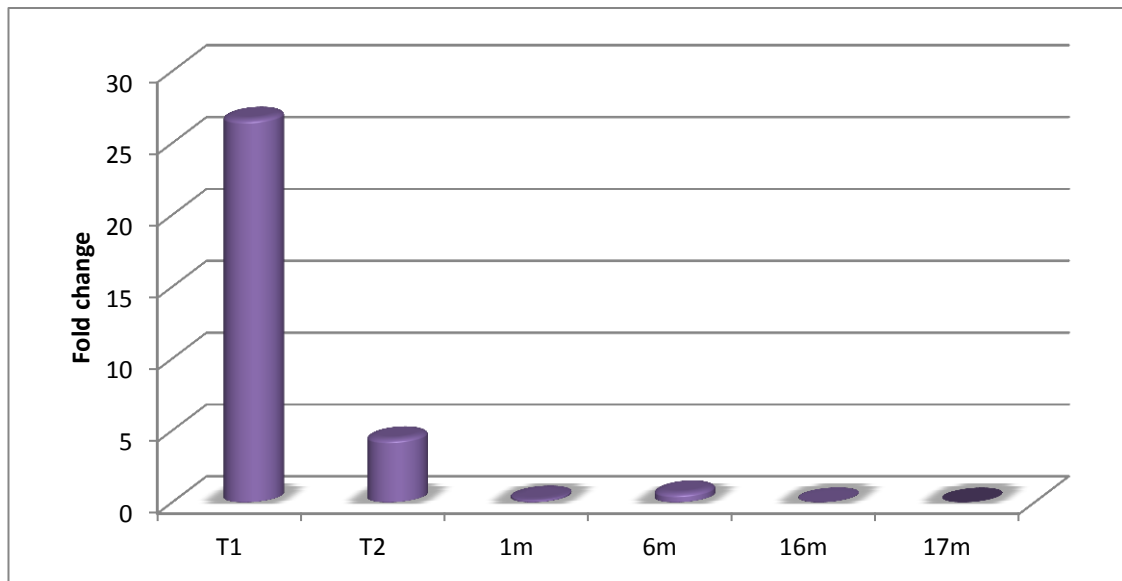


Grafico 8 – espressione genica di CD49d in P2 (fold change= 1 riferito al prelievo T0 per T1 e T2, fold change=1 riferito a T2 per 1-6-16-17 mesi)

3.2.3 Paziente 3

Per il paziente 3 sono stati effettuati due prelievi, durante il primo prelievo il paziente era in trattamento con interferone beta, il secondo prelievo invece è avvenuto dopo 12 mesi di sospensione della terapia con interferone. Il paziente 3 è un uomo di origine siciliana. Madre celiaca.

3.2.3.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4⁺ e CD8⁺

Dai dati ottenuti emerge che non vi è un evidente cambiamento nella distribuzione delle due popolazioni CD8⁺ e CD4⁺, dopo sospensione della terapia farmacologica. La differenza tra le due popolazioni è minima e si avvicina maggiormente a quella dei controlli come dimostrato dal rapporto CD4⁺/CD8⁺ che mostra un valore medio di 0,94 [Grafico 9].

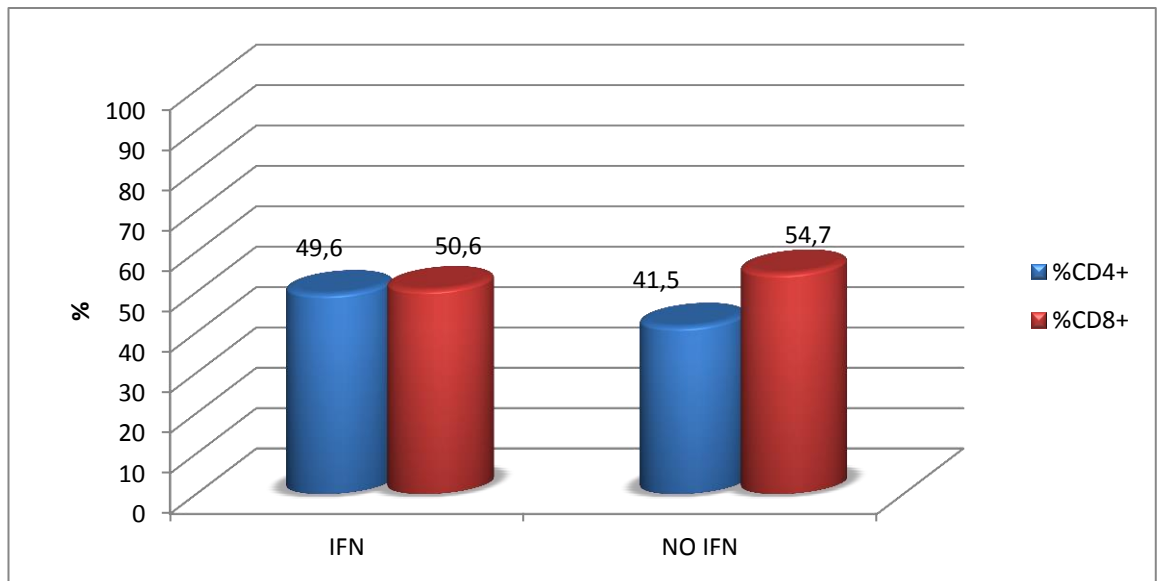


Grafico 9 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P2

3.2.3.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Nel paziente 3 si riscontra una variazione nella percentuale di cellule che esprimono il fattore VLA-4 dopo sospensione del trattamento con interferone. Il paziente in terapia con interferone mostra dei livelli molto bassi di linfociti CD49⁺, mentre dopo un anno di sospensione del trattamento si verifica un notevole aumento del numero di cellule che esprimono CD49d, in particolare l'incremento si verifica maggiormente nei linfociti CD8⁺ rispetto ai linfociti CD4⁺ [Grafico 10].

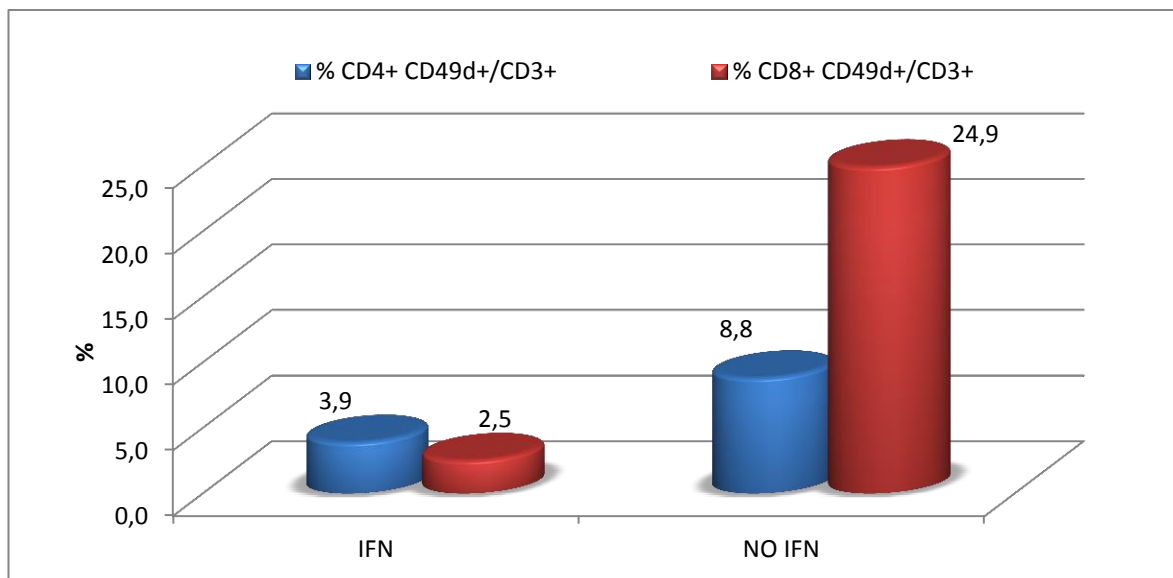


Grafico 10 – Percentuale di cellule CD4+/CD3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P2, durante terapia interferonica (IFN) e pausa terapeutica (NO IFN)

3.2.3.3 Determinazione della fluorescenza media

Nel paziente 3 si osserva un lieve aumento della fluorescenza media di CD49d a un anno di distanza dalla sospensione della terapia con interferone. I livelli di fluorescenza aumentano sia nella popolazione dei CD4⁺ CD49d⁺ che nei CD8⁺CD49d⁺, nei primi però si verifica un aumento più marcato. [Grafico 11]

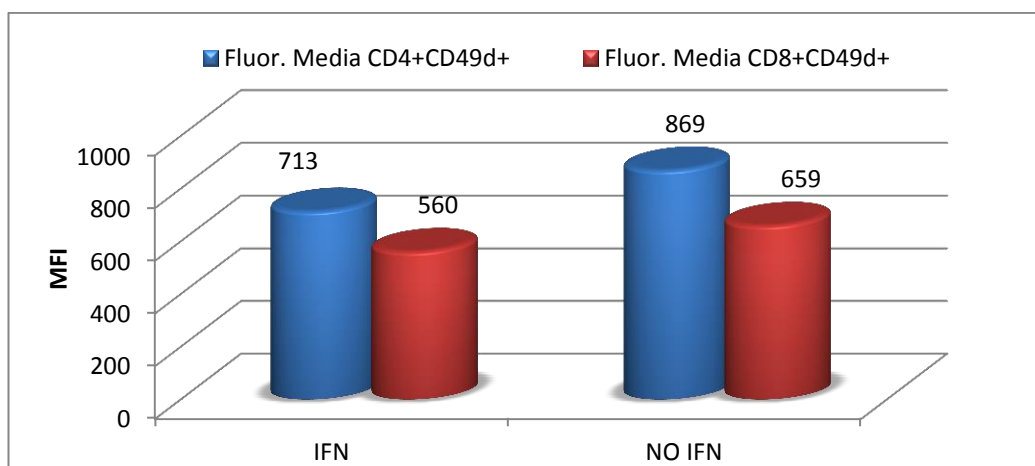


Grafico 11 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P3

3.2.3.4 Espressione genica di CD49d

Come era prevedibile, l'analisi dell'espressione genica ha dimostrato che l'interferone agisce sul recettore VLA4 inibendo la sua trascrizione [Grafico 12].

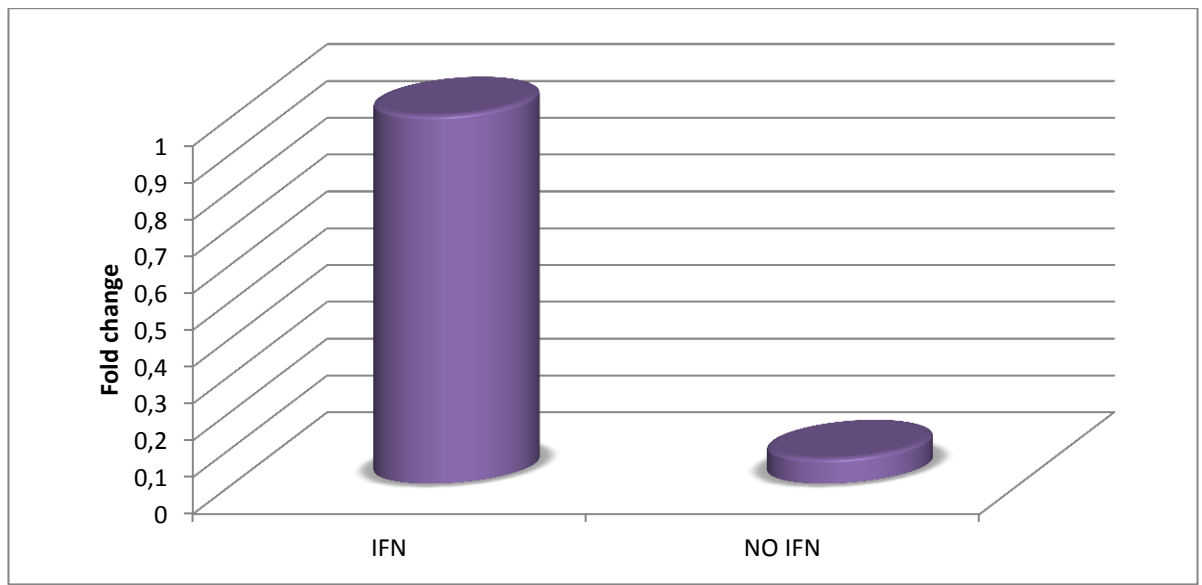


Grafico 12 – espressione genica di CD49d in P3 (fold change= 1 riferito al prelievo IFN)

3.2.4 Paziente 4

Per il paziente 4 è stato effettuato un singolo prelievo nel periodo in cui il paziente era in trattamento con interferone beta. Il paziente 4 è un uomo originario dell'Emilia Romagna. Attualmente è un paziente rispondente alla terapia interferonica

3.2.4.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4⁺ e CD8⁺

Le percentuali di CD4⁺ e CD8⁺ evidenziano una distribuzione disomogenea delle due popolazioni con una maggioranza di linfociti CD4⁺ rispetto ai

CD8⁺, così come riscontrato per il paziente 1 e 2. Il rapporto CD4⁺/CD8⁺ è difatti piuttosto elevato con un valore di 3,41 [Grafico 13].

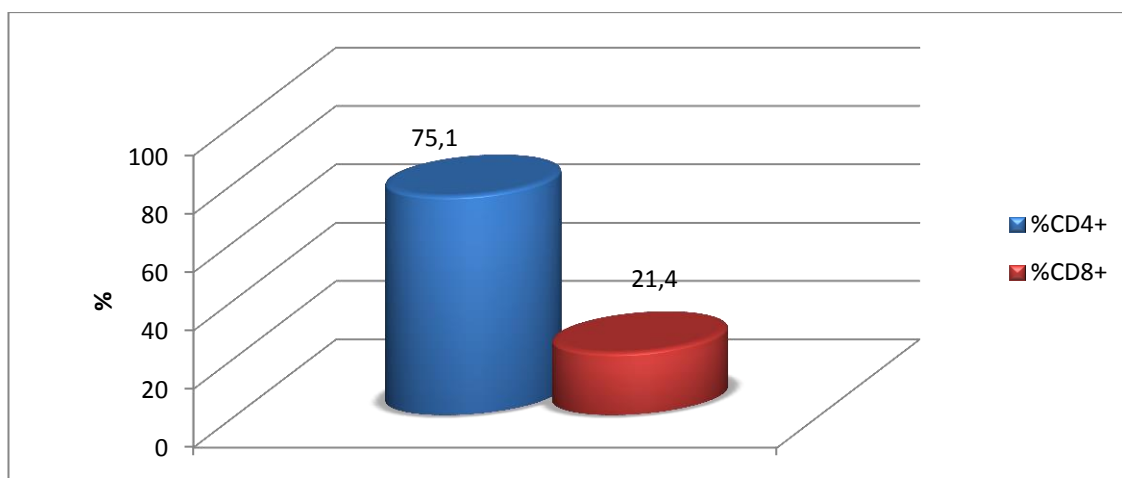


Grafico 13 – percentuale di popolazione CD4⁺ e CD8⁺ in P4

3.2.4.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

La percentuale di cellule che esprimono il recettore CD49d nel paziente in trattamento con IFN α è simile a quella dei controlli. Il recettore è presente principalmente sulla superficie dei CD4⁺ rispetto ai CD8⁺ [Grafico 14].

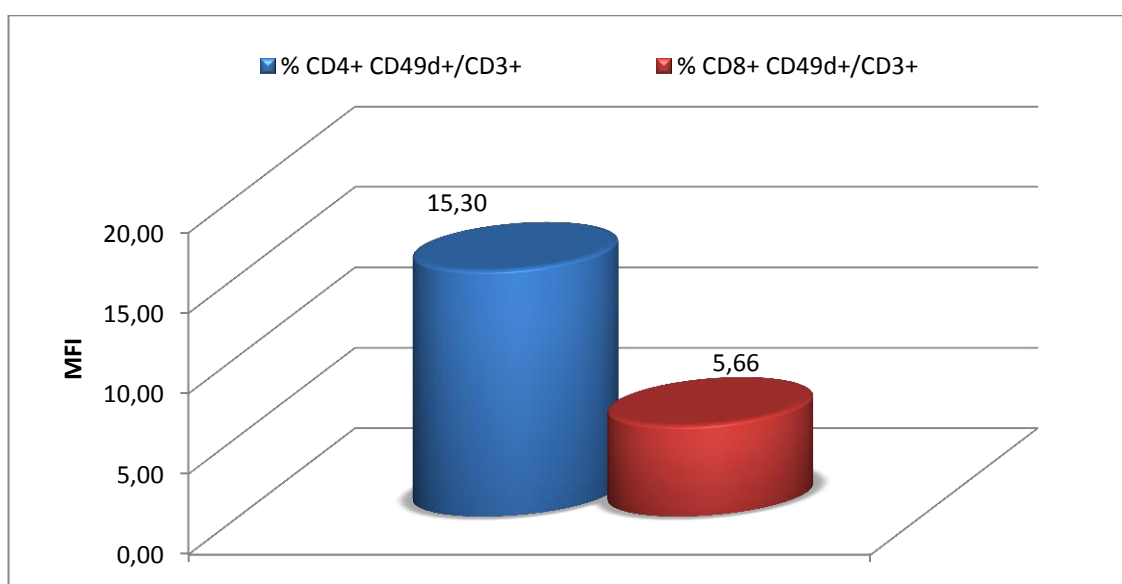


Grafico 14 – Percentuale di cellule CD4⁺/CD3⁺ e CD8⁺/CD3⁺ presentanti il recettore CD49d in P4

3.2.4.3 Determinazione della fluorescenza media

I dati di fluorescenza media su CD49d evidenziano una maggiore esposizione del recettore sui linfociti CD4⁺ rispetto ai CD8⁺, così come riscontrato per i soggetti di controllo e il paziente 2 e 3 in trattamento con interferone. [Grafico 15]

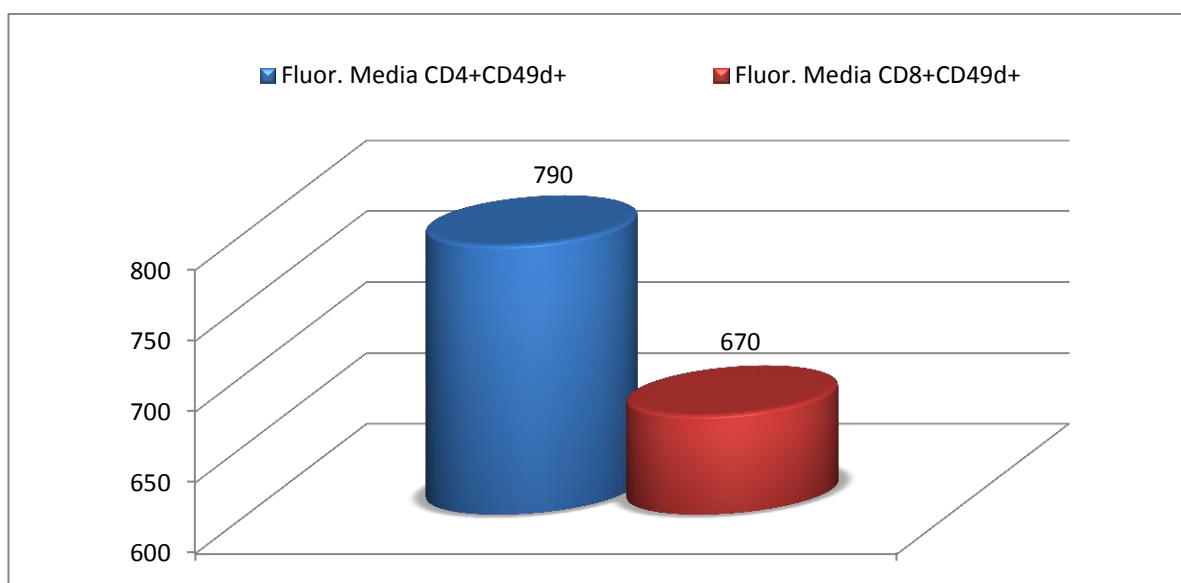


Grafico 15 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P4

3.2.5 Paziente 6

Per il paziente 6 è stato effettuato un singolo prelievo nel periodo in cui il paziente seguiva la terapia con Glatiramer acetato. Il paziente 6 è una donna originaria dell'Emilia Romagna nata nel 1977. La diagnosi è avvenuta nel 2002 ed è stato somministrato subito Glatiramer acetato come farmaco di prima linea. Nel 2013 la paziente viene considerata non rispondente alla terapia e quindi indirizzata alla terapia con natalizumab.

3.2.5.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4⁺ e CD8⁺

La percentuale di CD4⁺ e CD8⁺ nella popolazione di linfociti T evidenziano una distribuzione disomogenea delle due sottopopolazioni con una maggioranza di linfociti CD4⁺ rispetto ai CD8⁺, così come riscontrato per il paziente 1 e 2 e 4. Il rapporto CD4⁺/CD8⁺ è difatti abbastanza elevato con un valore di 2,92 [Grafico 16].

