



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
NEUROSCIENZE

CICLO XXX

FENOTIPO E POLIFUNZIONALITA' DELLE CELLULE INKT NELLE VARIE FORME DI SCLEROSI MULTIPLA ED IN CORSO DI TERAPIE IMMUNOMODULANTI

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Vittorio Gallese

RELATORE:

Chiar.mo Prof. Paolo Nichelli

CORRELATORE:

Chiar.mo Prof. Andrea Cossarizza

Dottorando: Dr.ssa Anna Maria Simone

Anni accademici 2014/2017

ABSTRACT

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica, demielinizzante e neurodegenerativa del sistema nervoso centrale (SNC), la cui eziologia resta ad oggi sconosciuta, anche se è ben stabilito che una alterazione della risposta immunitaria giochi un ruolo critico nella neuropatogenesi della malattia. Sebbene la risposta immunitaria adattiva mediata dai linfociti T e B sia stata molto studiata nelle diverse forme di malattia, non sono stati ancora individuati dei marcatori immunologici in grado di aiutare a predirne il decorso. Oltre all'immunità adattativa anche l'immunità innata sembra essere sempre più implicata nella patogenesi della SM.

Recenti studi scientifici sostengono il coinvolgimento attivo di cellule funzionalmente a ponte tra l'immunità adattiva e quella innata, tra cui le cellule T natural killer invarianti o iNKT, nel regolare le risposte autoimmuni. Nei pazienti con SM è stata descritta un'alterazione del numero e dell'attività di queste cellule, tuttavia gli studi condotti fino ad oggi restano esigui e spesso con risultati contrastanti.

Lo scopo dello studio è stato di chiarire se le modificazioni fenotipiche delle cellule iNKT possano essere correlate alle differenze cliniche osservate nei pazienti con diverse forme di SM, alla diversa risposta alle terapie immunomodulanti e all'andamento della malattia. In particolare, mediante il metodo rigoroso basato sulla citometria a flusso policromatica abbiamo valutato la presenza di eventuali differenze nel fenotipo delle cellule iNKT e delle principali sottopopolazioni (CD4+, CD8+, CD161++) in pazienti con diverse forme di SM, in pazienti con SM recidivante-remittente (RR) non trattati con DMT ed in pazienti con SM-RR in trattamento da almeno sei mesi con tali farmaci. I dati immunologici sono stati quindi correlati con i più importanti parametri clinici. Inoltre è stata valutata la produzione di citochine da parte delle iNKT circolanti dopo stimolazione (polifunzionalità). Infine abbiamo valutato se i trattamenti immunomodulanti siano in grado di modificare la frequenza e il fenotipo delle cellule iNKT nei pazienti affetti da SM, confrontando i dati ottenuti dai parametri immunologici prima di iniziare il trattamento con quelli ottenuti dopo 6 e 12 mesi di terapia.

Sono stati arruolati in totale 165 pazienti con varie forme di SM e 55 controlli sani. Da un prelievo di sangue venoso sono state identificate le iNKT mediante la citometria a flusso e analizzate nel fenotipo. Inoltre, in un campione rappresentativo di 55 pazienti è stata

analizzata la capacità di produzione simultanea di diverse citochine (IL-17, TNF- α , IFN- γ , and IL-4) dopo stimolazione in vitro.

La frequenza delle iNKT è risultata simile nei pazienti con diverse forme e trattamenti di SM; tra le caratteristiche funzionali è emersa una deviazione T helper (Th)1/Th17, più marcata nei pazienti con forma secondaria progressiva (SP) di malattia. Tra i DMT, è emerso che il natalizumab modula una riduzione delle iNKT che producono citochine Th1 e Th17, inibendo la loro azione pro-infiammatoria.

In questo studio abbiamo dimostrato che non vi è una differenza nel fenotipo delle cellule iNKT totali di pazienti affetti da varie forme di SM ed in corso dei vari trattamenti immunomodulanti; mentre lo studio della polifunzionalità ha permesso di evidenziare che nei pazienti con forma SP le iNKT esprimono un aumento di produzione citochinica del tipo Th1. Questo suggerisce che queste forme di malattia sono caratterizzate da un'attivazione continua delle iNKT e da un'inclinazione verso un fenotipo pro-infiammatorio costante. Inoltre, nei pazienti con decorso RR e sottoposti a terapia con natalizumab, le iNKT producono meno citochine Th1 e Th17 rispetto che nei pazienti trattati con gli altri DMT, e questo dato potrebbe suggerire un ulteriore meccanismo di azione per questo farmaco molto efficace nella SM.

ABSTRACT IN INGLESE

Multiple sclerosis (MS) is a chronic progressive inflammatory demyelinating and neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS), and is presumed to be an autoimmune disease. However, how this process is generated and controlled by components of the immune system is unclear.

The immune cells participating in MS pathogenesis comprise B cells, CD4+, CD8+ and regulatory T cells, as well as innate immunity cells.

Although adaptive immunity is clearly involved in multiple sclerosis pathogenesis, innate immunity increasingly appears to be implicated in the disease.

These include invariant natural killer T (iNKT) cells, a small population of lymphocytes that express a semi-invariant Va24-Ja18 T cell receptor (TCR) and natural killer cell markers, and are a specialized subset of ab T cells that use their T cell receptors to recognize self and foreign lipids presented by CD1d as cognate antigen. iNKT cells have been shown to mediate both protective and regulatory immune functions through a rapid production of cytokines.

Several studies have reported numerical and functional iNKT cell defects in MS, and it is yet not clear whether they exert a protective or a pro-inflammatory and harmful role; moreover, a detailed characterization of iNKT cell phenotype and functionality in different forms of MS and during treatment with distinct disease modifying therapies (DMTs) has never been reported.

Aim of our study was to evaluate the amount of iNKT in different forms of MS and following treatment with different immunomodulatory drugs, and to characterize their phenotype and functional activities in a cross-sectional study. In a longitudinal study we evaluated modifications in the amount of iNKT following initiation of DMTs, in a sub-group of patients who were followed up for one year.

Immunological parameters were correlated with demographic and clinical data in all patients. Response to treatment was assessed on the basis of clinical and MRI activity.

One hundred sixty-five MS patients and 55 healthy controls were enrolled in this study. We characterized circulating iNKT cells (CD4+, CD8+, CD161++) and analyzed their cytokine production after *in vitro* stimulation (IL-17, TNF- α , IFN- γ , and IL-4).

The frequency of iNKT cells was similar among patients with different forms and treatments of MS, but a T helper (Th) 1/Th17 cytokine bias were observed in MS patients.

This was most prominent in SP patients, who displayed an increased production of interleukin (IL)-17 by CD4⁺ and CD8⁺ iNKT cells, suggesting that this form is characterized by sustained iNKT cell activation and skewing towards a steady pro-inflammatory phenotype.

Furthermore, natalizumab (a monoclonal antibody targeting $\alpha 4\beta 1$ integrin) modulated a reduction in iNKT cells producing Th1 and Th17 cytokines, seeming to inhibit their pro-inflammatory action.

INDICE

ABSTRACT	2
ABSTRACT IN INGLESE	4
INDICE DELLE ABBREVIAZIONI PIÙ IMPORTANTI	8
PREMESSA	9
1. INTRODUZIONE GENERALE	11
1.1. Caratteristiche generali della Sclerosi Multipla	11
1.1.1. Epidemiologia	11
1.1.2. Eziopatogenesi e fattori di rischio	12
1.1.2.1. Fattori genetici.....	12
1.1.2.2. Fattori ambientali	13
1.1.3. Caratteristiche cliniche, decorso e diagnosi e di malattia	17
1.1.4. Terapie.....	21
1.1.5. Aspetti anatomo-patologici della Sclerosi Multipla.....	27
1.2. Patogenesi della Sclerosi Multipla: il ruolo dell'immunità adattiva e innata e delle cellule invarianti natural killer (iNKT)	32
1.2.1. Ipotesi sulla patogenesi autoimmune	32
1.2.2. Ruolo dell'Immunità nella Sclerosi Multipla.....	33
1.2.2.1. Immunità adattiva.....	33
1.2.2.2. Immunità innata.....	37
1.2.3. Le cellule a ponte tra l'immunità innata ed adattativa: le cellule T natural killer (NKT) e il sottotipo invariante (iNKT)	40
1.2.3.1. Cellule T Natural Killer (NKT).....	40
1.2.3.2. Cellule T Natural Killer invarianti (iNKT)	41
1.2.3.3. iNKT e Sclerosi Multipla	44
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	47
3. MATERIALI E METODI	49
3.1. Selezione dei pazienti.....	49
3.2. Raccolta dei dati clinici	50
3.2.1. Studio trasversale “cross-sectional”	50