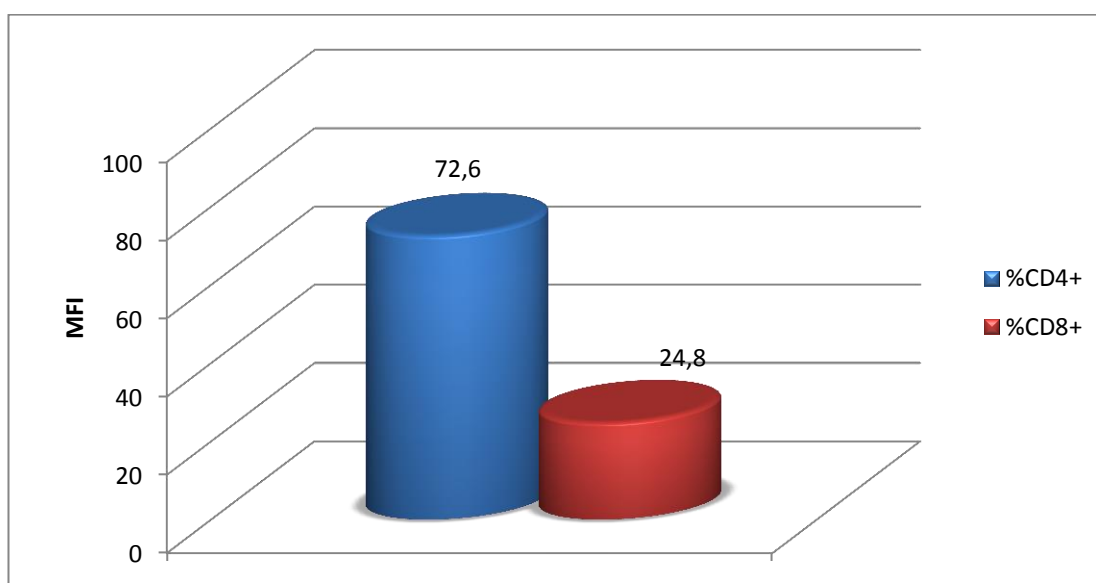


Grafico 13 – percentuale di popolazione CD4⁺ e CD8⁺ in P6

3.2.5.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Nella paziente 6 si evidenzia una bassa percentuale di linfociti che presentano CD49d in superficie. Sono un numero esiguo le cellule presentanti l'antigene, ma con una notevole maggioranza di cellule CD4⁺ del presentanti il recettore CD49d rispetto ai linfociti CD8⁺ [Grafico 17].

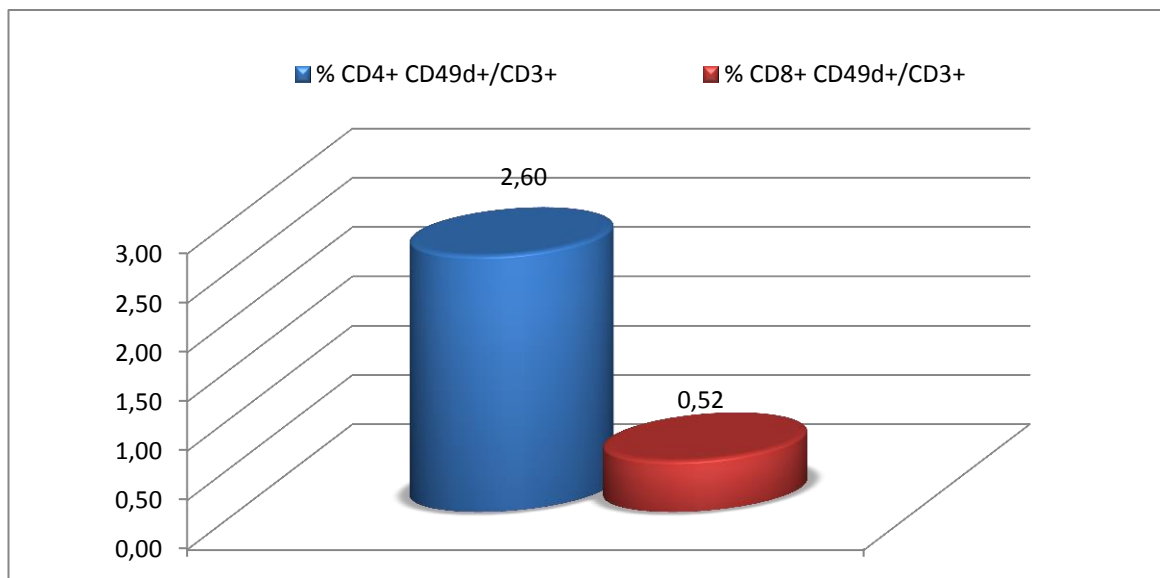


Grafico 17 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P6

3.2.5.3 Determinazione della fluorescenza media

I dati relativi alla fluorescenza media evidenziano un'espressione omogenea del recettore a livello superficiale nelle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ e CD8+[Grafico 18].

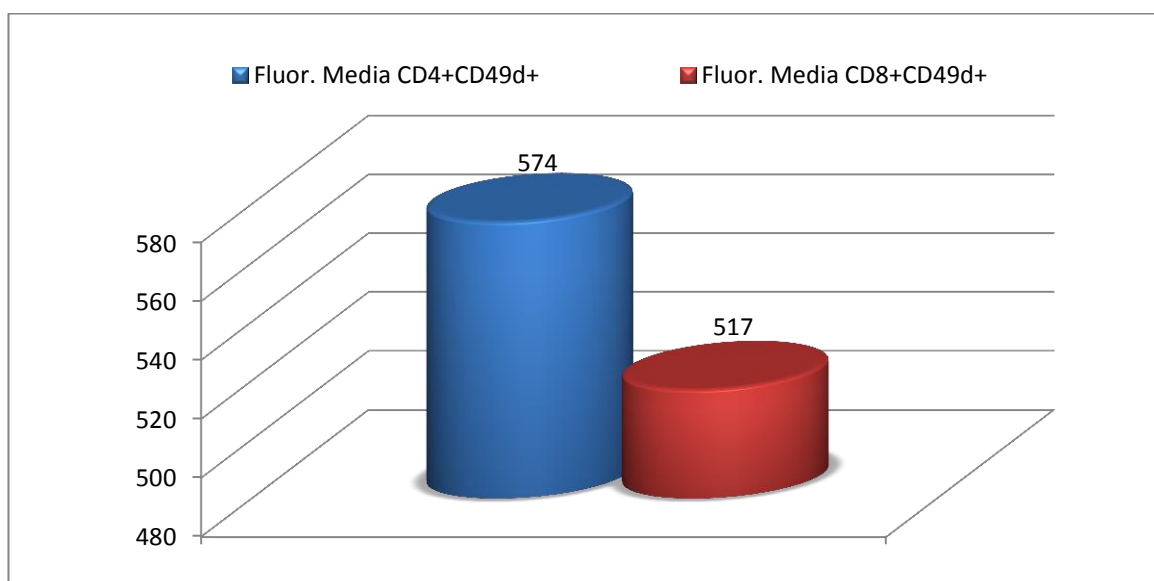


Grafico 18 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P6

3.2.6 Paziente 7

Al paziente 7 sono stati effettuati sei prelievi: il primo, indicato con la sigla T0, è stato effettuato prima della somministrazione di natalizumab e dopo 24h dall'infusione di 1g di steroidi. Gli altri prelievi sono stati effettuati durante la terapia con natalizumab, in particolare dopo un mese (1m), sei mesi (6m), 9 mesi (9m), 10 mesi (10m) e 11 mesi (11m). Il paziente 7 è una donna del 1990 dell'Emilia Romagna, la patologia fu diagnosticata quando la paziente aveva 12 anni (2002). Dopo essere stata sottoposta a tutte le tipologie di interferone e al glatiramer acetato, la paziente è stata considerata non rispondente alle terapie di prima linea. Dopo aggravamento è stata sottoposta a terapia con natalizumab

3.2.6.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

La paziente 7 aveva nel primo prelievo una condizione simile a quella dei controlli per quanto riguarda le percentuali di subpopolazioni CD8⁺ e CD4 di linfociti T, ma questa condizione è mutata durante la terapia con natalizumab.[Grafico 19]

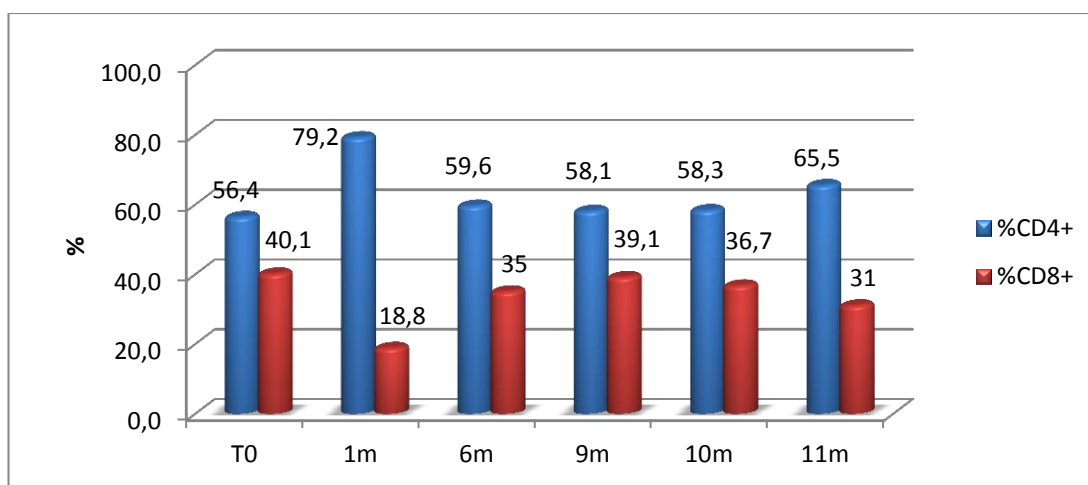


Grafico 19 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P7

3.2.6.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

I livelli di espressione superficiale sono costanti durante i prelievi avvenuti dopo sei mesi dal trattamento con natalizumab. Situazione differente, come si può notare, al prelievo T0 e dopo 1 mese da Tysabri. Infatti nel T0 si osservano pochi linfociti positivi alla presenza di CD49d, con molta probabilità a causa dell'effetto del cortisone somministrato 24h prima del prelievo. Nel caso del primo prelievo dopo un mese di terapia con natalizumab, si osserva sorprendentemente un aumento di cellule positive alla presenza di CD49d e quindi una non completa saturazione dei recettori pur in presenza di natalizumab [Grafico 20].

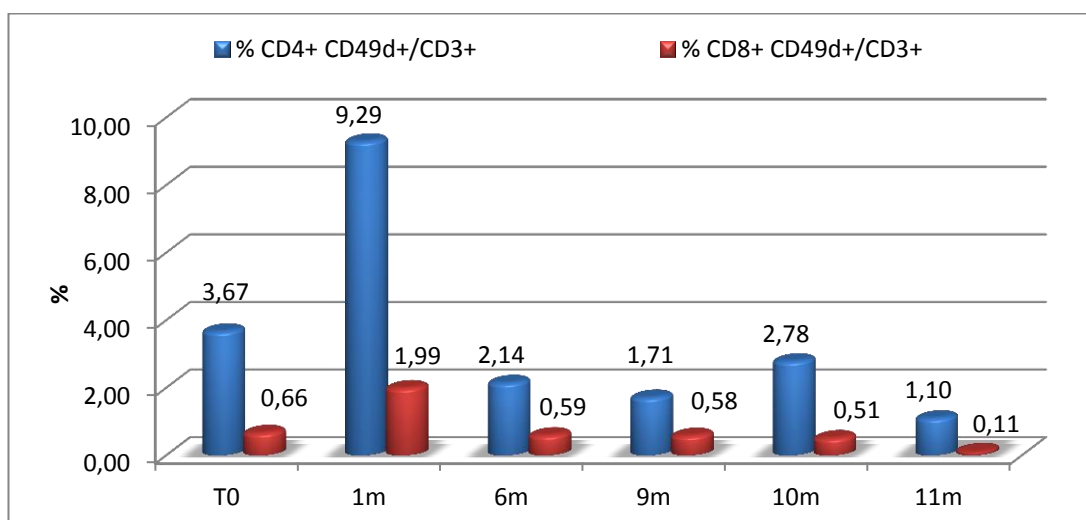


Grafico 20 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P7

3.2.6.3 Determinazione della fluorescenza media

La fluorescenza media e, quindi, la quantità di recettore presente mediamente sulla superficie di ogni cellula, rimane costante durante tutto il trattamento con natalizumab rispetto al primo prelievo tranne che dopo 6 mesi dal trattamento. Infatti si osserva un'impennata di concentrazione

sulla superficie cellulare del recettore, soprattutto sulle cellule CD4+ [Gafico 21].

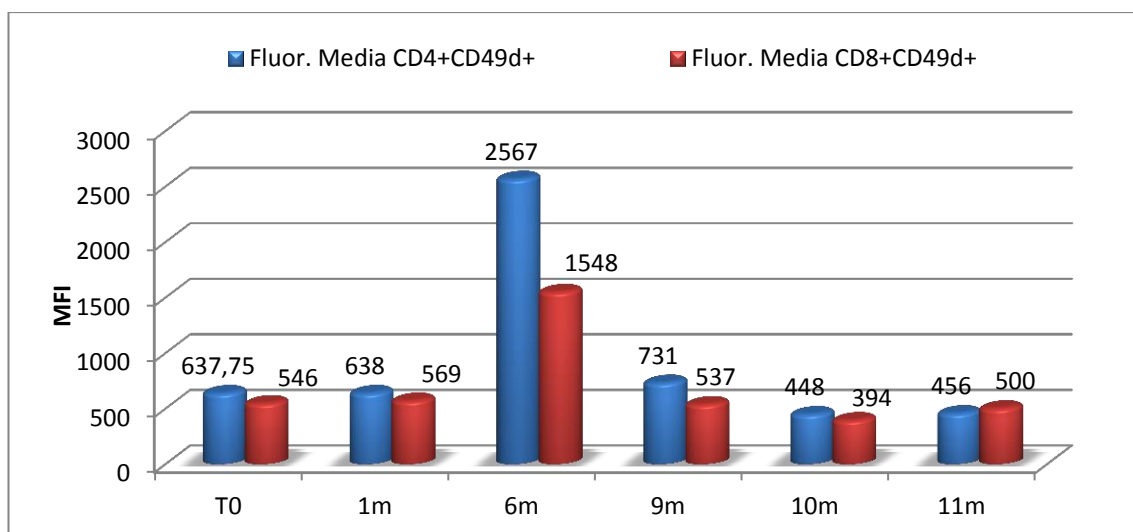


Grafico 21 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P7

3.2.6.4 Espressione genica di CD49d

L'espressione genica nella paziente 7 è preponderante nel sesto e nono mese di terapia con natalizumab. Ciò potrebbe spiegare l'aumento dell'espressione superficiale verificatosi al sesto mese di terapia.

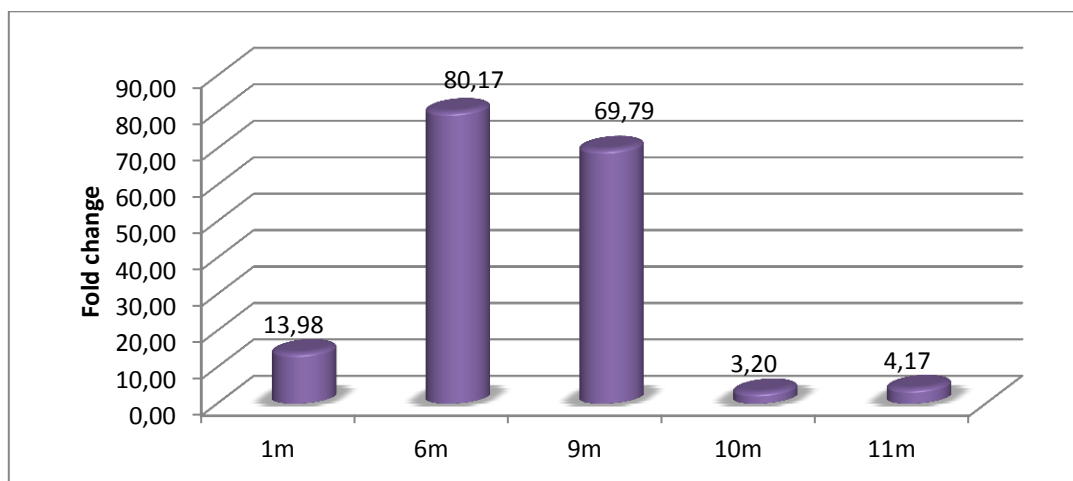


Grafico 22 – espressione genica di CD49d in P7 (fold change= 1 riferito al prelievo T0)

3.2.7 Paziente 8

Al paziente 8 è stato effettuato un solo prelievo durante la terapia con natalizumab (trattamento iniziato circa quattro anni prima). Il paziente 8 è una donna del 1994 dell'Emilia Romagna. Il padre soffre di sclerosi multipla. Prima di essere sottoposta a Tysabri è stata dichiarata non rispondente al Copaxone.

3.2.7.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

Anche nella paziente 8 si osserva la stessa situazione di disomogeneità della popolazione linfocitaria che troviamo anche in altri pazienti. [Grafico 23]

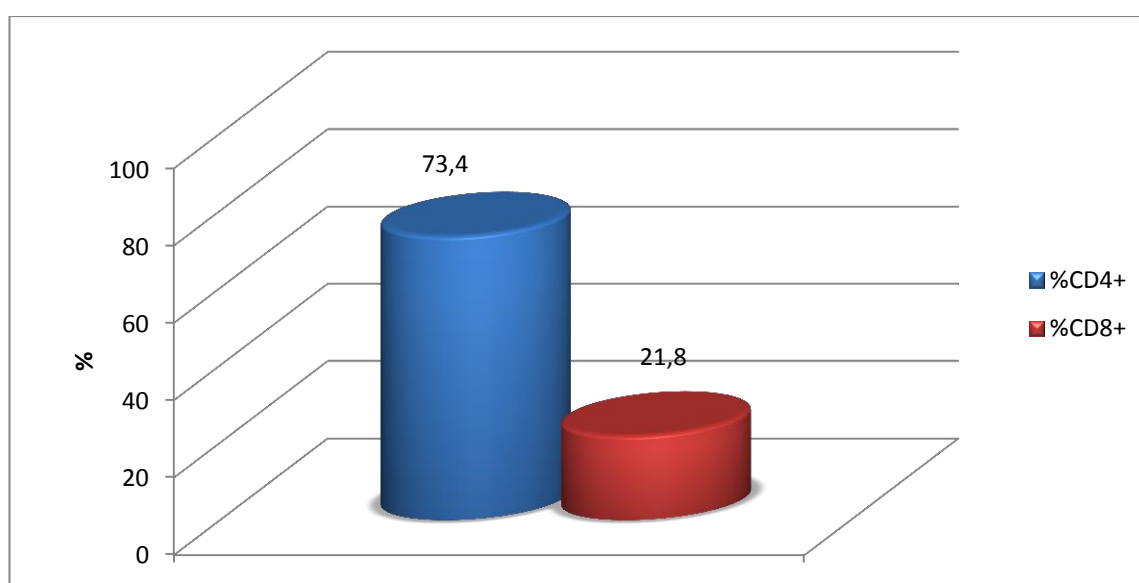


Grafico 23 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P8

3.2.7.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Nella paziente 8 si osserva una percentuale di cellule presentanti il recettore VLA4 molto più bassa rispetto a tutti i pazienti analizzati. Questo risultato rispecchia la totale saturazione del recettore, durante il trattamento con

natalizumab, in entrambe le sottofamiglie di linfociti T: CD4+ e CD8+ [Grafico 24].

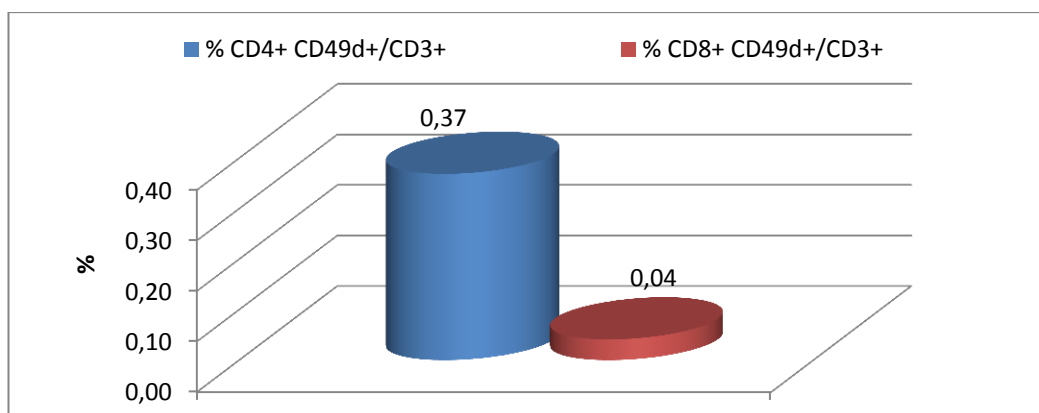


Grafico 24 – Percentuale di cellule CD4+/CD3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P8

3.2.7.3 Determinazione della fluorescenza media

Nella paziente 8 le cellule CD8+ presentano in media meno recettore VLA4 rispetto le cellule CD4+ [Grafico 25].