3.2.2. Studio longitudinale	50
3.3. Procedure di laboratorio	51
3.3.1. Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico e citometria a flusso policromatica	51
3.3.2. Produzione in vitro di citochine da parte delle cellule iNKT	52
3.4. Analisi statistiche	53
4. RISULTATI	54
4.1. Popolazione in esame	54
4.2. Identificazione delle cellule NKT invariante	56
4.3. Il fenotipo delle cellule NKT invariante cambia nei pazienti con diverse forme di sclerosi multipla	56
4.4. Produzione di citochine da parte dei vari sottotipi cellulari di iNKT	57
4.5. I pazienti con SM secondaria progressiva hanno percentuali superiori di cellule T natural killer invariante in grado di produrre IL-17	59
4.6. Il Natalizumab spegne la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule T natural killer invariante	60
4.7. IFN e GA non inducono modificazioni fenotipiche delle cellule NKT invariante dopo 6 e 12 mesi di terapia.....	61
4.8. Correlazioni tra dati clinici ed immunologici.....	61
5. DISCUSSIONE	63
5.1. Popolazione di studio	63
5.2. Dati immunologici.....	64
6. CONCLUSIONI	70
7. BIBLIOGRAFIA.....	73
8. FIGURE E TABELLE	105
9. RINGRAZIAMENTI	120

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI PIÙ IMPORTANTI

SM	sclerosi multipla
SM-RR	sclerosi multipla recidivante remittente
SM-PP	sclerosi multipla primariamente progressiva
SM-SP	sclerosi multipla secondariamente progressiva
CIS	sindrome clinicamente isolata
RIS	sindrome radiologicamente isolata
EAE	encefalomielite autoimmune sperimentale
SNC	sistema nervoso centrale
BEE	barriera emato-encefalica
DMTs	disease modifying therapies
EDSS	“Kurtzke’s Expanded Disability Severity Score”
ARR	“annualized relapse rate”
MSS	“MS Severity Score”
RM	risonanza magnetica dell’encefalo
Gd+	gadolinio
IFN	interferone
GA	glatiramer acetato
NAT	natalizumab
IL-	interleuchine
T-reg	cellule T regolatorie
NK	cellule Natural killer
NKT	cellule T Natural killer
iNKT	cellule NKT invariati
DN	cellule doppiamente negative per il <i>CD4</i> e <i>CD8</i>
TCR	“T cell receptor”, recettore tipico dei linfociti T
MHC	complesso maggiore di istocompatibilità
APC	cellule presentanti l’antigene
TNF- α :	fattore di necrosi tumorale- α
IFN- β :	interferone - β
IFN- γ :	interferone - γ
TGF- β :	“transforming growth factor - β

PREMESSA

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica, demielinizzante e neurodegenerativa del Sistema Nervoso Centrale (SNC), la cui eziologia resta ad oggi sconosciuta, sebbene sia ben stabilito che l'alterazione della risposta immunitaria giochi un ruolo critico nella patogenesi della malattia. La manifestazione clinica è infatti il risultato di fenomeni d'invasione di cellule infiammatorie nel SNC, con conseguenti demielinizzazione, edema e danno assonale^{1,2}.

Si tratta di una patologia a decorso imprevedibile che colpisce i giovani adulti, soprattutto donne, nel pieno delle potenzialità della vita professionale, affettiva e sociale. L'estrema variabilità del quadro clinico e del decorso della SM a livello inter/intra-individuale non consente di prevedere le conseguenze a lungo termine rispetto all'autonomia e alla qualità della vita delle persone ammalate. Il decorso della malattia nelle forme tipiche è caratterizzato da una prima fase a ricadute e remissioni, con recupero totale o parziale del deficit neurologico, seguita, dopo un numero variabile di anni, da una seconda fase con decorso progressivo e accumulo di disabilità.

E' tuttora molto discusso il ruolo che rispettivamente rivestono le due componenti di infiammazione e neurodegenerazione nella eziopatogenesi della malattia e nell'accumulo di disabilità: la maggior parte dei ricercatori sostiene che, almeno nelle forme recidivanti-remittenti (RR), l'infiammazione acuta sia il processo patologico predominante, mentre nelle forme progressive di malattia prevalgono processi di tipo neurodegenerativo.

Negli ultimi 20 anni le conoscenze nel campo della neuroimmunologia e dei numerosi passaggi che, nell'ambito della cascata immunitaria, contribuiscono allo sviluppo della SM, hanno consentito di mettere in campo diverse ed efficaci terapie mirate a contrastare ed a rallentare il decorso, seppur non ancora in grado di far "guarire" dalla malattia. Le terapie attualmente disponibili per la SM sono in grado di agire quasi esclusivamente sulla componente infiammatoria, e meglio nelle fasi iniziali della malattia. Al contrario, quando i meccanismi neurodegenerativi sono preminenti, nelle forme progressive di malattia, nessuna delle terapie attualmente conosciute ha dimostrato una reale efficacia.

I dati di letteratura concordano sul fatto che l'instaurare una terapia precoce e mirata porti benefici sull'accumulo di disabilità a lungo termine. Tuttavia, sarebbe utile poter discriminare, già alla diagnosi, i pazienti con forme aggressive di malattia, nei quali sarebbe indicata una terapia precoce, da quelli invece, con forme lievi, nei quali potrebbe essere discussa una condotta di attesa.

Il progredire della tecnologia e della ricerca neuroimmunologica potrebbe condurre anche all'individuazione di marcatori prognostici di malattia, di cruciale importanza sia per il paziente, che vuole conoscere e pianificare il più possibile il suo futuro, sia per aiutare il medico nella scelta e tempistica delle risorse terapeutiche da mettere in atto e per valutarne l'efficacia o gli effetti negativi che possono causare.

In base a queste premesse, l'identificazione di marcatori diagnostici e prognostici rappresenta uno degli obiettivi più ambiziosi e cruciali nell'ambito della ricerca scientifica su questa invalidante patologia. Purtroppo, allo stato attuale delle conoscenze, un chiaro e condiviso marcatore di prognosi, non è stato ancora individuato, anche se diversi aspetti clinici, radiologici e laboratoristici possono fornire una previsione sulla severità di malattia.

Sebbene sia accertato il ruolo patogenetico dei meccanismi autoimmuni nella SM e la risposta immunitaria adattiva, mediata dai linfociti T e B, sia stata molto studiata nelle diverse forme di malattia, non sono stati ancora individuati marcatori immunologici in grado di aiutare a predirne il decorso. Oltre all'immunità adattativa, anche l'immunità innata sembra essere sempre più implicata nella patogenesi della SM. Infatti, recenti studi scientifici sostengono il coinvolgimento attivo di cellule funzionalmente “a ponte” tra l'immunità adattiva e quella innata, chiamate “innate-like”, tra cui spiccano le cellule T natural killer invariati o iNKT, nel regolare le risposte autoimmuni. Nei pazienti con SM è stata descritta un'alterazione del numero e dell'attività di queste cellule, tuttavia gli studi condotti fino ad oggi restano esigui e spesso con risultati contrastanti.

Con il presente studio ci si propone di chiarire se le modificazioni fenotipiche delle cellule iNKT siano correlate alle differenze cliniche osservate nei pazienti con diverse forme di Sclerosi Multipla, alla diversa risposta alle terapie immunomodulanti e all'andamento della malattia.

Tali informazioni potrebbero aiutare ad identificare diversi profili immunologici di malattia e ad individuare possibili marcatori predittivi di decorso, aiutare nella scelta e tempistica delle risorse terapeutiche da mettere in atto, per valutarne l'attività biologica, l'efficacia o i danni che possono causare, ed a selezionare meglio gli interventi terapeutici sui pazienti.

1. INTRODUZIONE GENERALE

1.1. Caratteristiche generali della Sclerosi Multipla

1.1.1. Epidemiologia

La Sclerosi Multipla rappresenta la causa più comune di disabilità nei giovani adulti dopo i traumi. Nella maggior parte dei casi colpisce giovani adulti, nel pieno delle potenzialità della loro vita professionale, affettiva e sociale. L'esordio avviene in genere tra i 20 e 40 anni, nella maggior parte dei casi in modo acuto o subacuto, con sintomi e segni neurologici variabili, espressione di danno mono-multifocale del SNC. Come tutte le malattie autoimmuni, la SM è più frequente negli individui di genere femminile: si stima che il 70% di tutti i pazienti con SM sia donna. Fa eccezione la forma primaria progressiva che interessa con la medesima frequenza i due sessi³. Approssimativamente nel 3-5% dei casi la SM esordisce prima dei 16 anni ed in genere si presenta con decorso recidivante –remittente (RR) ed alto tasso di ricadute (1-1,9 ricadute/anno)⁴.

Nel mondo ci sono circa 2,3 milioni di persone affette da SM, di cui circa 600.000 in Europa. La distribuzione della malattia non è uniforme: molti studi epidemiologici hanno evidenziato come essa sia più diffusa nelle zone lontane dall'equatore a clima temperato, seguendo un gradiente di latitudine. La prevalenza è infatti pari a 100-190 su 100.000 abitanti nei paesi nordeuropei, USA, Canada e Nuova Zelanda, mentre scende a 2-25 su 100.000 abitanti in Asia, Africa e Sud America⁵ (**Figura 1.1.**).