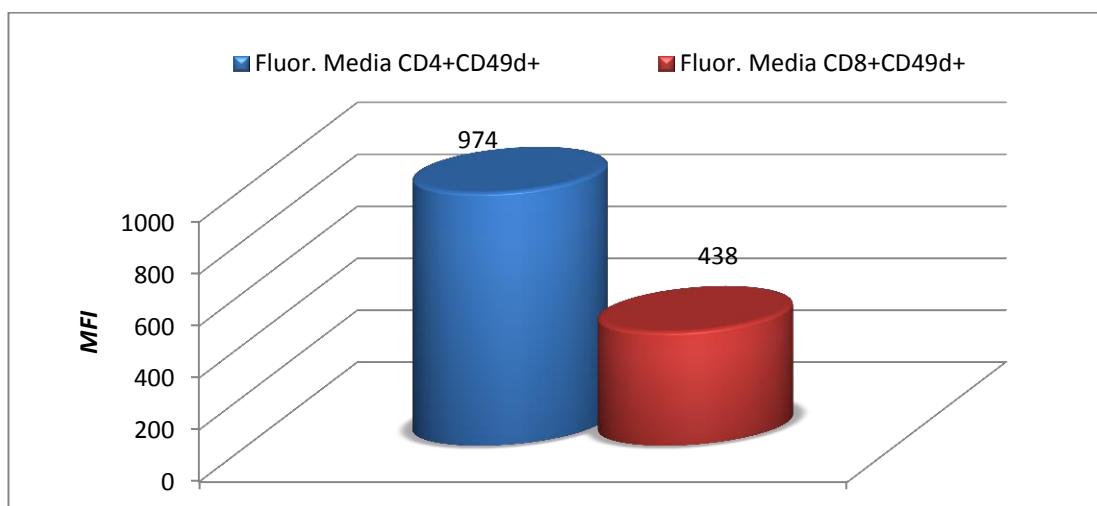


Grafico 25 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P8

3.2.8 Paziente 9

Al paziente 9 è stato effettuato un solo prelievo dopo sospensione di terapia interferonica e 24h dopo somministrazione di steroidi. Il paziente è un uomo di 27 anni calabrese. Due cugine consanguinee sono affette da sclerosi multipla, una di esse ha una forma progressiva.

3.2.8.1 *Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+*

Nel paziente 9 si osserva una suddivisione delle popolazioni di linfociti T uguale a quella che troviamo nei controlli. [Grafico 26]

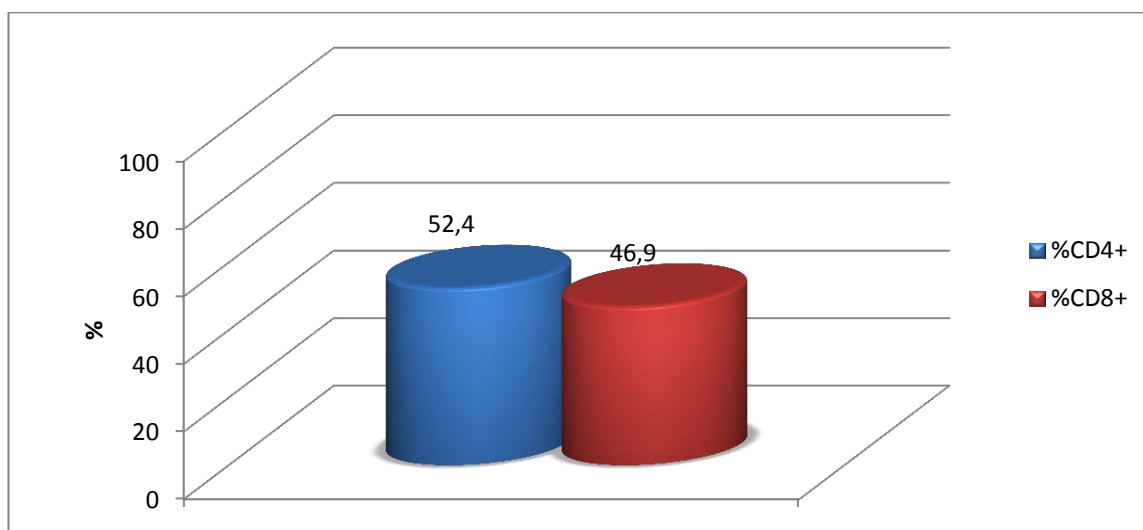


Grafico 26 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P9

3.2.8.2 *Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d*

Pur con una maggior percentuale di cellule CD4+ circolanti, poche di esse sono positive anche per la presenza del recettore VLA4. Anche se di poco sono di più le cellule CD8+ positive per la presenza del recettore. [Grafico 27]

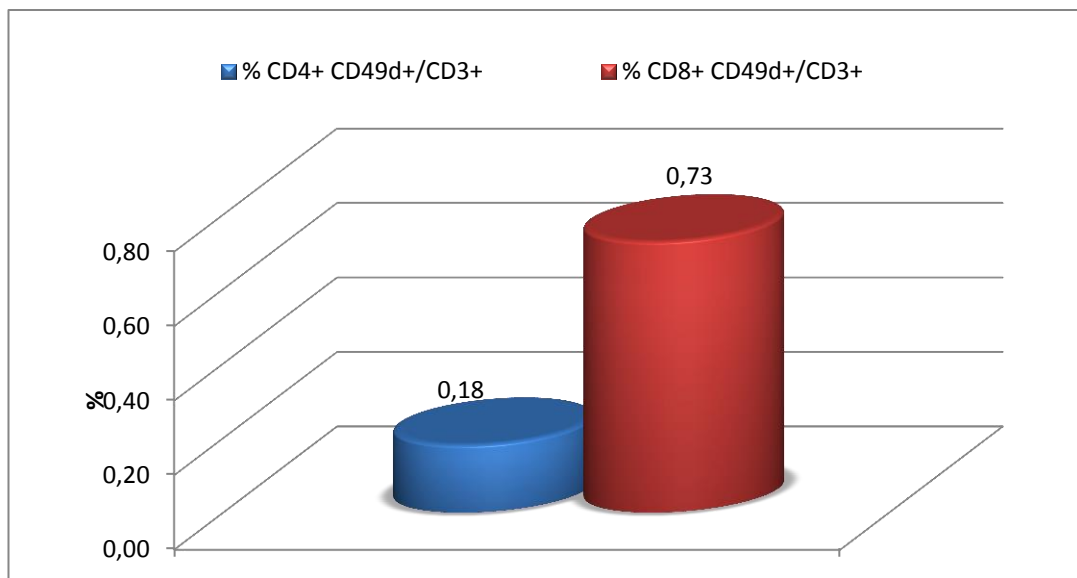


Grafico 27 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P9

3.2.8.3 Determinazione della fluorescenza media

Dal grafico sottostante si può osservare come il numero di recettori mediamente presenti su ciascuna cellula siano praticamente uguali su entrambe le famiglie di linfociti T [Grafico 28].

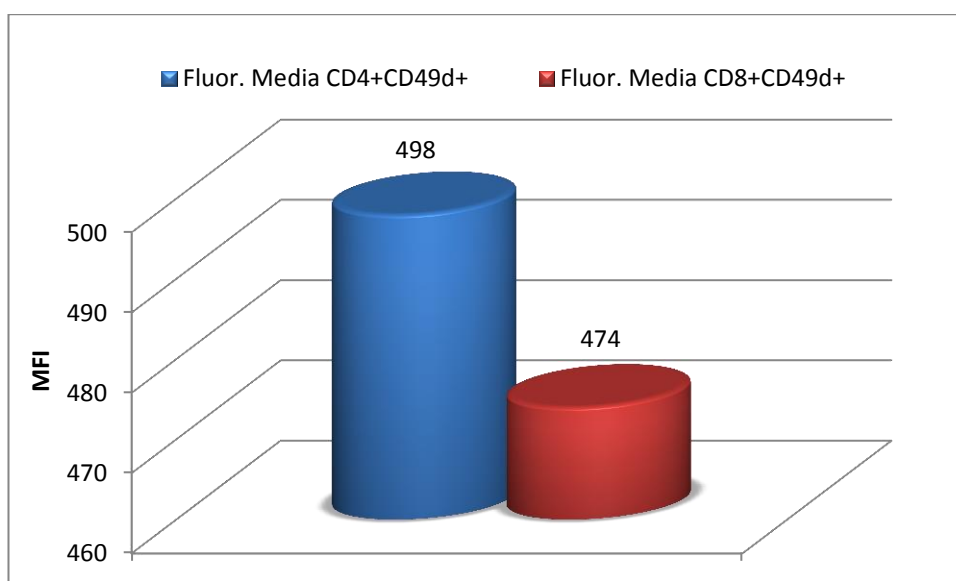


Grafico 28 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P9

3.2.9 Paziente 10

Al paziente 10 è stato effettuato un solo prelievo durante la somministrazione di mitoxantrone; infatti il paziente 10 è una donna del 1961 di origina calabrese affetta da SM da 14 anni che ha sviluppato una forma progressiva della patologia. La paziente è sottoposta a terapia con mitoxantrone per la SM ma assume molti altri farmaci per problemi reumatici (Deltacortene 25 mg, Peptazol 20, Triptizol 25, cardioaspirina 100, Prefolic 15, fans al bisogno). La sorella è affetta da SM nella forma RR, come anche il cugino che è il paziente 9

3.2.9.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

Anche in questa paziente come in molti altri visti fino ad ora si osserva una disomogeneità nella composizione della formula linfocitaria con un aumento della popolazione CD4+ ed un abbattimento della popolazione CD8+ [Grafico 29].

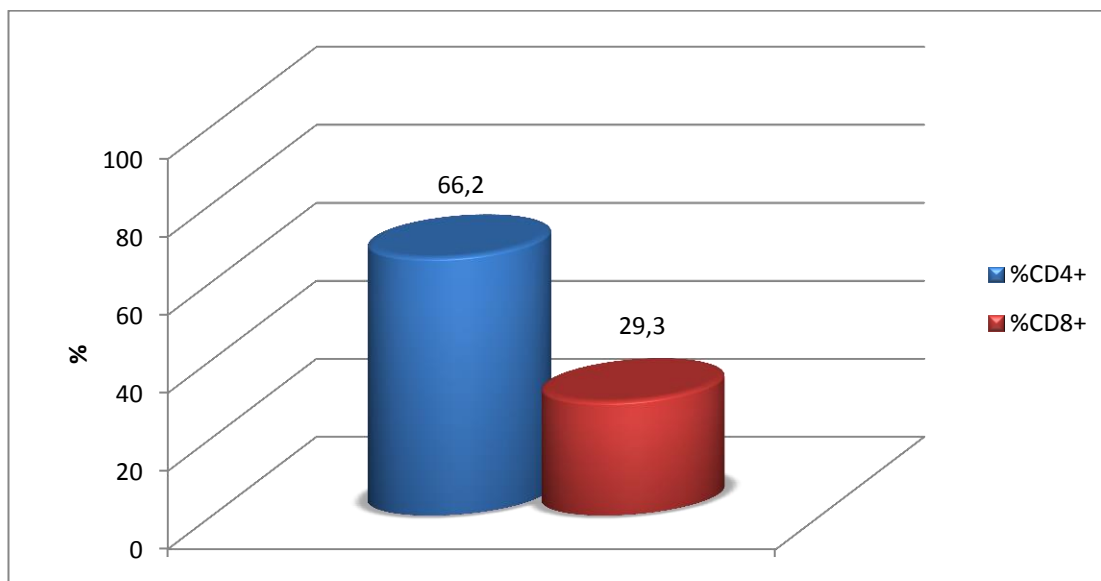


Grafico 29 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P10

3.2.9.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

La percentuale di popolazione positiva per la presenza del recettore VLA4 è molto esigua. In questo caso non si può parlare dell'azione del natalizumab, ma, probabilmente, il mix di farmaci a cui viene sottoposta la paziente creano un effetto simile a quello del natalizumab [Grafico 30].

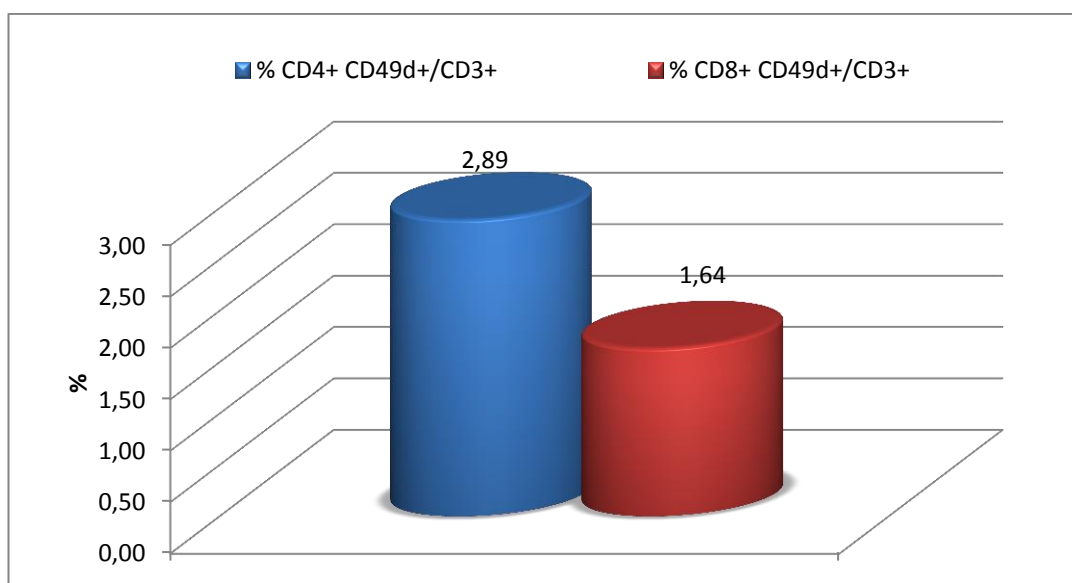


Grafico 30 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P10

3.2.9.3 Determinazione della fluorescenza media

Il numero di recettori medi presentati dalle cellule CD4+ e CD8+ sono paragonabili al numero di recettori presentati dai linfociti dei soggetti di controllo. Probabilmente il mix di farmaci non interferisce con l'esposizione del recettore a livello superficiale [Grafico 31].

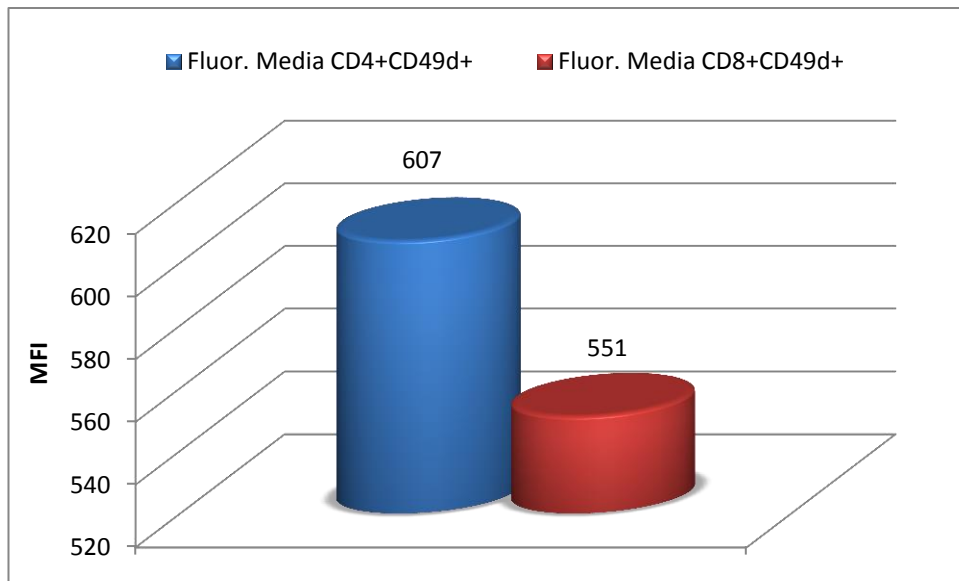


Grafico 31 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P10

3.2.10 Paziente 11

Al paziente 11 è stato effettuato un prelievo durante la terapia con IFN α 1. Il paziente 11 è una donna di 44 anni di origine calabrese affetta da RRSN da due anni. La sorella più grande è la paziente 10 e il cugino il paziente 9.

3.2.10.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

La paziente presenta una situazione praticamente uguale alla sorella (paziente 10) pur avendo una forma meno grave della malattia [Grafico 32]

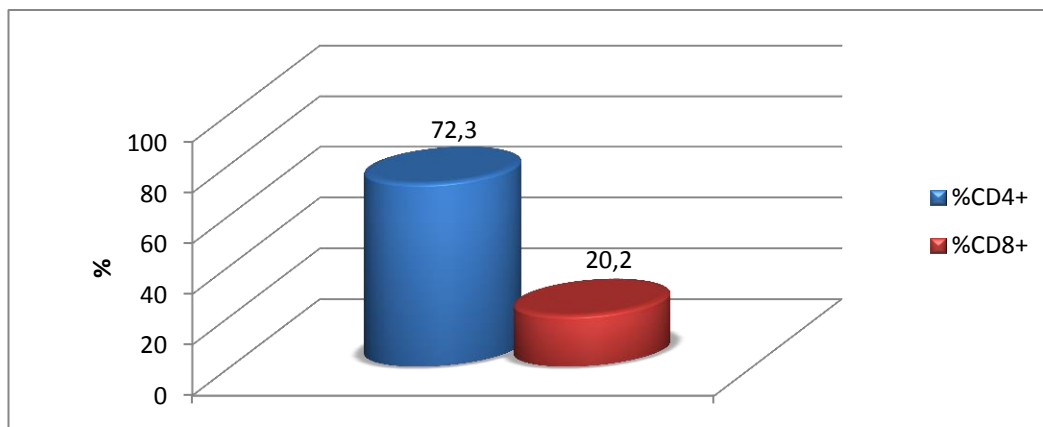


Grafico 32 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P11

3.2.10.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Come prevedibile come conseguenza della terapia interferonica, la percentuale di cellule presentanti il recettore è molto inferiore a quella dei soggetti di controllo [Grafico 33].

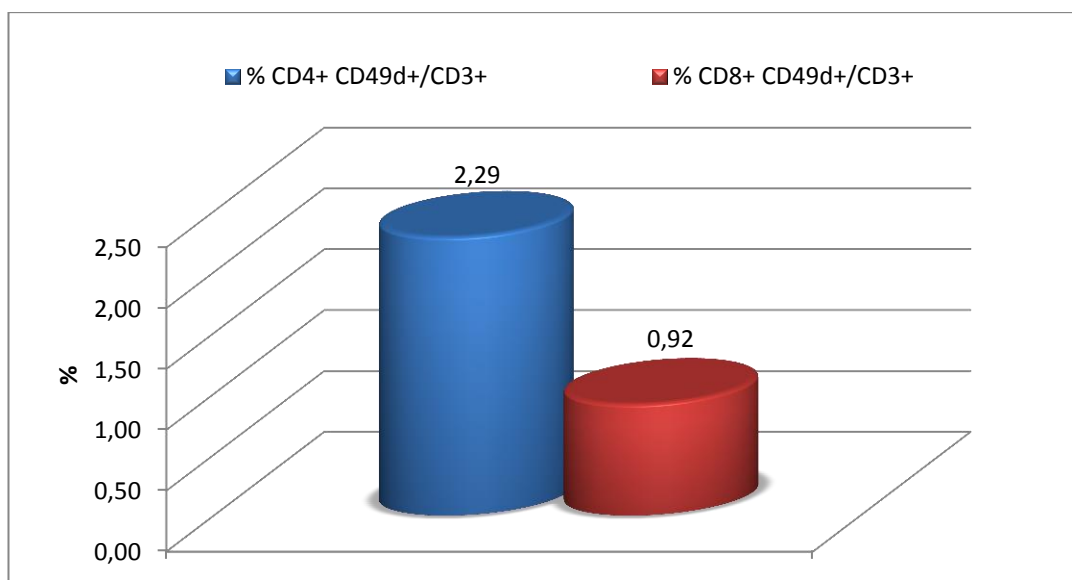


Grafico 33 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P11

3.2.10.3 Determinazione della fluorescenza media

Il numero di recettore medio presente sulla superficie delle cellule linfocitarie analizzate è molto simile a quello osservato nel paziente 10 (sorella) [Grafico 34]

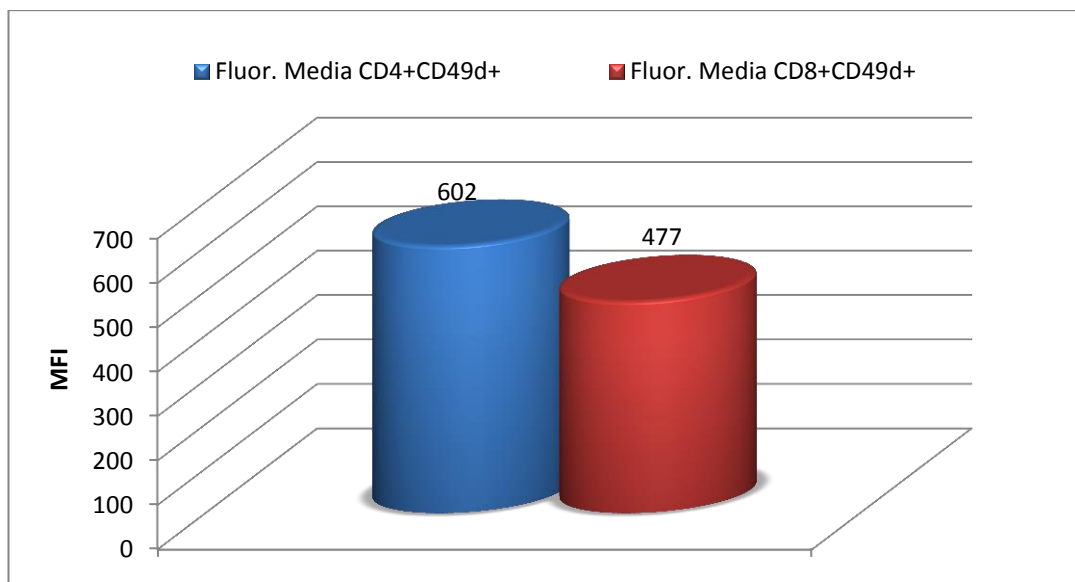


Grafico 34 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P11

3.2.11 Paziente 12

Al paziente 12 è stato effettuato un prelievo durante terapia con natalizumab. Il paziente è una donna del 1975 originaria dell'Emilia Romagna. In famiglia ha un caso di SM (la figlia della cugina del padre). La patologia è stata diagnosticata nel 2003 e trattata con IFN α per tre anni, successivamente è stata sospesa per tre anni per gravidanza e ripresa per altri tre anni. Dopo essere considerata non rispondente alla terapia interferonica è stata sottoposta a terapia con natalizumab. Dopo due anni di terapia si sospetta che la paziente sia una non rispondente anche al Tysabri.