Nel panorama europeo, l'Italia si colloca in una posizione intermedia e viene identificata come una delle zone ad alto rischio per questa patologia. Nel nostro Paese vi sono circa 113.000 persone con SM e sono riportati tassi di prevalenza medi di circa 193 casi per 100.000 abitanti (con eccezione della Sardegna in cui sono stimati 360 casi per 100.000 abitanti) e tassi d'incidenza medi di 5-6 nuovi casi all'anno ogni 100.000 persone (più di 3.400 nuovi casi l'anno), con notevoli differenze tra le diverse regioni (per la Sardegna l'incidenza media è di 12 nuovi casi per 100.000 persone all'anno)⁶. Negli ultimi decenni il trend è sicuramente in crescita; ciò è confermato anche da numerosi studi condotti in tal senso^{7,8}.

Nella nostra regione, considerando che la popolazione dell'Emilia Romagna è di oltre 4.400.000 di abitanti (stima ISTAT all'01-01-2017), è possibile stimare una prevalenza di circa 8000 casi di SM con un'incidenza stimata di 245 nuovi casi/anno.

Le persone con SM convivono per decenni con la malattia, che può determinare una disabilità progressiva. Al momento della diagnosi circa l'80%-85% delle persone manifesta una forma detta a ricadute-remissioni (RR), mentre un 10-15% circa presenta una forma progressiva all'esordio (primaria progressiva, PP)⁹. Il 65% circa delle forme a ricaduta e remissione sviluppa una forma progressiva (secondaria progressiva, SP) dopo un periodo di tempo variabile¹⁰.

1.1.2. Eziopatogenesi e fattori di rischio

L'etiologia della SM è tuttora sconosciuta, ma, come altre patologie a patogenesi autoimmune dell'uomo, spesso croniche, ha basi eziologiche complesse, dove sia la suscettibilità genetica, che fattori di rischio ambientali, rivestono entrambi ruoli fondamentali.

1.1.2.1. Fattori genetici

Nonostante la SM si manifesti sporadicamente e non sia pertanto una malattia genetica in senso classico, la diversa distribuzione geografica della malattia, l'esistenza di aggregati familiari di pazienti e l'associazione tra determinati aplotipi HLA e geni di suscettibilità suggeriscono un ruolo importante dei fattori di rischio genetico nella eziopatogenesi della malattia.

In particolare, studi su famiglie e su gemelli hanno evidenziato che, rispetto alla popolazione generale in cui vi è un rischio stimato di malattia dello 0,2%, nei familiari di pazienti affetti da SM il rischio sale al 3% nei parenti di primo grado e all'1% in quelli di secondo grado². Studi molto importanti sui gemelli, riportano una concordanza di circa il 25% nei monozigoti, del 5,4% nei dizigoti e del 2,9% nei fratelli non gemelli^{11,12}. Per converso, figli adottati e fratellastri hanno un rischio di sviluppo della malattia pari a quello della popolazione generale^{13,14}.

Tutti questi studi orientano verso una predisposizione poligenica alla malattia, piuttosto che una ereditarietà di tipo mendeliano, ma i geni specifici implicati rimangono ancora sconosciuti⁵. Anche le analisi genotipiche e fenotipiche hanno evidenziato che la

suscettibilità è mediata da un insieme eterogeneo di geni che interagiscono in maniera epistatica. In questo tipo d'interazione il genotipo di un *locus* influenza l'espressione fenotipica del genotipo di un altro *locus*.

Per quanto riguarda l'associazione con gli aplotipi HLA situati all'interno della regione principale del complesso di istocompatibilità (MHC), gli studi di popolazione^{15, 16, 17,18}, hanno dimostrato che nei pazienti caucasici affetti da SM vi è un'associazione con gli alleli di classe II DRB1*1501, DRB5*0101 e DQB1*0602 dell'MCH, situati sul cromosoma 6p21¹⁹. Questi alleli sono tutti presenti nell'aplotipo DR2. Il locus HLA-DRB1, altamente polimorfico, è responsabile di circa il 10,5% della variabilità genetica sottesa al rischio di malattia^{20,21}. Altri loci conferiscono invece un effetto protettivo, in particolare HLA-A* 02²², HLA-Cw* 5²³, HLA-B* 44²⁴, HLA-DRB1* 14 e HLA-DRB1* 11²⁵. Inoltre, sono state stabilite più di 100 varianti alleliche non relate alle molecole MHC²².