3.2.II.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

La paziente presenta la stessa situazione di disregolazione della popolazione linfocitaria già osservata in altri pazienti [Grafico 35].

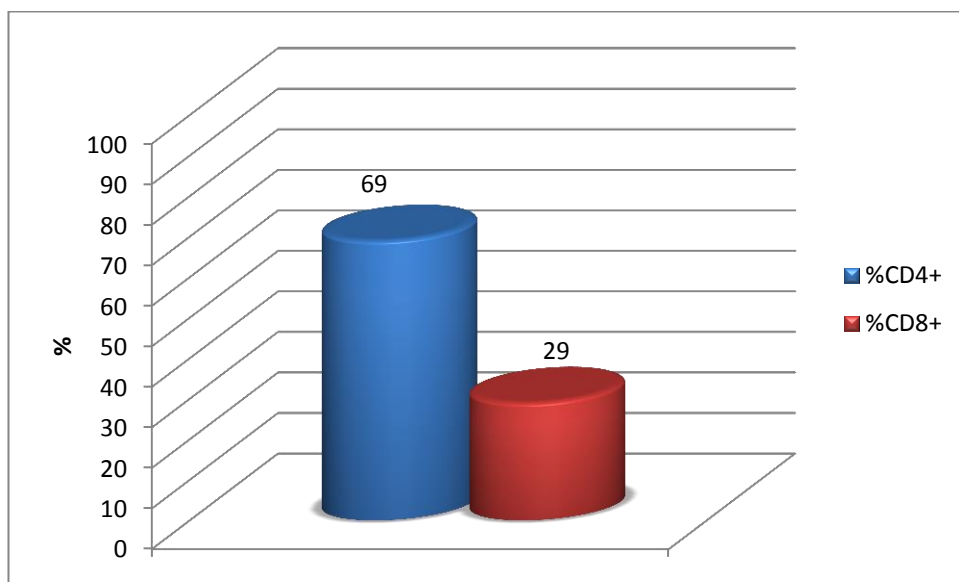


Grafico 35 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P12

3.2.II.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Ad una indagine citofluorimetrica i recettori VLA4 sembrano completamente saturati da natalizumab. Infatti la percentuale di cellule con il recettore libero è molto bassa [Grafico 36].

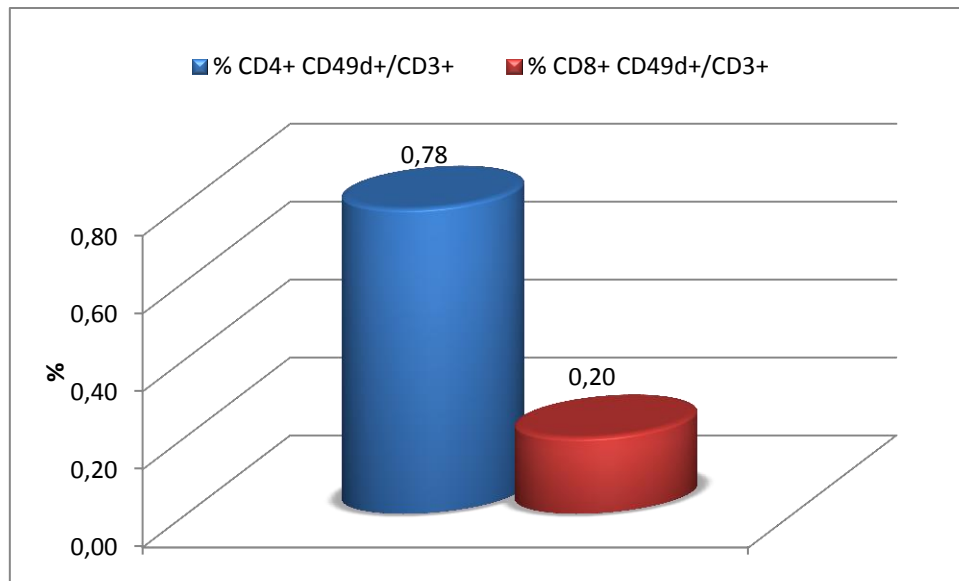


Grafico 36 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P12

3.2.II.3 Determinazione della fluorescenza media

La fluorescenza media indica come non ci siano differenza nel numero di recettori VLA4 nelle due subpopolazioni di linfociti T [Grafico 37].

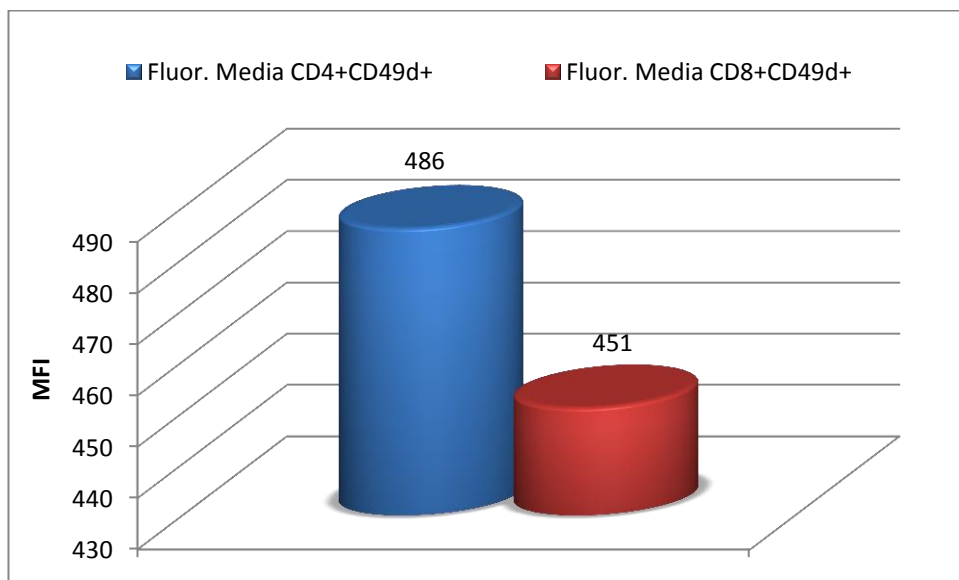


Grafico 37 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P12

3.2.12 Paziente 13

Al paziente 13 è stato effettuato un prelievo durante la terapia con natalizumab. Il paziente è una donna 1981 dell'Emilia Romagna. La patologia è stata diagnosticata nel 2008 e fino al 2010 è stata trattata con IFN β . Dopo essere considerata non rispondente alla terapia interferonica, è stata sottoposta a natalizumab e, dopo quattro anni, risulta non rispondente al Tysabri.

3.2.12.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

Nel caso di questa paziente, la disomogeneità tra le popolazioni linfocitarie non è così marcata come negli altri pazienti [Grafico 38].

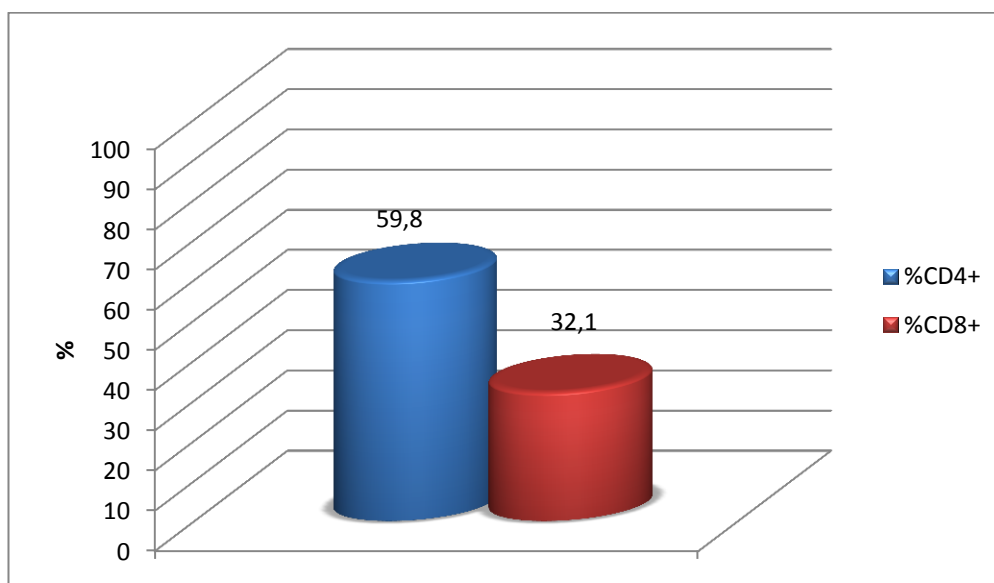


Grafico 38 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P13

3.2.12.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Contrariamente agli altri pazienti non rispondenti al Tysabri, in questo caso si osserva una minore saturazione del recettore VLA4 e, quindi, un maggior

numero di cellule con il recettore libero di legarsi all'anticorpo coniugato CD49d [Grafico 39].

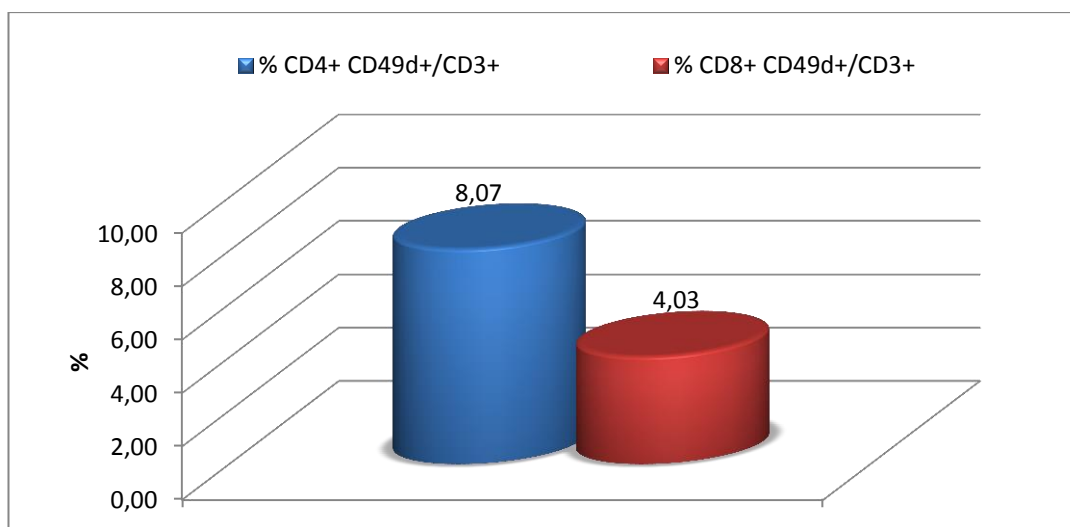


Grafico 39 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P13

3.2.12.3 Determinazione della fluorescenza media

La fluorescenza media di ogni evento rilevato dal citofluorimetro mostra che non esiste una differenza nel numero di recettori superficiali cellule nei due tipi cellulari [Grafico 40].

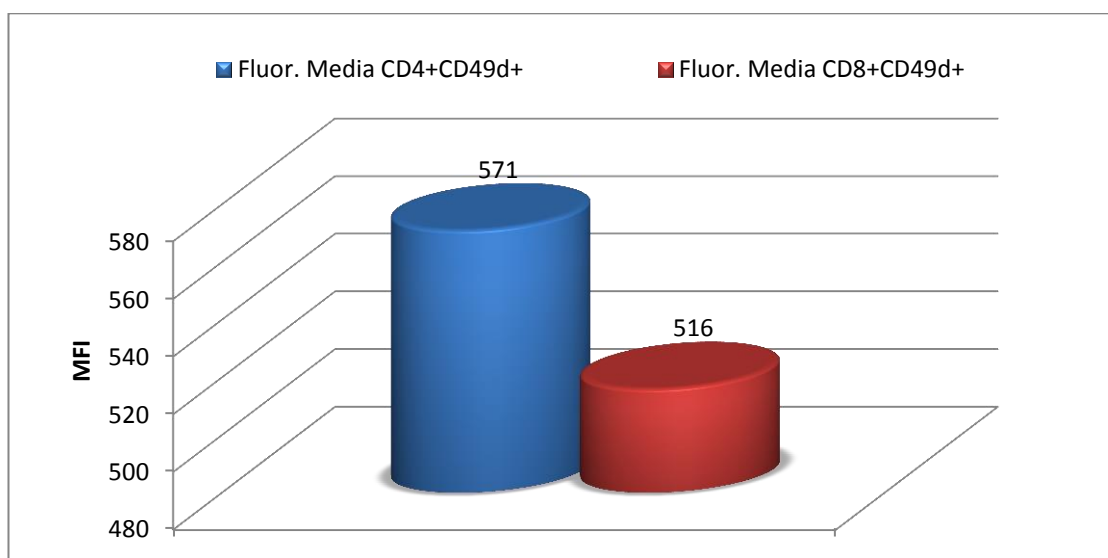


Grafico 40 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P13

3.2.13 Paziente 14

Al paziente 14 sono stati effettuati due prelievi durante la terapia con natalizumab. Il paziente 14 è una donna del 1975 con madre dell'Emilia Romagna e padre campano. Non ha effettuato nessuna terapia di prima linea, è stata sottoposta a Tysabri dal 2013 e dopo un anno senza stabilizzazione della patologia, è stata dichiarata non rispondente al natalizumab.

3.2.13.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

Non si evidenziano differenze tra i due prelievi e viene mantenuta la leggera disomogeneità delle due popolazioni linfocitarie [Grafico 41]

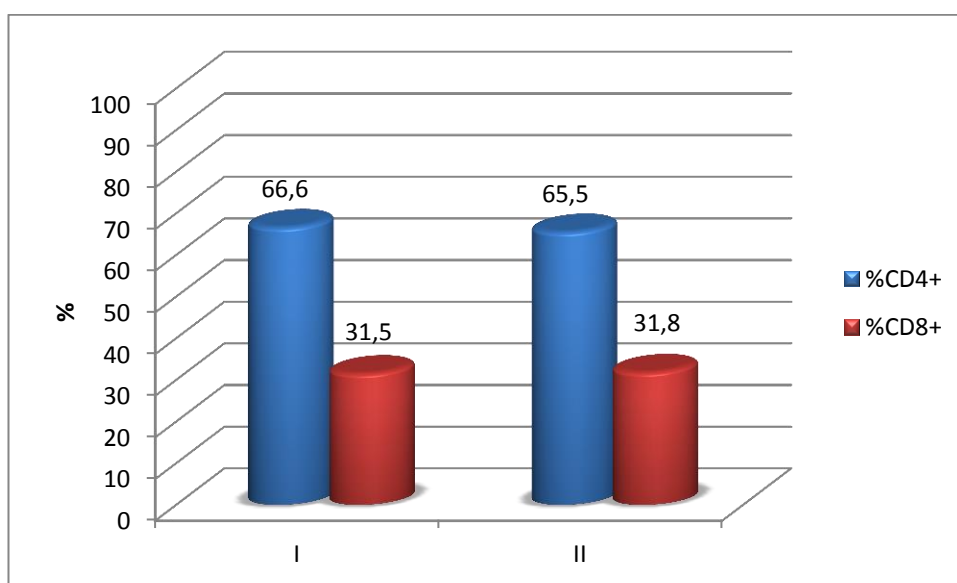


Grafico 41 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P14

3.2.13.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Come si può evincere dal grafico sottostante, la percentuale di cellule presentanti il recettore VLA4 libero è molto bassa per entrambe le sottofamiglie di linfociti T [Grafico 42].

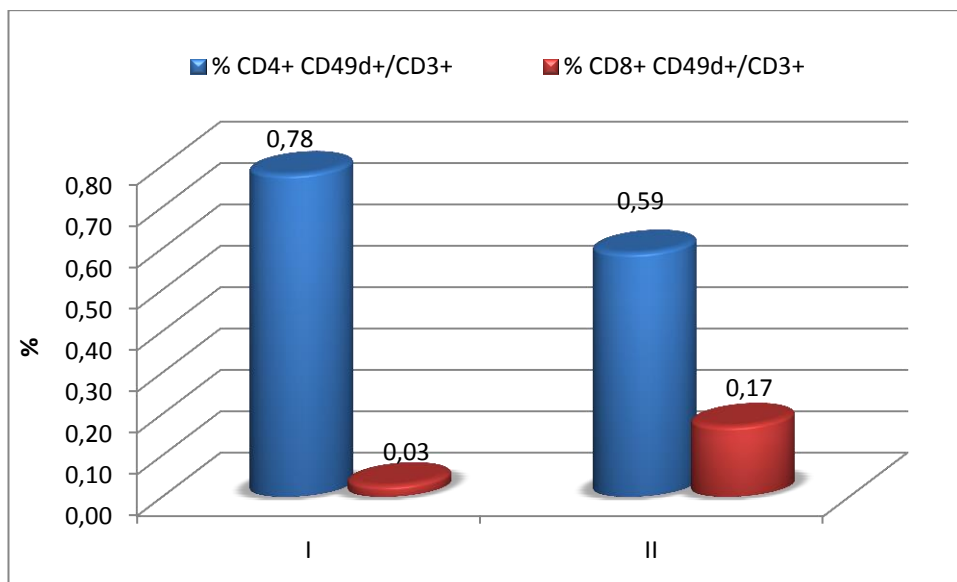


Grafico 42 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P14

3.2.13.3 Determinazione della fluorescenza media

La paziente, pur mostrando una bassissima percentuale di cellule con recettore libero, sulle poche cellule positive per VLA4 si ha un enorme quantitativo di recettore; enormemente più alto rispetto ad altri pazienti [Grafico 43].