Gli studi di associazione genome-wide (GWAS) costituiscono un approccio alternativo alle analisi di linkage classiche e hanno un notevole potere statistico nell'individuare varianti alleliche responsabili di un rischio di malattia moderato. Il primo studio GWA nella SM ha identificato un'associazione tra aumento della suscettibilità alla patologia e una variante dei loci *Interleukin-2 Receptor a* (IL2RA) e *Interleukin-7 Receptor a* IL7RA²⁶. Tali geni sono di particolare interesse, poiché sono implicati nella modulazione della risposta immunitaria nella SM²⁷. Successivi studi GWA hanno identificato più di 100 ulteriori varianti alleliche²⁸, prevalentemente associate a geni relativi al sistema immunitario e coinvolti nella differenziazione, proliferazione e attivazione linfocitaria, vie citochiniche, produzione di molecole co-stimolatorie e trasduzione di segnali²⁹. La maggior parte dei loci associati a maggior suscettibilità per SM e correlati al sistema immunitario sono gli stessi individuati anche in altre patologie autoimmuni, e ciò suggerisce la presenza di meccanismi patogenetici simili alla base di diverse malattie autoimmuni^{30, 31}. Dato che le varianti alleliche dei geni HLA spiegano tra il 15 ed il 40% del rischio di associazione con la SM ed i loci non MHC spiegano meno dell'1% di tale rischio, si deduce che molti altri fattori genetici rimangono ancora da definire³².

1.1.2.2. Fattori ambientali

La suscettibilità genetica spiega l'aggregazione dei casi di SM nelle famiglie e la diminuzione del rischio con l'aumentare della distanza genetica; tuttavia, non è in grado di spiegare in modo completo la diversa distribuzione geografica della SM e le variazioni di

rischio che si verificano con i **flussi migratori**. Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che esiste un gradiente nord-sud ed est-ovest: in particolare la prevalenza della malattia aumenta con la latitudine, probabilmente in associazione ai livelli di esposizione alla radiazione ultravioletta³³. Studi ormai storici sulle migrazioni³⁴ hanno evidenziato che la migrazione prima della pubertà (circa 15 anni) da un'area a basso rischio di malattia verso un'area ad alto rischio e viceversa determina l'acquisizione del rischio della 'popolazione di adozione'³⁵. Viceversa, se la migrazione da aree a basso rischio a zone ad alto rischio avviene dopo i 15 anni di età, il rischio rimane quello del paese di origine³⁶⁻³⁸.

Gli studi epidemiologici e sui flussi migratori, così come l'irregolare distribuzione geografica della SM sostengono l'ipotesi che un fattore ambientale possa giocare un ruolo cruciale nello sviluppo della SM. Tali fattori ambientali comprendono sia agenti infettivi che non infettivi.

Tra gli agenti non infettivi, emerge un possibile ruolo **dell'esposizione alla luce solare** in giovane età come fattore di rischio per SM: l'epidemiologia della SM è infatti fortemente correlata alla durata e all'intensità delle radiazioni UV solari³⁹, che rappresentano la principale fonte di vitamina D in numerose popolazioni⁴⁰.

La pregressa esposizione alla luce solare è stata riconosciuta già da tempo come inversamente correlata alla suscettibilità alla SM⁴¹.

Più di recente è cresciuto un particolare interesse sul possibile ruolo anche della **vitamina D**, come mediatore dell'effetto della luce solare sulla SM. Una carenza di vitamina D potrebbe rappresentare un cofattore nel rischio di contrarre la SM ed è stato suggerito che alti livelli di vitamina D possono ridurre il rischio di sviluppare la malattia^{42,43,42,44}. In particolare, gli elevati livelli di vitamina D circolanti sembrano essere associati ad un rischio minore di sviluppare la SM negli adulti bianchi sani⁴³ e l'elevato consumo di pesci grassi, una ricca fonte di vitamina D dalla dieta, sembra fornire protezione contro il rischio di SM nelle popolazioni situate ad elevate latitudini⁴⁵. Inoltre, nell'emisfero settentrionale, il rischio di sviluppare SM è maggiore per gli individui nati nel mese di maggio e inferiore per quelli nati nel mese di novembre, suggerendo un'associazione con l'esposizione alla luce del sole e la carenza di vitamina D nelle donne gravide durante l'inverno⁴⁶. L'azione della vitamina D sarebbe principalmente diretta verso i linfociti T CD4+ (Th-1, Th-2, Th-17), principali effettori nelle malattie autoimmuni: essa inibisce le cellule Th-1, la produzione di citochine proinfiammatorie IL-2, IFN- γ , e TNF- α ed ha un'importante ruolo nella loro regolazione funzionale e nella differenziazione delle cellule T regolatorie^{47, 48}. Oltre ai dati epidemiologici,