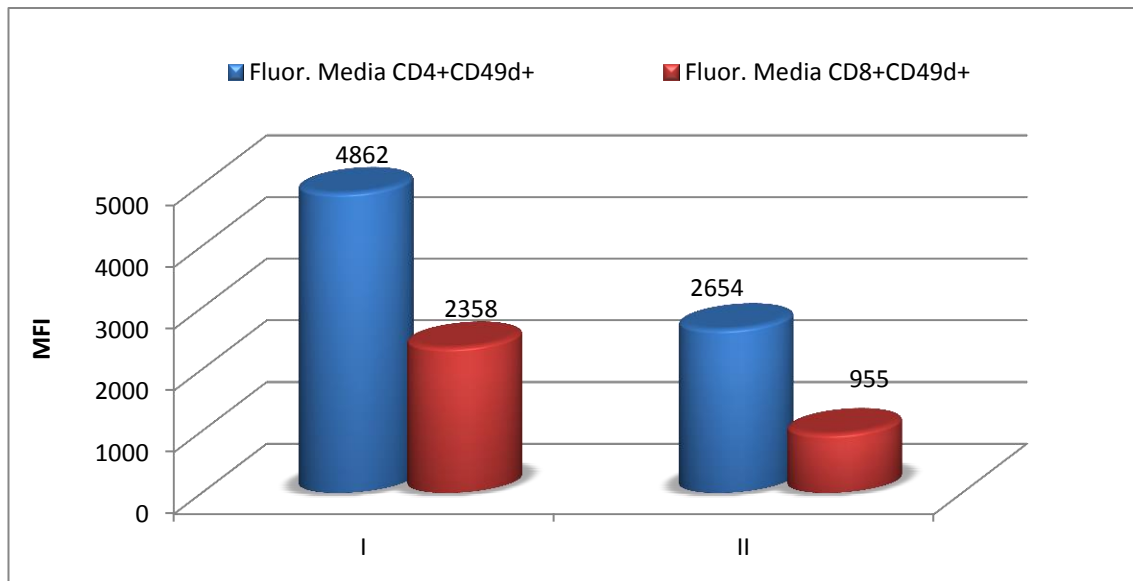


Grafico 43 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P14

3.2.14 Paziente 15

Al paziente 15 sono stati effettuati due prelievi durante la terapia con Tysabri. Il paziente è una donna del 1963 dell'Emilia Romagna con una figlia affetta SM. Alla diagnosi è stata trattata con interferone beta e, risultando non rispondente, è stata sottoposta a terapia con natalizumab. Attualmente risulta non rispondente al Tysabri.

3.2.14.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

La paziente mostra una notevole disregolazione delle popolazioni linfocitarie con un aumento abnorme di cellule CD4+ e diminuzione drastica delle cellule CD8+ [Grafico 44].

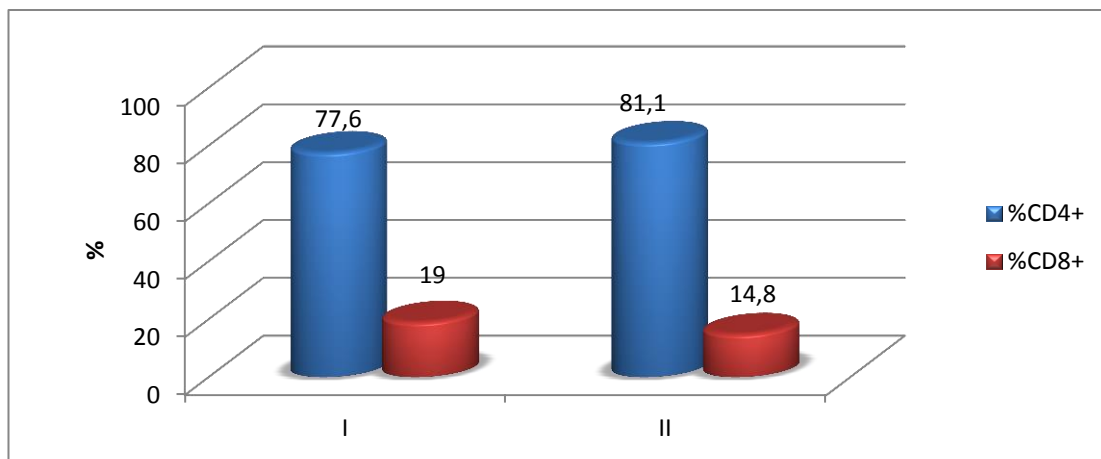


Grafico 44 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P15

3.2.14.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

La presenza di cellule presentanti il recettore libero è molto esigua, addirittura, nel secondo prelievo, il numero di CD8+ con VLA4 libero è talmente bassa che lo strumento non ne rileva. Ciò indica un alto grado di saturazione dei recettori da parte di natalizumab [Grafico 45].

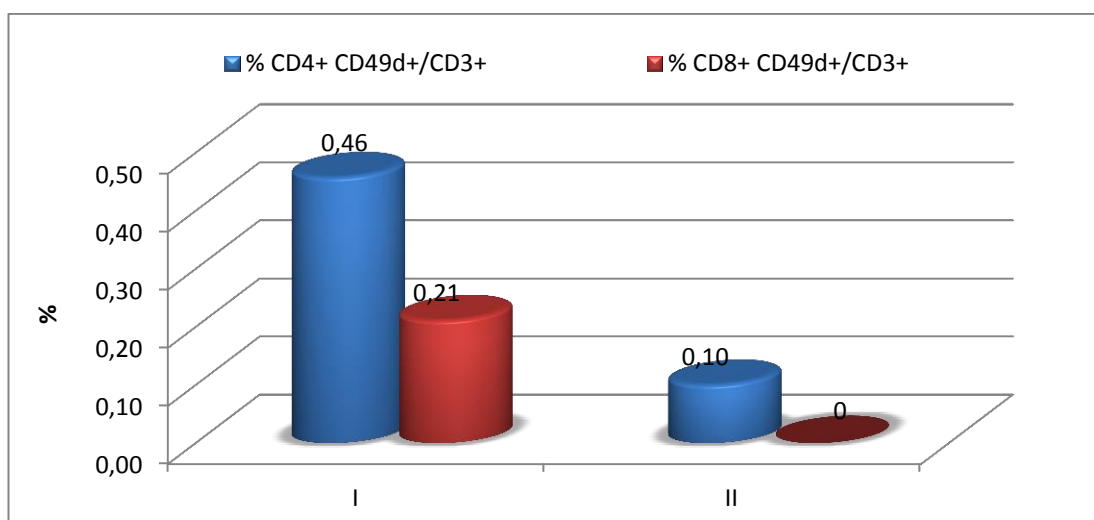


Grafico 45 – Percentuale di cellule CD4+/Cd3+ e CD8+/CD3+ presentanti il recettore CD49d in P15

3.2.14.3 Determinazione della fluorescenza media

Come nel caso della paziente 14, anche questo soggetto pur mostrando pochissime cellule con il recettore libero, presenta un elevato numero di recettori sulla superficie cellulare. Poichè lo strumento non ha rilevato nessun evento CD8+CD49d+ anche la fluorescenza media rilevabile è pari a zero [Grafico 46].

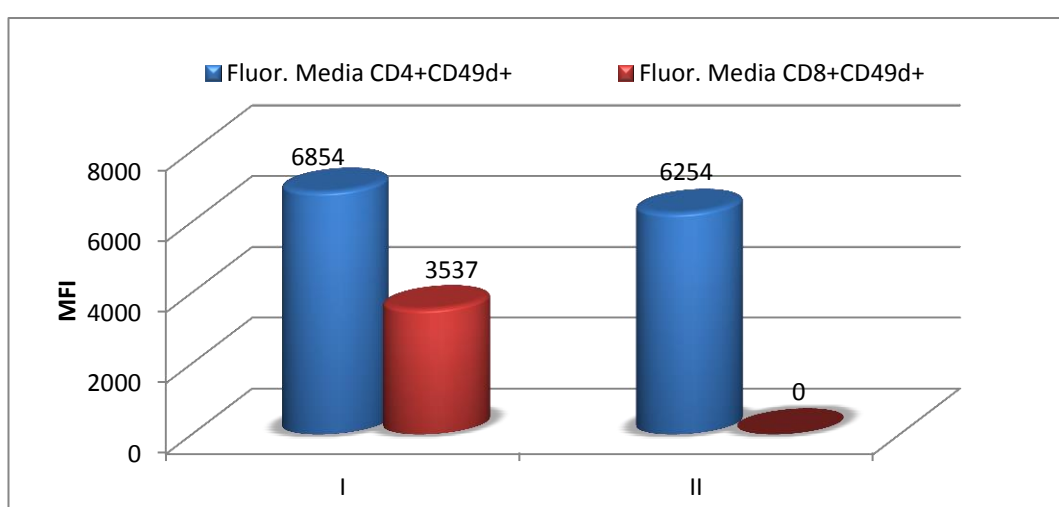


Grafico 46 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P15

3.2.15 Paziente 16

Al paziente 16 è stato effettuato un solo prelievo durante terapia con natalizumab. Il paziente è una donna del 1995 originaria dell'Albania a cui è stata diagnosticata la patologia a 15 anni (caso pediatrico) e sottoposta a terapia con interferone beta per due anni. Considerata non rispondente alla terapia di prima linea, è stata sottoposta a Tysabri dal 2012 fino ad oggi. Ad ora è considerata non rispondente al Tysabri. La madre è affetta da SM.

3.2.15.1 Determinazione della percentuale di linfociti CD4+ e CD8+

Come già osservato anche in altri pazienti, il soggetto 16 mostra la caratteristica disomogeneità delle popolazioni linfocitarie T [Grafico 47].

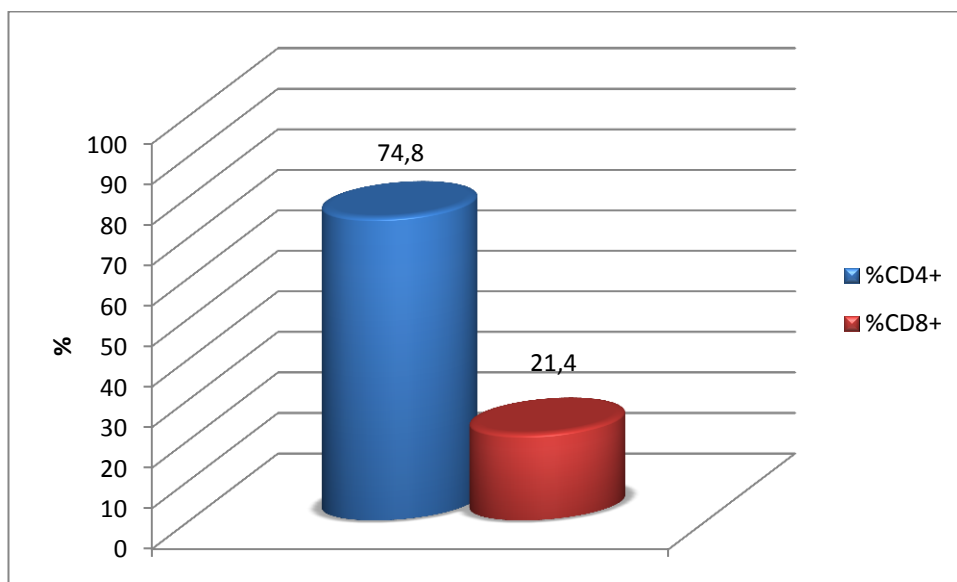
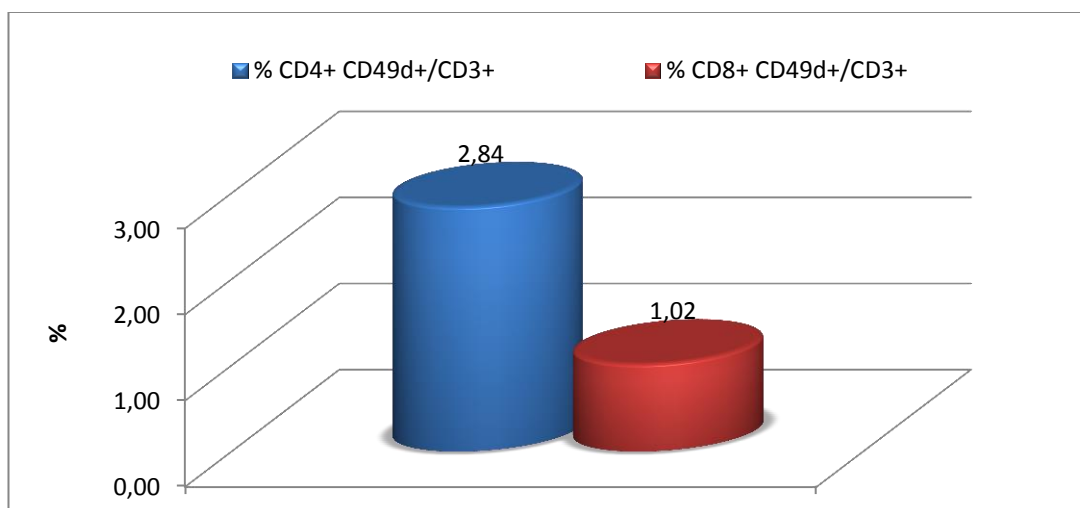


Grafico 47 – percentuale di popolazione CD4+ e CD8+ in P16

3.2.15.2 Determinazione dei livelli di espressione superficiale di CD49d

Come si evince dal grafico sottostante, la percentuale di popolazione linfocitaria T presentante il recettore libero è molto esigua [Grafico 48].



3.2.15.3 Determinazione della fluorescenza media

Nel caso della paziente 16 è possibile notare la grande differenza tra il numero di recettori liberi presenti mediamente sulle cellule CD4+ e CD8+. Le cellule CD4+ presentano molto più recettore a livello superficiale rispetto alla popolazione CD8+ [Grafico 49].

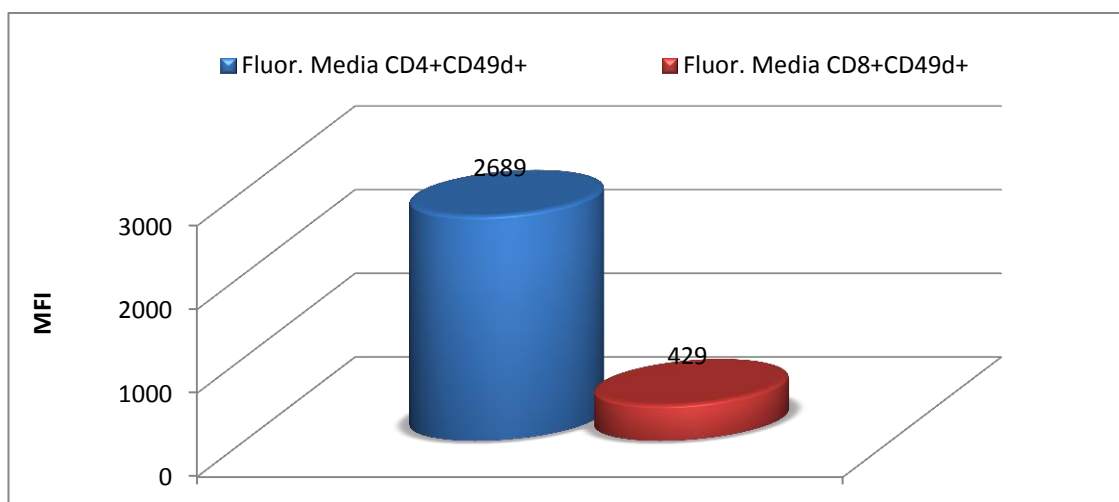


Grafico 49 – Fluorescenza media di CD49d nelle subpopolazioni CD4+ e CD8+ in P16

4 DISCUSSIONE

Al fine di identificare alcuni biomarker clinici e/o molecolari che possano essere impiegati nella predizione di una risposta individuale a vari farmaci, in particolare a natalizumab, in pazienti affetti da sclerosi multipla e relativi soggetti di controllo, sono state condotte indagini su diverse popolazioni di linfociti T (CD4+ e CD8+) esprimenti o meno il recettore VLA4 (Cd49d).

Dai dati ottenuti mediante analisi citofluorimetriche, si può osservare un diverso rapporto CD4+/CD8+ nei controlli rispetto ai pazienti. Come dimostrato nel grafico..., i controlli presentano un valore medio relativo al rapporto tra CD4+/CD8+ inferiore rispetto alla media dei pazienti.

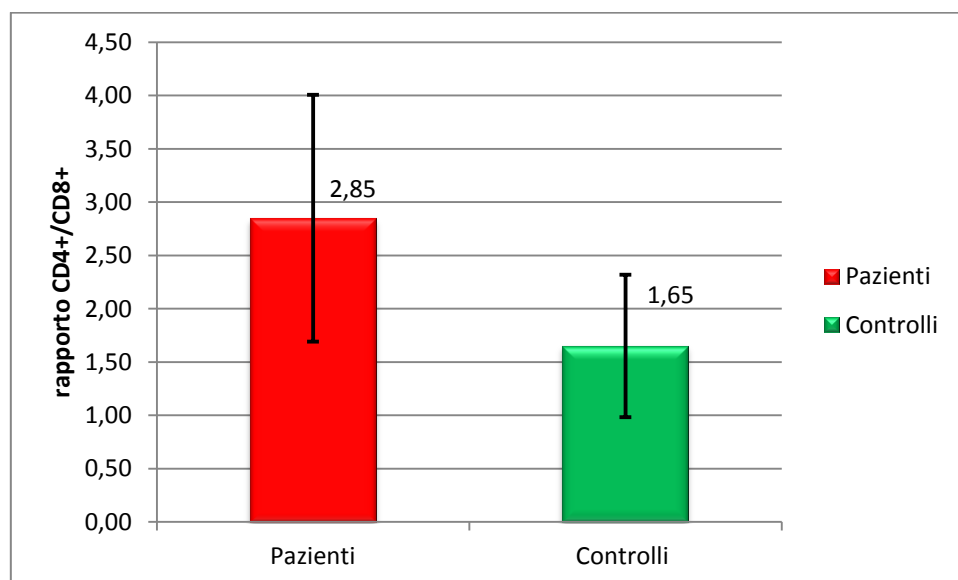


Grafico 50 – Rapporto CD4+/Cd8+ nei pazienti e nei soggetti di controllo.
Viene riportata la media +/- DS

Si può osservare come la media dei pazienti, qualsiasi sia la terapia farmacologica a cui sono sottoposti, mostri un disequilibrio nel rapporto CD4+/CD8+. Tale disequilibrio risulta simile a quello riscontrato nei soggetti

che in un primo tempo sono stati inseriti nel gruppo di controllo e successivamente tolti in quanto considerati “confondenti”. Questi “falsi” controlli sono rappresentati da un soggetto trapiantato (C2) e da un soggetto affetto da celiachia (C15). C2, è sottoposto ad un mix di farmaci ad azione immunosoppressiva che comportano una riduzione percentuale dei linfociti T CD8+ responsabili dell'azione citotossica. Sembrerebbe che i pazienti affetti da malattie autoimmuni, come C15, e, quindi, con condizione di infiammazione cronica verso ciò che è self, producano una modulazione della risposta immunitaria che comporta una riduzione percentuale dei linfociti T CD8+.

Sebbene nella maggior parte dei pazienti si osservi una maggior rappresentatività dei linfociti CD4+ rispetto ai CD8+, indipendentemente dal tipo di farmaco utilizzato e dal momento del prelievo, in alcuni di questi è stato osservato un comportamento diverso dalla media. In figura (quale) vengono riportati per confronto tre casi che rappresentano andamenti diversi del rapporto CD4+/CD8+ osservati durante il percorso terapeutico dei pazienti. I dati relativi al paziente P1 sono rappresentativi dell'andamento del rapporto tra CD4+ e CD8+ osservato nella popolazione dei soggetti analizzati affetti da SM. Il paziente P2 presenta durante la pausa terapeutica da IFN α un rapporto CD4+/CD8+ al di sopra della media dei pazienti. Tale rapporto si abbassa durante la terapia con natalizumab raggiungendo i livelli medi osservati per gli altri pazienti. Nel caso del paziente P7 si osserva una diversa condizione iniziale, si sottolinea che il prelievo T0 è avvenuto dopo un bolo di steroidi. In questa condizione terapeutica, il paziente mostra un rapporto uguale alla media dei controlli (circa 1.4). Dopo un mese di trattamento con natalizumab si evidenzia un aumento di tale rapporto che va a stabilizzarsi su livelli simili a quelli dei controlli nei mesi successivi.