anche dati sperimentali sono a favore di tale ipotesi⁵. La diminuzione della vitamina D sarebbe in grado d'indurre, in modelli animali, malattie autoimmuni come artrite reumatoide, diabete mellito di tipo I, LES^{49,50,51}. In numerosi esperimenti sul modello animale di malattia (encefalomielite autoimmune sperimentale o EAE), inoltre, l'iniezione di Vitamina D si è rivelata in grado di prevenire completamente i segni clinici e anatomo-patologici della EAE^{52,53}. I risultati di trial clinici sulla supplementazione di vitamina D nell'uomo sono meno chiari, poiché si tratta di studi piccoli, di breve durata e focalizzati su pazienti con SM clinicamente definita, piuttosto che sulla popolazione sana^{54, 55, 56}. Recenti studi infine hanno dimostrato che elevate concentrazioni sieriche di Vitamina D hanno un ruolo predittivo di conversione da forma clinicamente isolata (CIS) a SM clinicamente definita ed inoltre correlano con l'attività di malattia, espressa come nuove lesioni attive o aumentate di dimensioni alla Risonanza Magnetica (RM)⁵⁷.

L'ipotesi di un **ruolo infettivo** nella genesi della SM risale invece a più di cento anni fa ed è stata continuamente riproposta come possibile meccanismo patogenetico di malattia. Evidenze di natura clinica, anatomo-patologica e sperimentale sono poste a sostegno dell'ipotesi infettiva:

- a. L'esistenza di altre malattie demielinizzanti dell'uomo causate da virus, come la panencefalite sclerosante subacuta (causata dal virus del morbillo) e la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML, causata dal virus John Cunningham o JC);
- b. Il riscontro di elevate concentrazioni di immunoglobuline IgG nel liquor e nel tessuto nervoso in più del 90% dei pazienti affetti da SM e la presenza di bande oligoclonali (BO) nel liquor, che potrebbero essere dirette contro antigeni virali. Tutte le altre malattie del SNC correlate ad alti livelli di IgG sono di natura infiammatoria e, spesso, infettiva.
- c. Il modello murino dell'encefalomielite da virus di Theiler, che dimostra la possibilità di indurre demielinizzazione in animali infettati sperimentalmente da virus.
- d. La presenza di infiltrati perivascolari nelle placche di demielinizzazione della SM.

Alla luce di dati sperimentali ottenuti sugli animali e dalle osservazioni compiute sull'uomo, le ipotesi sui possibili meccanismi mediante i quali un agente virale potrebbe interferire con il sistema immunitario sono:

- Meccanismi di mimesi molecolare;
- Rilascio di superantigeni;
- Attivazione di cloni quiescenti di cellule T autoreattive;

- Aumento dell'espressione cellulare di antigeni di istocompatibilità HLA, recettori per virus, che normalmente non sono espressi;
- Riattivazione di altri virus o retrovirus endogeni ed esogeni, presenti allo stato latente nella cellula ospite.

Numerosi virus sono stati chiamati in causa come agenti eziologici della SM: oltre ai virus del morbillo e della parotite, particolare attenzione è stata posta agli Herpesvirus, per le loro caratteristiche neurotrope, tra cui il virus di Epstein-Barr (EBV)⁵⁸, gli Herpes Simplex virus 1 e 2⁵⁹, il virus Varicella-Zoster (VZV)⁶⁰ e l'Herpesvirus Umano (HHV-6)⁶¹.

Il virus di Epstein-Barr è stato fortemente associato con la SM^{58,62}. Quasi il 100% dei pazienti affetti da SM risulta sieropositivo per EBV rispetto al 95% dei controlli sani adulti⁶³, e gli individui con pregressa mononucleosi infettiva (manifestazione clinica frequente dell'infezione da EBV che si verifica nell'adolescenza o all'età adulta) hanno un rischio di malattia aumentato rispetto a persone senza tale storia anamnestica⁶⁴. Inoltre, i titoli anticorpali degli anticorpi anti-Antigene Nucleare di EBV, EBNA-1 ed EBNA-2, espressi dalle cellule infettate dalla forma latente del virus, correlano con un aumentato rischio di sviluppare SM tra giovani sani^{65,66}.