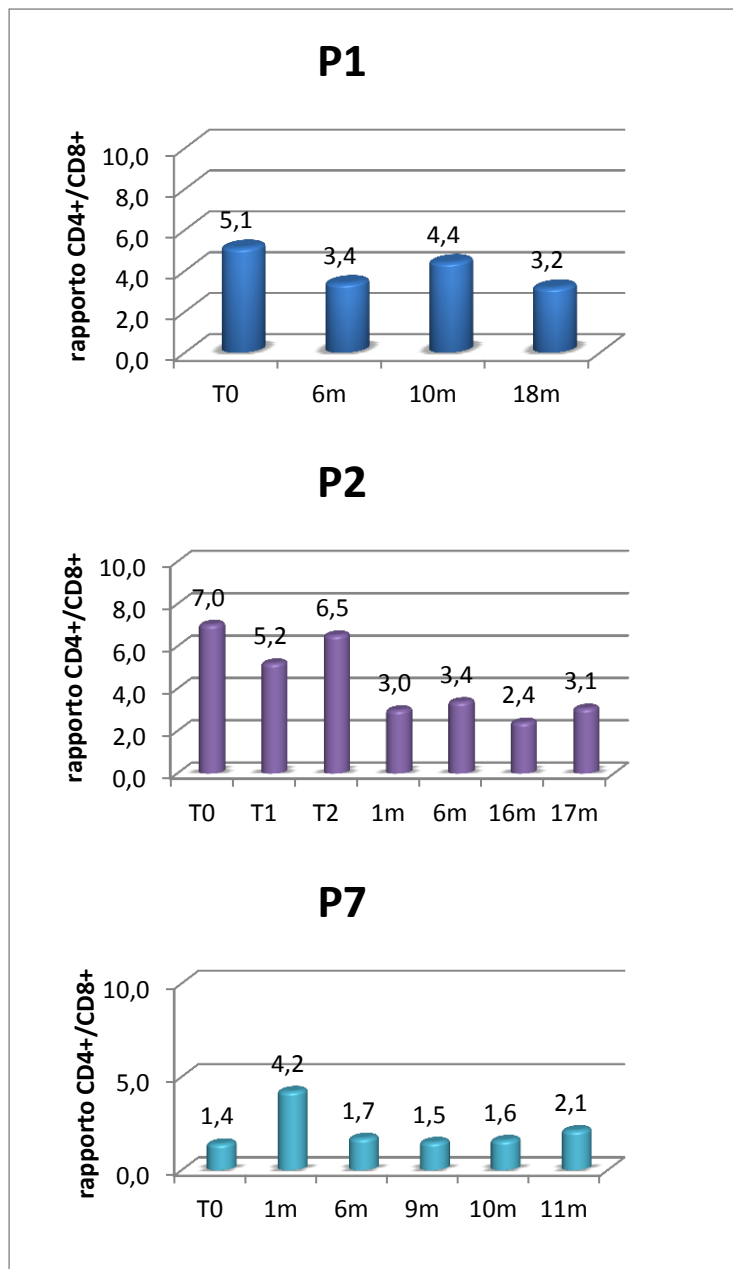


Figura 9 – Rapporto CD4+/CD8+ in tre pazienti modello

Il numero di linfociti CD3 positivi per la presenza del recettore VLA4 (CD49d) varia nei pazienti a seconda del tipo di terapia a cui il soggetto è sottoposto. Per quanto riguarda la presenza del recettore VLA4 sulla superficie dei linfociti CD4+ e CD8+, si osserva nei soggetti di controllo una percentuale di CD4+ e di CD8+ positivi per CD49d nella popolazione CD3+ rispettivamente del 5% e del 12%.

Durante la terapia con IFN α si osserva una differenza nella percentuale di cellule presentanti il recettore VLA4 (CD49d) soprattutto sui linfociti T CD8+. I pazienti sottoposti a tale terapia, presentano una percentuale di CD8+CD49d+ di circa quattro volte inferiore rispetto ai soggetti di controllo. Bisogna precisare che, in base alle analisi delle singole popolazioni linfocitarie, IFN α agisce sul numero di cellule presentanti il recettore [Fig.10]. Rispetto a ciò che è già stato pubblicato da altri autori, non si rileva una differenza di numero di recettori sulla superficie delle cellule (rilevato attraverso la fluorescenza media-MFI) ma un aumento del numero di cellule presentanti il recettore una volta sospesa la terapia [Fig.10] Questo potrebbe significare che IFN β non agisca a livello delle singole cellule circolanti ma sull'espressione genica delle cellule di nuova generazione. Al termine della sospensione della terapia di prima linea, si osserva che la percentuale di cellule positive per CD49d risultano maggiori sia rispetto ai soggetti in trattamento, come atteso, sia rispetto ai soggetti di controllo. Questo dato è spiegabile dal momento che lo stato di infiammazione induce un aumento delle cellule presentanti il recettore CD49d.

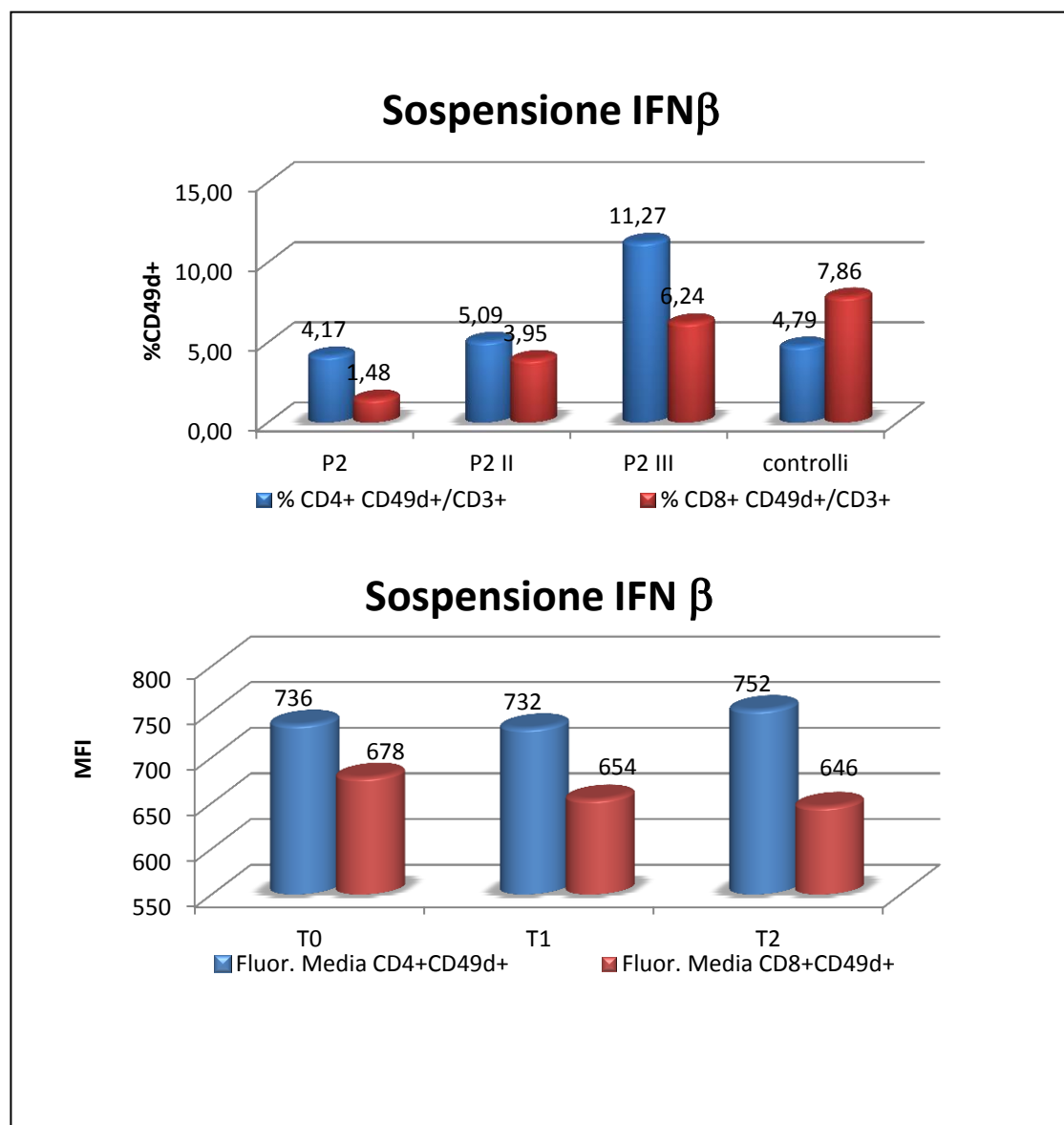


Figura 10 – Modulazione del recettore CD49d durante la sospensione della terapia con IFN β

Nei pazienti sottoposti a trattamento con Glatiramer acetato (GA) si osserva una diminuzione del numero di cellule positive per la presenza del recettore VLA4 rispetto ai controlli ma, come nel caso della terapia con IFN β non si osserva la stessa diminuzione dell'espressione superficiale sulle singole cellule [Fig.11]. Sebbene il meccanismo di azione di GA ad oggi noto non preveda interazioni con il recettore VLA4, questi primi dati preliminari suggeriscono che questo tipo di terapia possa influenzare il numero di cellule esprimenti il recettore a livello superficiale. Se il dato fosse confermato su un adeguato

numero di soggetti, si potrebbe immaginare l'applicazione di una pausa terapeutica anche per i pazienti sottoposti a GA.

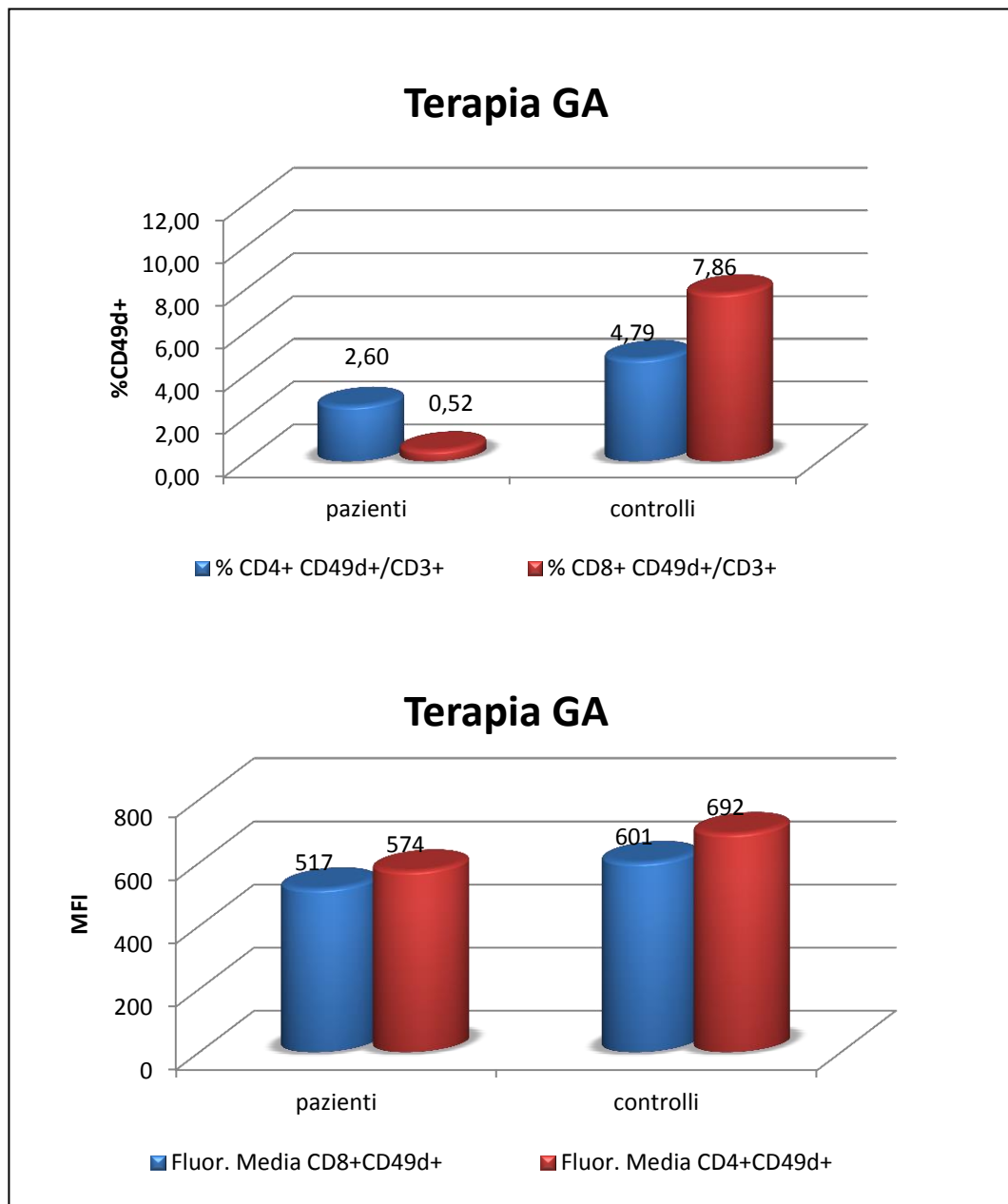


Figura 11 – Modulazione del recettore CD49d durante terapia con glatiramene acetato

Natalizumab (Tysabri®) è un anticorpo monoclonale ricombinato umanizzato IgG4, diretto contro il dominio $\alpha 4$ della $\alpha 4\beta 1$ integrina, espresso sulla superficie di tutti i leucociti ad eccezione dei neutrofili. Tale molecola si lega al recettore VLA-4 agendo principalmente come antagonista di molecole di

adesione vascolari (VCAM), inibendo il legame dei leucociti a VCAM-1 e alla fibronectina (FN). VCAM-1 è sovraregolato durante il processo infiammatorio, inducendo una migrazione controllata dei leucociti verso il loro tessuto bersaglio (ref?). L'interazione tra il farmaco e il recettore CD49d impedisce il legame tra il recettore e l'anticorpo specifico (anti-CD49d) utilizzato nella quantificazione mediante analisi citofluorimetrica. La comparsa di cellule presentanti il recettore durante la terapia con natalizumab è un indice di una carenza di saturazione dei recettori che identifica un inadeguato trattamento terapeutico. I pazienti trattati con natalizumab presentano in media un numero esiguo di cellule CD49d+, tale condizione è indice dell'efficacia dell'intervento terapeutico. [Grafico 51]

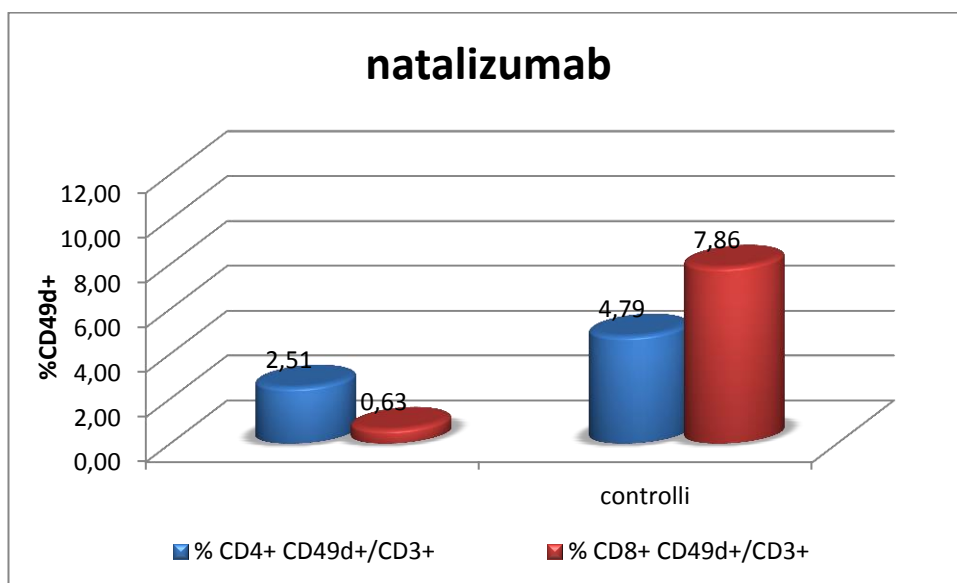


Grafico 51 – Modulazione %CD49d espresso sulla superficie delle popolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+

Uno dei risultati più interessanti ottenuti durante il periodo di dottorato è correlato alla variazione non tanto del numero delle cellule presentanti recettori non saturi quanto del numero di recettori a livello delle singole cellule. Dai dati ottenuti dai diversi pazienti sottoposti a terapia con Tysabri

presso l'Ospedale di Vaio, si evince che l'espressione superficiale del recettore a livello cellulare risulta modulata durante il periodo di trattamento. In alcuni pazienti, in particolare (P2, P7), si è rilevato un aumento del numero di recettori superficiali dopo circa 6 mesi di trattamento con Tysabri [Grafico 52]

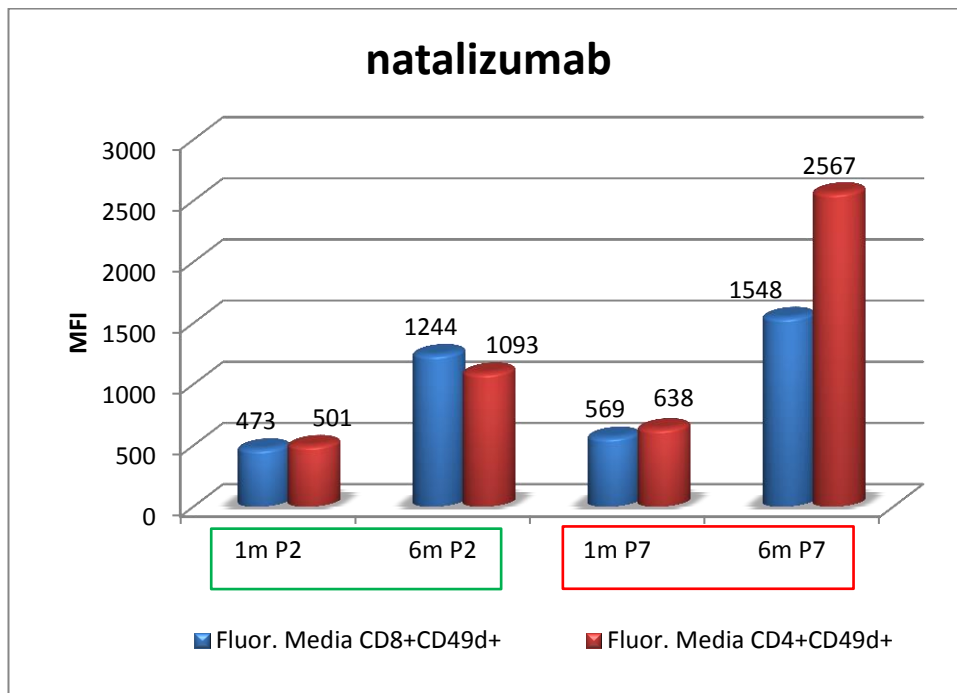


Grafico 52 – Confronto tra la MFI dei pazienti P2 e P7 negli stessi intervalli di tempo durante trattamento con natalizumab

All'interno della popolazione dei soggetti trattati con natalizumab, sono presenti alcuni soggetti che vengono classificati non rispondenti alla terapia dal punto di vista clinico (P14, P15, P16). Questi soggetti presentano, durante la terapia, un numero di recettori mediamente presenti sulla superficie delle cellule linfocitarie molto elevato, soprattutto se confrontati con i valori dei controlli [Grafico 53]

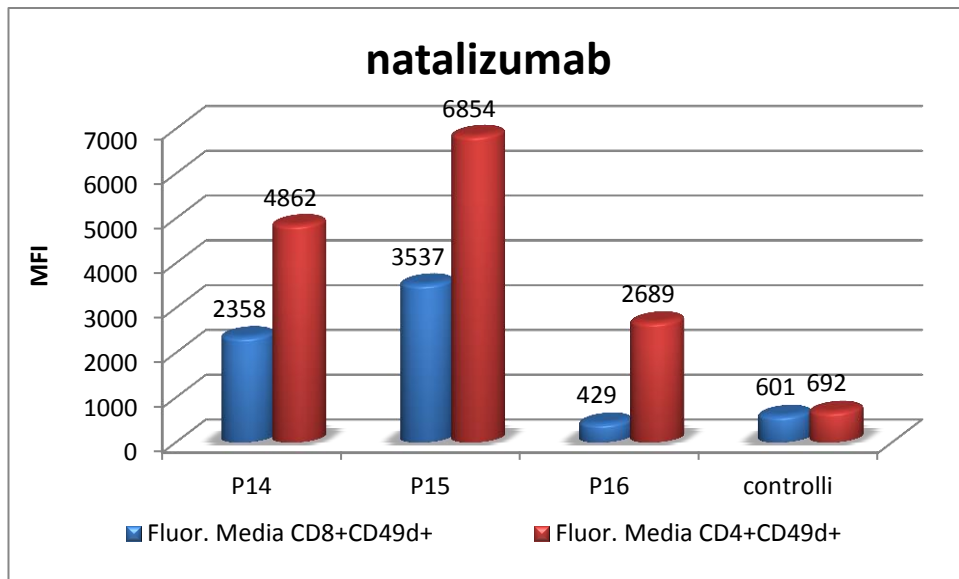


Grafico 53 – Espressione superficiale di CD49d in pazienti considerati non rispondenti al natalizumab in tempi diversi di trattamento

Questo aumento di numero di recettori non corrisponde ad un aumento del numero di cellule presentanti il recettore libero, questo fa presupporre che durante la terapia con natalizumab possano coesistere cellule saturate dal farmaco ed altre completamente non saturate, che potrebbero corrispondere a cellule generate dopo la clearance del farmaco. L'emivita del farmaco è di circa 15 giorni, dopo tale periodo la concentrazione diminuisce e le cellule che si generano dopo tale periodo si trovano in un ambiente povero di natalizumab. In letteratura (ref?) si riportano evidenze della presenza in alcuni pazienti di anticorpi anti-natalizumab (NAb), che potrebbero legare il farmaco ed impedirne quindi il legame con il recettore VLA4. La mancata saturazione del recettore si potrebbe correlare con l'instaurarsi di una risposta non efficace al trattamento con natalizumab.

Il meccanismo molecolare che sottende all'aumento dell'espressione fenotipica di CD49d, nei soggetti trattati con interferone e con natalizumab, è stato correlato con l'espressione del gene per il recettore VLA4, per identificare una

possibile influenza del farmaco sulla trascrizione genica. A livello trascrizionale si è evidenziata una azione modulante della terapia interferonica sull'espressione genica di VLA4. Infatti, dopo sospensione della terapia interferonica, si ha un aumento della trascrizione che corrisponde ad un aumento delle cellule presentanti il recettore [Grafico 54].

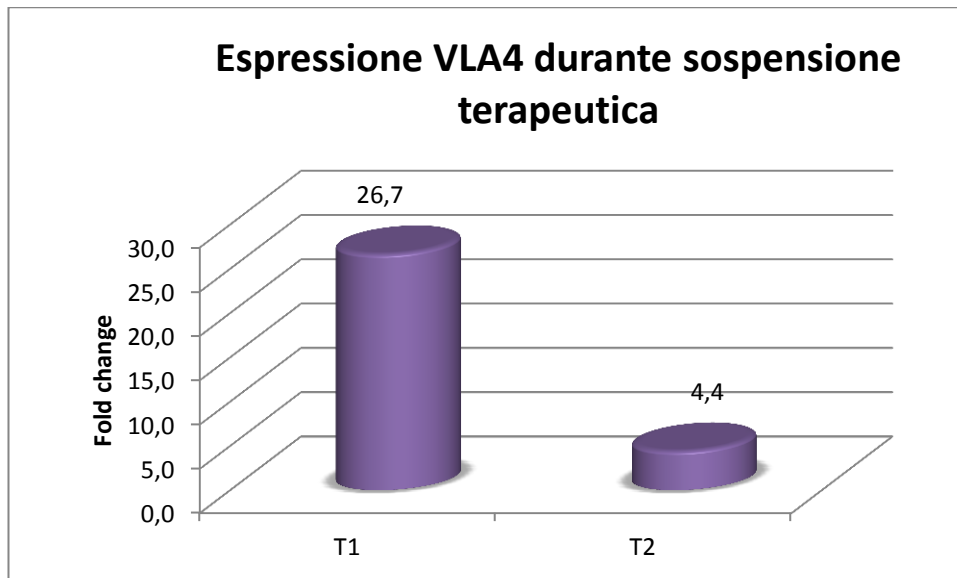


Grafico 54 – Espressione genica di VLA4 nel paziente P2 durante la sospensione della terapia di prima linea, IFN β

E' evidente una modulazione dell'espressione genica di VLA4 durante la terapia con natalizumab. Come riportato nella figura.... in cui viene riportato, ad esempio, un soggetto in terapia con natalizumab, si osserva una risposta trascrizionale al trattamento farmacologico. Il dato relativo all'attività trascrizionale risulta particolarmente interessante dal momento che fino ad ora non era mai stato ipotizzato che natalizumab potesse influire sul trascrittoma dei linfociti. Nel paziente P1 si osserva una modulazione dell'attività trascrizionale che sembra particolarmente importante dopo 18 mesi dall'inizio del trattamento. Questo comportamento potrebbe supportare l'ipotesi che la

saturazione dei recettori CD49d possa indurre a livello cellulare un segnale volto alla produzione di nuovi recettori. [Grafico 55]

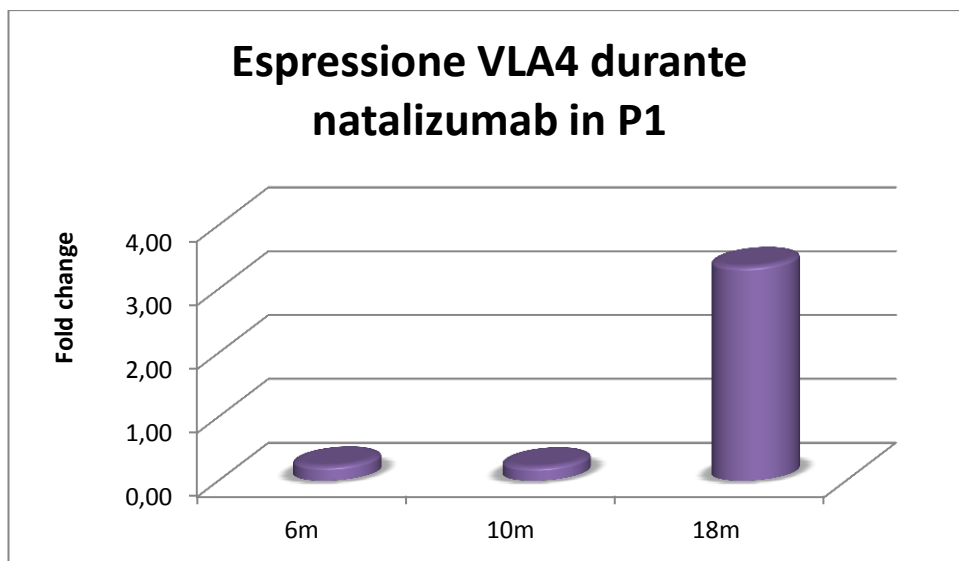


Grafico 55 – Espressione genica di VLA4 nel paziente P1 Durante la terapia con Natalizumab

5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I dati preliminari contenuti in questa tesi, sebbene siano riferiti ad una piccola e variegata popolazione di pazienti, hanno messo in luce alcuni risultati che sarebbe interessante validare su un campione di pazienti più ampio al fine di identificare biomarker molecolari per la definizione dell'efficacia terapeutica di farmaci di prima o seconda linea specifici per la SM.

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie CD4⁺ e CD8⁺ sulla popolazione dei linfociti CD3⁺ evidenzia come il rapporto percentuale tra le due popolazioni cellulari (CD4⁺/CD8⁺) risulti più elevato nei soggetti patologici rispetto ai soggetti di controllo. Nei pazienti tale rapporto non viene alterato dalle terapie farmacologiche.

La terapia con interferone β modula l'espressione fenotipica e genotipica del recettore VLA4: si osserva sia una riduzione della quantità di recettore esposto in superficie sia una sottoespressione del trascritto genico. Dopo la sospensione della terapia interferonica, si rileva come i cambiamenti nell'espressione fenotipica di VLA4 si protraggano oltre il mese di pausa terapeutica, periodo che generalmente intercorre tra la terapia con interferone e terapie di secondo livello come natalizumab. Un corretto monitoraggio della ricomparsa dopo terapia interferonica di VLA4 sulla superficie cellulare, potrebbe suggerire per ogni singolo soggetto il momento più adeguato per l'inizio di terapie di secondo livello che impieghino anticorpi specifici rivolti verso questo recettore .

Come osservato per i pazienti trattati con interferone β , la terapia con glatiramer acetato (GA) sembra indurre una bassa esposizione del recettore a

livello superficiale. Tale dato, non prevedibile in base al meccanismo di azione di questo farmaco, suggerisce una maggiore attenzione nella valutazione degli effetti collaterali di tale terapia. Se tali evidenze venissero confermate anche su un più ampio numero di pazienti, si potrebbero meglio definire i tempi di pausa terapeutica in quei soggetti che, dopo trattamento con GA, necessitano di terapie di secondo livello. I protocolli terapeutici al momento non prevedono tale interruzione.

La terapia con natalizumab, come atteso, riduce la disponibilità del recettore VLA4 libero in superficie. Natalizumab non modifica il numero di cellule presentanti il recettore ma, dopo un trattamento di almeno 12-18 mesi, sembra incrementare la trascrizione del gene VLA4 e di conseguenza il numero di recettori esposti sulla membrana. Il monitoraggio dei livelli di espressione di CD49d nei soggetti in terapia con natalizumab, una volta correlati con i dati clinici, inducono a pensare che la valutazione dei livelli di espressione fenotipica di Cd49d sulla superficie linfocitaria possa divenire un utile strumento per la stima dell'efficacia della terapia farmacologica.

Nei soggetti, identificati come non-rispondenti, si rileva una concentrazione di recettori VLA4 molto superiore a quella rilevata nei soggetti rispondenti. Quest'ultimo dato induce a pensare che un monitoraggio del numero di recettori cd49d, espressi a livello superficiale sulle popolazioni linfocitarie, possa rappresentare un possibile biomarker per la discriminazione tra soggetti sensibili o parzialmente o poco sensibili all'anticorpo monoclonale.

In futuro, al fine di identificare utili biomarker molecolari per la personalizzazione della terapia con natalizumab, ci si prefigge l'arruolamento di un numero statisticamente significativo di soggetti di controllo e di pazienti

con SM. Ci si propone inoltre di seguire nel tempo i soggetti sottoposti a trattamento con natalizuman, estendendo l'analisi anche ad altre popolazioni linfocitarie quali linfociti B e natural killer.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abbas. (2012). *Immunologia cellulare e molecolare*. (ELSEVIER, Ed.) (7a edizione).
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010;37:13-25.
- Agrawal S, Anderson P, Durbeek M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*; 203: 1007-1019
- Aharoni, R., Teitelbaum, D., Leitner, O., Meshorer, A., Sela, M., & Arnon, R. (2000). Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11472–11477. Retrieved from <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/97/21/11472>
- AIFA Agenzia Italiana del Farmaco. DETERMINAZIONE 7 dicembre 2006 - Regime di rimborsabilità e prezzo di vendita della specialità medicinale «Tysabri» (natalizumab). (Determinazione/C n. 115/2006). (GU n. 292 del 16-12-2006). 7-12-2006. (n.d.).
- Airas, L., Niemela, J., Yegutkin, G., & Jalkanen, S. (2007). Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1110(1), 641–648. doi:10.1196/annals.1423.067
- Antonetti, F., Finocchiaro, O., Mascia, M., Terlizze, M. G., & Jaber, A. (2002). A comparison of the biologic activity of two recombinant IFN- β preparations used in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Interferon Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* (Vol. 22, pp. 1181–1184).
- Arnon, R., Teitelbaum, D., & Sela, M. (1989). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by COPI- γ -relevance to multiple sclerosis. *Israel Journal of Medical Sciences* (Vol. 25, pp. 686–689). Retrieved from

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2533187

Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ. (2001). Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*; 286: 3083-3088

Ascherio A, Munger KL (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*; 61: 504-513

Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of Neurology*, 61(6), 504–513. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492755>

Awad, A., & Stüve, O. (2009). Cyclophosphamide in multiple sclerosis: scientific rationale, history and novel treatment paradigms. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 2(6), 50–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3002608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Barcellos, L F, Oksenberg, J. R., Begovich, A. B., Martin, E. R., Schmidt, S., Vittinghoff, E., Goodin, D. S., et al. (2003). HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *The American Journal of Human Genetics*, 72(3), 710–716. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1180245&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Barcellos, Lisa F, Sawcer, S., Ramsay, P. P., Baranzini, S. E., Thomson, G., Briggs, F., Cree, B. C. A., et al. (2006). Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 15(18), 2813–2824. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905561>

Bar-Or, A., Calabresi, P. A. J., Arnold, D., Markowitz, C., Shafer, S., Kasper, L. H., Waubant, E., et al. (2008). Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Annals of neurology* (Vol. 63, pp. 395–400). doi:10.1002/ana.21363

Bechmann I, Galea I, Perry VH (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*; 28: 5-11

- Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, et al. (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45:1353–60
- Begley DJ. (2004) Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther*;104:29–45
- Berger, J. ., & Kahlili, K. (2011). The pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Discovery medicine*, 12(67), 495–503.
- Brustad M, Sandanger T, Aksnes L, Lund E. (2004) Vitamin D status in a rural population of northern Norway with high fish liver consumption. *Public Health Nutr*; 7: 783–789
- Calabresi, P. A., Giovannoni, G., Confavreux, C., Galetta, S. L., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., et al. (2007). The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology*, 69(14), 1391–1403.
- Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 7861–7864
- Carton H, Vlietinck R, Debruyne J, De Keyser J, D’Hooghe MB, Loos R, Medaer R, Truyen L, Yee IM, Sadovnick AD (1997). Risks of multiple sclerosis in relatives of patients in Flanders, Belgium. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 62: 329–333
- Castro-Borrero, W., Graves, D., Frohman, T. C., Flores, A. B., Hardeman, P., Logan, D., Orchard, M., et al. (2012). Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 5(4), 205–20. doi:10.1177/1756285612450936
- Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters JA. Lanzavecchia (1997), Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*;388:782–787.
- Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*; 457: 722–725
- Chabas, D., Baranzini, S. E., Mitchell, D., Bernard, C. C., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Sobel, R. A., et al. (2001). The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune

demyelinating disease. *Science* (New York, N.Y.), 294(5547), 1731–1735.
doi:10.1126/science.1078985

- Chun, J., & Hartung, H.-P. (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clinical Neuropharmacology*, 33(2), 91–101. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2859693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Clegg A, Bryant J, Milne R (2000). Disease-modifying drugs for multiple sclerosis: a rapid and systematic review. *Health Technol.Assess.*;4(9):i-101.
- Codarri L, Gyölvéshi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B (2011). ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*; 12: 560-567
- Cohen, J. A., Coles, A. J., Arnold, D. L., Confavreux, C., Fox, E. J., Hartung, H.-P., Havrdova, E., et al. (2012). Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 6736(12), 1–10. doi:10.1016/S0140-6736(12)61769-3
- Coleman, I. C., Cook, R., Gade, J. N., Hum, D. S., Johnson, B., Maves, T., Mazanec, W. J., et al. (2004). Meeting the Challenge of Incorporating Injectable Biologics Into Managed Care: Multiple Sclerosis and Psoriasis, (June).
- Comabella, M., Craig, D. W., Morcillo-Suárez, C., Río, J., Navarro, A., Fernández, M., Martin, R., et al. (2009). Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Archives of neurology*, 66(8), 972–978. doi:10.1001/archneurol.2009.150
- Compston A, Coles A (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*; 372:1502-1517
- Compston A (1997). Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*; 62(6):553-61.
- Compston, a. (1999). The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354(1390), 1623–34.

- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*, 164(4), 1079–1086. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
- Cunningham, S., Graham, C., Hutchinson, M., Droogan, A., O'Rourke, K., Patterson, C., McDonnell, G., et al. (2005). Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN- β treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clinical pharmacology and therapeutics* (Vol. 78, pp. 635–646). doi:10.1016/j.clpt.2005.08.018
- De Jager PL, Rossin E, Pyne S, Tamayo P, Ottoboni L, Viglietta V, Weiner M, Soler D, Izmailova E, Faron-Yowe L, O'Brien C, Freeman S, Granados S, Parker A, Roubenoff R, Mesirov JP, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL (2008). Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain*; 131: 1701-1711
- Defer, G., Mariotte, D., Derache, N., Toutirais, O., Legros, H., Cauquelin, B., & Le Mauff, B. (2012). CD49d expression as a promising biomarker to monitor natalizumab efficacy. *Journal of the neurological sciences*, 314(1-2), 138–42. doi:10.1016/j.jns.2011.10.005
- Dhib-Jalbut, S. (2007). Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology*, 68(22 Suppl 3), S13–S21; discussion S43–S54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548563>
- Dhib-Jalbut, S., & Marks, S. (2010). Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 74 Suppl 1, S17–24. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97d99
- Dolei A, Garson JA, Arru G, Clerici M, Germi R, Marche PN, Perron H (2014). Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 266: 87-88
- Duquette P, Pleines J, Girard M, Charest L, Senecal-Quevillon M, Masse C (1992). The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can.J.Neurol.Sci.*;19(4):466-71.
- Durelli, L., Verdun, E., Barbero, P., Bergui, M., Versino, E., Ghezzi, A., Montanari, E., et al. (2002). Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet*, 359(9316), 1453–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988242>

- Dutta, R., & Trapp, B. D. (2011). Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*, 93(1), 1–12.
- Dyment, D. A., Ebers, G. C., & Sadovnick, A. D. (2004). Review Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 3(February), 104–110.
- Ebers, G. C. (1998, November 7). Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *The Lancet*. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673698033340>
- Ehninger, G., Proksch, B., Heinzl, G., & Woodward, D. L. (1986). Clinical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treatment Reports*, 70(12), 1373–1378. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3791250
- El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*; 12:568-575
- Engelhardt B (2008). The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Curr Pharm Des*; 14: 1555-1565
- Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*;28:138–145.
- Farina, C., Weber, M. S., Meinl, E., Wekerle, H., & Hohlfeld, R. (2005). Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet neurology*, 4(9), 567–75. doi:10.1016/S1474-4422(05)70167-8
- Farrell, R. A., & Giovannoni, G. (2007). Measuring and management of anti-interferon beta antibodies in subjects with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 13(5), 567–577.
- Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. (2008) B cells and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. ;7(9):852–858.
- Fischer HG, Reichmann G (2001). Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol*;166:2717–2726

- Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, Thompson AJ, Miller DH (2008). Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*; 131: 808-817
- Fox, E. J. (2006). Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clinical therapeutics*, 28(4), 461–74. doi:10.1016/j.clinthera.2006.04.013
- Fox, E. J., Vartanian, T. K., & Zamvil, S. S. (2007). The immunogenicity of disease-modifying therapies for multiple sclerosis: clinical implications for neurologists. *The neurologist*, 13(6), 355–362. doi:10.1097/NRL.0b013e318148c08e
- Fox, R. J., Kivisäkk, P., Lee, J.-C., Tucky, B., Lucchinetti, C., Rudick, R. A., & Ransohoff, R. M. (2006). Chemokine receptors as biomarkers in multiple sclerosis. *Disease Markers*, 22(4), 227–233. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17124344
- French AR, Yokoyama WM (2004). Natural killer cells and autoimmunity. *Arthritis Res Ther*; 6: 8-14
- Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010). Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 221: 7-14
- Gandhi, K. S., McKay, F. C., Schibeci, S. D., Arthur, J. W., Heard, R. N., Stewart, G. J., & Booth, D. R. (2008). BAFF is a biological response marker to IFN-beta treatment in multiple sclerosis. *Journal of interferon cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 28(9), 529–539. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18715196>
- Gasperini, C., & Ruggieri, S. (2012). Development of oral agent in the treatment of multiple sclerosis: how the first available oral therapy, fingolimod will change therapeutic paradigm approach. *Drug design, development and therapy*, 6, 175–86. doi:10.2147/DDDT.S8927
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918–934.
- Gold, R., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Tornatore, C., et al. (2012). Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 367(12), 1098–107. doi:10.1056/NEJMoal114287

- Gonsette, R. E. (2003). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: when and how to treat? *Journal of the neurological sciences*, 206(2), 203–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559512>
- Goodin, D. S., Frohman, E. M., Jr., G. P. G., Halper, J., Likosky, W. H., Lublin, F. D., Silberberg, D. H., et al. (2002). Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology*, 58(2), 169–178.
- Gorelik, L., Lerner, M., Bixler, S., Crossman, M., Schlain, B., Simon, K., Pace, A., et al. (2010). Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Annals of Neurology*, 68(3), 295–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20737510>
- Gourraud, P.-A., Harbo, H. F., Hauser, S. L., & Baranzini, S. E. (2012). The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological reviews*, 248(1), 87–103. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01134.x
- Graber, J., Zhan, M., Ford, D., Kursch, F., Francis, G., Bever, C., Panitch, H., et al. (2005). Interferon-beta-1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 161(1-2), 169–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748956>
- Greer, J. M., & Pender, M. P. (2008). Myelin proteolipid protein: an effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*, 31(3), 281–287. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502611>
- Gregory, S. G., Schmidt, S., Seth, P., Oksenberg, J. R., Hart, J., Prokop, A., Caillier, S. J., et al. (2007). Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature genetics*, 39(9), 1083–91. doi:10.1038/ng2103
- Grønning, M., Albrektsen, G., Kvåle, G., Moen, B., Aarli, J. A., & Nyland, H. (1993). Organic solvents and multiple sclerosis: a case-control study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 88(4), 247–250.
- Grossniklaus U, Kelly WG, Ferguson-Smith AC, Pembrey M, Lindquist S. Trans-generational epigenetic inheritance: how important is it? *Nat Rev Genet* (2013) 14:228–35

- Groves, A., Kihara, Y., & Chun, J. (2013). Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *Journal of the neurological sciences*, 328(1-2), 9–18. doi:10.1016/j.jns.2013.02.011
- Grunebaum E, Malatzky-Goshen E, Shoenfeld Y (1989). Natural killer cells and autoimmunity. *Immunol Res*; 8: 292-304
- Grytten N, Torkildsen Ø, Aarseth JH, Benjaminsen E, Celius EG, Dahl OP, Holmøy T, Løken-Amsrud K, Midgard R, Myhr KM, Risberg G, Vatne A, Kampman MT (2013). Month of birth as a latitude-dependent risk factor for multiple sclerosis in Norway. *Mult Scler*; 19: 1028-1034
- Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzsche, B., Falk, C. S., Filser, A., Vetter, T., et al. (2005). Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *European Journal of Immunology*, 35(11), 3343–3352. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16206232>
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivins AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. *N Engl J Med*; 357: 851-862
- Hafler, D. A., Slavik, J. M., Anderson, D. E., O'Connor, K. C., De Jager, P., & Baecher-Allan, C. (2005). Multiple sclerosis. *Immunological Reviews*, 204(1), 208–231. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00240.x
- Hallal-Longo, D. E. M., Mirandola, S. R., Oliveira, E. C., Farias, A. S., Pereira, F. G., Metze, I. L., Brandão, C. O., et al. (2007). Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in multiple sclerosis patients treated with IFN-β. *Journal of interferon cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 27(10), 865–873.
- Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, Vollmer TL, Campagnolo DI, Xiang R, La Cava A, Van Kaer L, Shi FD (2010). Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med*;207: 1907-1921
- Hatterer, E., Touret, M., Belin, M. F., Honnorat, J., Nataf, S., (2008). Cerebrospinal fluid dendritic

cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions. *PLoS One* 3, e3321.

Herberman RB (1989). Natural killer cells. *Prog Clin Biol Res*;288: 161-167

Hestvik AL (2010). The double-edged sword of autoimmunity: lessons from multiple sclerosis. *Toxins (Basel)*; 2: 856-877

Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG (1997). The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin.Proc.*;72(9):871-8.

Holmøy T, Hestvik AL (2008). Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr Opin Infect Dis*; 21: 271-278

Iii, F. A. W., Ishaq, M., Stoner, G. L., & Frisquel, R. J. (1992). samples from patients without progressive JC Virus DNA Is Present in Many Human Brain Samples from Patients without Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, 66(10).

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC); BushWS,Sawcer SJ, deJager PL, Oksenberg JR McCauley JL, et al(2010).Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis—the shape of things to come. *AmJHum Genet* 86:621–5.

Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., & Antel, J. P. (2005). Microglia and multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research*, 81(3), 363–73. doi:10.1002/jnr.20482

Jacobs LD, Wende KE, Brownschidle CM, Apatoff B, Coyle PK, Goodman A et al (1999). A profile of multiple sclerosis: the New York State Multiple Sclerosis Consortium. *Mult.Scler.*;5(5):369-76.

Jiang, H., Milo, R., Swoveland, P., Johnson, K. P., Panitch, H., & Dhib-Jalbut, S. (1995). Interferon β -lb reduces Interferon γ -induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *Journal of Neuroimmunology*, 61(1), 17–25. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0165-5728(95)00072-A

Jiang, W., Kang, L., Lu, H., Pan, X., Lin, Q., Pan, Q., Xue, Y., et al. (2004). Normal Values for CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets in Healthy Chinese Adults from Shanghai, 11(4), 811–813. doi:10.1128/CDLI.11.4.811

- Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J., Lisak, R. P., Myers, L. W., et al. (1995). Copolymer I reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, 45(7), 1268–1276. doi:10.1212/WNL.45.7.1268
- JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson, AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*; 476: 214-219
- Katz, D. A., & Bhatena, A. (2009). Overview of pharmacogenetics. *Current protocols in human genetics* / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.], Chapter 9, Unit 9.19. doi:10.1002/0471142905.hg0919s60
- Kaur G, Trowsdale J, Fugger L (2013). Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain*; 136: 2657-2676
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*; 13: 1173-1175
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Khan, O., Zabad, R., Caon, C., Zvartau-Hind, M., Tselis, A., & Lisak, R. (2002). Comparative assessment of immunomodulating therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 16(8), 563–578. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096936>
- Kimelberg HK (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist*;16:79–106.
- Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad*
- Koch, M. W., Metz, L. M., Agrawal, S. M., & Yong, V. W. (2013). Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 324(1-2), 10–6. doi:10.1016/j.jns.2012.10.021

- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*; 177: 566-573
- Kracke, A., Von Wussow, P., Al-Masri, A. N., Dalley, G., Windhagen, A., & Heidenreich, F. (2000). Mx proteins in blood leukocytes for monitoring interferon beta-1b therapy in patients with MS. *Neurology*, 54(1), 193–199. doi:10.1212/WNL.54.1.193
- Krumbholz, M., Faber, H., Steinmeyer, F., Hoffmann, L.-A., Kümpfel, T., Pellkofer, H., Derfuss, T., et al. (2008). Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain: A journal of neurology*, 131(Pt 6), 1455–1463. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474519>
- Laman, J.D., Weller, R.O., (2013). Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 840–856
- Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger L (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*; 3: 940-943
- Langer-Gould, A., Atlas, S. W., Green, A. J., Bollen, A. W., & Pelletier, D. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *The New England Journal of Medicine*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947078>
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*; 201: 233-240
- .Lee SJ, Drabik K, Van Wagoner NJ, Lee S, Choi C, Dong Y, Benveniste EN (2000). ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*; 165:4658–4666.
- Lee, M. A., Palace, J., Stabler, G., Ford, J., Gearing, A., & Miller, K. (1999). Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain: A journal of neurology*, 122 (Pt 2), 191–197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071048>

- Lemire JM, Archer DC (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*; 87: 1103-1107
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 678–689. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717539>
- Libbey, J. E., McCoy, L. L., & Fujinami, R. S. (2003). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *International Review of Neurobiology*, 349(2), 3–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455577>
- Lin, R., Charlesworth, J., Van der Mei, I., & Taylor, B. V. (2012). The genetics of multiple sclerosis. *Practical neurology*, 12(5), 279–88. doi:10.1136/practneurol-2012-000276
- Lindberg, R. L. P., Achtnichts, L., Hoffmann, F., Kuhle, J., & Kappos, L. (2008). Natalizumab alters transcriptional expression profiles of blood cell subpopulations of multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*, 194(1-2), 153–164. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.11.007
- Lindsey, J., Haden-Pinneri, K., Momn, N., & Bija, L. (2012). Sudden unexpected death on fingolimod. *Multiple sclerosis journal*, 10, 1–2.
- Liuzzi, G. M., Trojano, M., Fanelli, M., Avolio, C., Fasano, A., Livrea, P., & Riccio, P. (2002). Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Multiple sclerosis Houndmills Basingstoke England*, 8(3), 222–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120694>
- Lobb, R. R., & Hemler, M. E. (1994). The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 94(5), 1722–8. doi:10.1172/JCI117519
- Loma, I., & Heyman, R. (2011). Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Current neuropharmacology*, 9(3), 409–16. doi:10.2174/157015911796557911
- Lublin, F D, Lavasa, M., Viti, C., & Knobler, R. L. (1987). Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 45(1), 122–128.
- Lublin, Fred D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis : Result of an international survey. *Neurology*, 907–911.

- MA, Leppä V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero IL, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr KM, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Maciejek, Z., Wojcik-Draczkowska, H., Wawrzyniak, S., & Niezgodzinska-Maciejek, A. (2013). Evaluation of efficacy, safety and tolerability of fingolimod in patients with the relapsing form of multiple sclerosis – 12-month observation. A preliminary report. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 145–151. doi:10.5114/ninp.2013.34719
- Maghazachi AA, Al-Aoukaty A (1998). Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer. *FASEB J*; 12: 913-924
- Maghazachi AA (2000). Chemokines, G proteins and natural killer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*; 48: 65-72
- Maghazachi AA (2005). Compartmentalization of human natural killer cells. *Mol Immunol*; 42: 523-529
- Maghazachi AA (2003). G protein-coupled receptors in natural killer cells. *J Leukoc Biol*; 74: 16-24
- Maghazachi AA (2005). Insights into seven and single transmembrane-spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells. *Pharmacol Rev*; 57:339-357
- Maghazachi AA (2010). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol*; 341: 37-58
- Major, E. O. (2010). Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annual Review of Medicine*, 61(August 2009), 35–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719397>
- Marrie RA (2004). Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*; 3: 709-718
- Martin, R. (2008). Humanized anti-CD25 antibody treatment with daclizumab in multiple sclerosis. *Neuro-degenerative diseases*, 5(1), 23–26. doi:10.1159/000109934

- Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. (2013). Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 May 31;
- Martinelli, V., Radaelli, M., Straffi, L., Rodegher, M., & Comi, G. (2009). Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 30 Suppl 2, S167–70. doi:10.1007/s10072-009-0142-7
- Martyn CN, Cruddas M, Compston DA (1993). Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 56: 167-168
- Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasband MN, Olsson T, Moldenhauer A, Velhin S, Hohlfeld R, Meinl E, Linington C (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med*; 204: 2363-2372
- Matsumoto Y, Kohyama K, Aikawa Y, Shin T, Kawazoe Y, Suzuki Y, Tanuma N (1998). Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*; 28: 1681-1688
- Matyszak MK, Perry VH (1996). The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*;74:599–608.
- McDonnell GV, Hawkins SA (1996). Primary progressive multiple sclerosis: a distinct syndrome? *Mult.Scler.*;2(3):137-41.
- McFarland HF, Martin R (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*; 8: 913-919
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med*; 11: 335-339
- Mellergård, J., Edström, M., Vrethem, M., Ernerudh, J., & Dahle, C. (2010). Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 16(2), 208–217. doi:10.1177/1352458509355068

- Millonig, A., Hegen, H., Di Pauli, F., Ehling, R., Gneiss, C., Hoelzl, M., Künz, B., et al. (2010). Natalizumab treatment reduces endothelial activity in MS patients. *Journal of neuroimmunology*, 227(1-2), 190–194. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.012
- Mortensen, J. T., Brønnum-Hansen, H., & Rasmussen, K. (2002). Organic solvents and the risk of multiple sclerosis. *Epidemiology Cambridge Mass*, 9(2), 168–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504285>
- Mountain, A., & Adair, J. R. (1992). Engineering antibodies for therapy. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 10, 1–142. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/1301737>
- Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA (1994). The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*; 44: 11-15
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama The Journal Of The American Medical Association*, 296(23), 2832–8. doi:10.1001/jama.296.23.2832
- Nair A, Frederick TJ, Miller SD (2008). Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci*;65:2702–2720.
- National multiple sclerosis society. (n.d.). About Ms. What is MS? avliable at : <http://www.nationalmssociety.org/about-multiple-sclerosis/what-we-know-about-ms/what-is-ms/index.aspx>.
- Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferon-betas, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis. *J.Neurol.Sci.*;259(1-2):27-37.
- Neuhaus, O., Farina, C., Yassouridis, a, Wiendl, H., Then Bergh, F., Dose, T., Wekerle, H., et al. (2000). Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7452–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Niino, M., Bodner, C., Simard, M.-L., Alatab, S., Gano, D., Kim, H. J., Trigueiro, M., et al. (2006). Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* (Vol. 59, pp. 748–754). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16634035>
- Noseworthy, J. H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*, 399(6738 Suppl), A40–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392579>
- Nylander, A., & Hafler, D. A. (2012). Review series Multiple sclerosis. *Analysis*, 122(4), 1180–8. doi:10.1172/JCI58649.1180
- O'Connor, K. C., Appel, H., Bregoli, L., Call, M. E., Catz, I., Chan, J. A., Moore, N. H., et al. (2005). Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *The Journal of Immunology*, 175(3), 1974–1982. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034142>
- Olerup, O., & Hillert, J. (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*, 38(1), 1–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1926129>
- Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L (2007). Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*; 448: 474-479
- Pandya AD, Al-Jaderi Z, Høglund RA, Holmøy T, Harbo HF, Norgauer J, Maghazachi AA (2011). Identification of human NK17/NK1 cells. *PLoS One*; 6
- Pappas, D. J., & Oksenberg, J. R. (2010). Multiple sclerosis pharmacogenomics: maximizing efficacy of therapy. *Neurology*, 74 Suppl 1(1), S62–S69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20038765>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777–89. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
- Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G (1998). Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol*; 161: 5821-5824
- Petronis A (2010). Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* 465:721–7

- Polman, C., O'Connor, P., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D., Phillips, J., et al. (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 354(9), 899–910. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/192587/>
- Pozner RG, Berria MI, Negrotto S, Schattner M, Gomez RM (2005). Differential astrocyte response to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *Intervirology*;48:279–284.
- R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BA, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PI, Debouverie M, D'hooghe MB, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SF, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung HP, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone
- Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*; 3: 569-581
- Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*; 10: 514-523
- Rice, G. P. A., Hartung, H.-P., & Calabresi, P. A. (2005). Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology*, 64(8), 1336–1342. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15851719>
- Rinaldi, L., Perini, P., Calabrese, M., & Gallo, P. (2009). Cyclophosphamide as second-line therapy in multiple sclerosis: benefits and risks. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 30 Suppl 2, S171–3. doi:10.1007/s10072-009-0145-4

- Río, J., Comabella, M., & Montalban, X. (2009). Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology*, 5(10), 553–560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794514>
- Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DA (1996). WJEM|www.wjgnet.com 34 August 20, 2014|Volume 4|Issue 3| Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology*; 47: 347-352
- Rolin J, Maghazachi AA (2014). Implications of chemokines, chemokine receptors, and inflammatory lipids in atherosclerosis. *J Leukoc Biol*; 95: 575-585
- Rommer, P. S., Stüve, O., Goertsches, R., Mix, E., & Zettl, U. K. (2008). Monoclonal antibodies in the therapy of multiple sclerosis: an overview. *Journal of neurology*, 255 Suppl , 28–35. doi:10.1007/s00415-008-6006-x
- Rosati, G. (2001). The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 22(2), 117–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11603614>
- Rosicarelli B, Serafini B, Sbriccoli M, Lu M, Cardone F, Pocchiari M, Aloisi F (2005). Migration of dendritic cells into the brain in a mouse model of prion disease. *J Neuroimmunol*;165:114–120.
- Rückert IM, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PM, Smestad C, Sørensen PS, Søndergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen AM, Sundqvist E, Syvänen AC, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Rudick, R. a, Stuart, W. H., Calabresi, P. a, Confavreux, C., Galetta, S. L., Radue, E.-W., Lublin, F. D., et al. (2006). Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 354(9), 911–23. doi:10.1056/NEJMoa044396
- Runkel, L., Meier, W., Pepinsky, R. B., Karpusas, M., Whitty, A., Kimball, K., Brickelmaier, M., et al. (1998). Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharmaceutical research*, 15(4), 641–649.
- Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC, Risch NJ (1998). Effect of age at onset and parental disease status on sibling risks for MS. *Neurology*; 50: 719-723

- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci Schwid, S. R., Thorpe, J., Sharief, M., Sandberg-Wollheim, M., Rammohan, K., Wendt, J., Panitch, H., et al. (2005). Enhanced benefit of increasing interferon beta-1a dose and frequency in relapsing multiple sclerosis: the EVIDENCE Study. *Archives of Neurology* (Vol. 62, pp. 785–792). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15883267> Sci USA 2003; 100: 8389-8394
- Segal BM (2007). The role of natural killer cells in curbing neuroinflammation. *J Neuroimmunol*; 191: 2-7
- Serafini B, Columba-Cabezas S, Di RF, Aloisi F (2000). Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*; 157:1991–2002.
- Sheremata, W. A., Vollmer, T. L., Stone, L. A., Willmer-Hulme, A. J., & Koller, M. (1999). A safety and pharmacokinetic study of intravenous natalizumab in patients with MS. *Neurology* (Vol. 52, pp. 1072–1074). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102433>
- Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B (2011). Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 82: 1132-1141
- Simpson, S., Taylor, B., Blizzard, L., Ponsonby, A.-L., Pittas, F., Tremlett, H., Dwyer, T., et al. (2010). Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 68(2), 193–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20695012>

- Soilu-Hänninen, M., Laaksonen, M., Hänninen, A., Erälinna, J.-P., & Panelius, M. (2005). Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *Journal of neuroimmunology*, 167(1-2), 175–82. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.06.022
- Sørensen, P S, Deisenhammer, F., Duda, P., Hohlfeld, R., Myhr, K.-M., Palace, J., Polman, C., et al. (2005). Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 12(11), 817–827.
- Sørensen, Per Soelberg, Bertolotto, A., Edan, G., Giovannoni, G., Gold, R., Havrdova, E., Kappos, L., et al. (2012). Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 18(2), 143–52. doi:10.1177/1352458511435105
- Sospedra, M., & Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 23, 683–747. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*;161:1083–1086.
- Sriram, U., Barcellos, L. F., Villoslada, P., Rio, J., Baranzini, S. E., Caillier, S., Stillman, A., et al. (2003). Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes and immunity* (Vol. 4, pp. 147–152). doi:10.1038/sj.gene.6363946
- Steinman L (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*; 13: 139-145
- Steinman L (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*; 2: 762-764
- Steinman, L. (2009). The gray aspects of white matter disease in multiple sclerosis, 106(20), 8083–8084.
- Stohl, W., Metyas, S., Tan, S.-M., Cheema, G. S., Oamar, B., Xu, D., Roschke, V., et al. (2003). B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus:

longitudinal observations. *Arthritis & Rheumatism*, 48(12), 3475–3486. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673998>

Suter T, Biollaz G, Gatto D, Bernasconi L, Herren T, Reith W, Fontana A (2003). The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol*;33:2998–3006.

Svejgaard A (2008). The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*; 60: 275-286

Svejgaard, A. (1996). MHC and disease associations. Weir's handbook of experimental immunology in four volumes, 5th edn. Blackwell Scientific, chapter 37, 37.1–37.13.

Svejgaard, Arne. (2008). The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*, 60(6), 275–86. doi:10.1007/s00251-008-0295-1

Thompson, A. (1996). Multiple sclerosis: Symptomatic treatment. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 35(3), 1141–1153. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/147220/>

Thöne, J., & Gold, R. (2011). Laquinimod: a promising oral medication for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 7(3), 365–370. doi:10.1517/17425255.2011.556618

Troiano, R., Cook, S. D., & Dowling, P. C. (1987). Steroid therapy in multiple sclerosis. Point of view. *Archives of Neurology* (Vol. 44, pp. 803–807). Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2820358

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*; 172: 146-155

Vallittu, A., Saraste, M., & Airas, L. (2007). CCR7 expression on peripheral blood lymphocytes is up-regulated following treatment of multiple sclerosis with interferon-beta. *Neurol Res*, 29, 763–766.

Van Assche, G., Van Ranst, M., Sciot, R., Dubois, B., Vermeire, S., Noman, M., Verbeeck, J., et al. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947080>

- Vargas, W. S., & Perumal, J. S. (2013). Fingolimod and cardiac risk: latest findings and clinical implications. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 4(3), 119–124.
doi:10.1177/2042098613481023
- Vennegoor, A., Rispens, T., Strijbis, E. M., Seewann, A., Uitdehaag, B. M., Balk, L. J., Barkhof, F., et al. (2013). Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 19(5), 593–600. doi:10.1177/1352458512460604
- Vermersch, P., Kappos, L., Gold, R., Foley, J. F., Olsson, T., Cadavid, D., Bozic, C., et al. (2011). Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. AAN Enterprises, Inc. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576685>
- Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CN, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg
- Wang, M. J., Jeng, K. C. G., Kuo, J. S., Chen, H. L., Huang, H. Y., Chen, W. F., & Lin, S. Z. (2004). Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. *Journal of Neuroimmunology*, 151(1-2), 171–179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15145615>
- Wang, X., Chen, M., Wandinger, K. P., Williams, G., & Dhib-Jalbut, S. (2000). IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 165(1), 548–557. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861095>
- Warnke, C., Meyer zu Hörste, G., Hartung, H.-P., Stüve, O., & Kieseier, B. C. (2009). Review of teriflunomide and its potential in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 5, 333–340.
- Warren, K. G., & Catz, I. (1993). Autoantibodies to myelin basic protein within multiple sclerosis central nervous system tissue. *Journal of the Neurological Sciences*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683331>

- Waubant, E., Goodkin, D. E., Gee, L., Bacchetti, P., Sloan, R., Stewart, T., Andersson, P. B., et al. (1999). Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology*, 53(7), 1397–1401. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534241>
- Weber, M. S., Hohlfeld, R., & Zamvil, S. S. (2007). Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(4), 647–53. doi:10.1016/j.nurt.2007.08.002
- Weiner, H., & Cohen, J. (2002). Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Multiple Sclerosis*, 8(2), 142–154. doi:10.1191/1352458502ms790oa
- Weinstock-Guttman, B., Bhasi, K., Badgett, D., Tamaño-Blanco, M., Minhas, M., Feichter, J., Patrick, K., et al. (2008). Genomic effects of once-weekly, intramuscular interferon-beta treatment after the first dose and on chronic dosing: Relationships to 5-year clinical outcomes in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology* (Vol. 205, pp. 113–125). doi:10.1016/j.jneuroim.2008.09.004
- Weissert, R. (2013). The Immune Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. doi:10.1007/s11481-013-9467-3
- Welter D, MacArthur J, Morales J, Burdett T, Hall P, Junkins H, et al (2014). The NHGRI GWAS Catalog a curated resource of SNP-trait associations. *NucleicAcidsRes*
- Willer CJ, Dymant DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2003). Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: 12877-12882
- Wu L, Liu YJ (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*;26:741–750
- Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T (2005). Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*; 163: 24-30
- Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH (2006). Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res*; 36: 13-25

- Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., & Karin, N. (1992). Prevention of Experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4 \beta 1$ integrin. *Nature*, 356(6364), 63–66. doi:10.1038/356063a0
- Yousry, T. A., Major, E. O., Ryschkewitsch, C., Fehle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., et al. (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England Journal of Medicine*, 354(9), 924–933. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/151803/>
- Yu, Y., Schürpf, T., & Springer, T. a. (2013). How Natalizumab Binds and Antagonizes $\alpha 4$ Integrins. *The Journal of biological chemistry*. doi:10.1074/jbc.M113.501668
- Zappulla, J. P., Arock, M., Mars, L. T., & Liblau, R. S. (2002). Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *Journal of Neuroimmunology*, 131(1-2), 5–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458032>