Questi dati supportano la cosiddetta "ipotesi di igiene" tipica della poliomielite, la quale afferma che le persone non esposte ad infezioni durante la prima infanzia a causa di un ambiente pulito, producono risposte immuni aberranti alle infezioni quando vanno incontro a tali infezioni dopo l'epoca infantile o in età adulta^{2, 67,68}.

Altri agenti infettivi (sia virus che batteri) sono stati implicati nella patogenesi della malattia, tra cui l'HHV-6^{69,70,71}, i virus del morbillo, parotite, rosolia⁷², il virus della varicella-Zoster⁶⁰, e, più recentemente sono stati proposti anche il *Mycoplasma pneumoniae*, la *Chlamydia pneumoniae* e lo *Staphylococcus*⁷³ così come è stato segnalato un ruolo della flora intestinale commensale⁷⁴. Al contrario, le infezioni con alcuni parassiti sembrerebbero conferire un effetto protettivo, per esempio la colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte di elminti⁷⁵.

Altri fattori di rischio non infettivi proposti per la SM includono: il fumo di sigaretta⁷⁶ (che potrebbe spiegare, almeno in parte, l'aumento del rapporto recentemente riportato nell'incidenza di malattia tra donna e uomo), grassi alimentari e antiossidanti, estrogeni, esposizione professionale ai solventi organici, ai traumi fisici e allo stress psicologico⁷⁷.

1.1.3. Caratteristiche cliniche, decorso e diagnosi e di malattia

Le manifestazioni cliniche della SM sono il risultato dell'alterazione della conduzione nervosa lungo le vie mieliniche del SNC e si presentano in modo estremamente variabile, a seconda della localizzazione della lesione nel SNC (**Tabella 1.1.**).

I sintomi iniziali più comuni includono generalmente le parestesie o intorpidimento ad uno o più arti, debolezza motoria, disturbi visivi monoculari (neurite ottica), diplopia, vertigini e instabilità nella marcia. Altri sintomi e segni di accompagnamento possono includere stanchezza, urgenza urinaria o ritenzione, disfunzione sessuale, depressione, dolore, disfunzione cognitiva, spasticità, atassia, nistagmo e altro ancora⁵. Pochi sintomi clinici sono specifici della malattia, ma particolarmente caratteristici sono il sintomo di Lhermitte (sensazione di scossa elettrica compare alla flessione del capo e si irradia lungo la schiena fino agli arti inferiori) e il fenomeno Uhthoff (peggioramento transitorio di sintomi preesistenti e segni neurologici quando la temperatura corporea aumenta, ad esempio dopo l'esercizio o un bagno caldo)². I sintomi neurologici possono presentarsi come attacchi improvvisi e acuti (anche chiamati recidive o esacerbazioni) o come un peggioramento costante della compromissione neurologica nel tempo (progressione della disabilità) e il decorso clinico della malattia può essere considerato come l'espressione di questi due fenomeni⁷⁸.

Le ricadute sono tipicamente definite come nuovi o peggioranti deficit neurologici che durano 24 ore o più in assenza di febbre o infezione e che si verificano almeno 30 giorni dopo un attacco precedente, seguito da un recupero parziale o una remissione completa⁷⁹.

La progressione di malattia è intesa come il peggioramento stabile e irreversibile di sintomi e segni per almeno 6 mesi⁸⁰ ed è comunemente misurata dalla scala di disabilità neurologica di Kurtzke (expanded disability severity score o EDSS)⁸¹.

Per l'85% dei pazienti le ricadute rappresentano l'espressione clinica esclusiva della SM nei primi anni di malattia. In una proporzione di questi pazienti che aumenta con la durata di malattia, il decorso della malattia vira, con tempo variabile, verso una fase secondariamente progressiva. Ricadute possono essere presenti durante la fase primariamente o secondariamente progressiva nel 40% dei casi⁸². Nel 15% dei pazienti invece la malattia è progressiva fin dall'esordio. Tale forma è caratterizzata da età più avanzata d'esordio (età media 40 anni) e nessun predominio di genere⁸³.

I fattori che contribuiscono alla variabilità ed imprevedibilità del **decorso clinico** sono molteplici. La malattia ha notoriamente un andamento casuale in termini di frequenza e gravità delle esacerbazioni, di entità e di velocità della progressione e dell'accumulo della disabilità⁸⁴.

Gli studi di RM hanno dimostrato che le lesioni si presentano più spesso rispetto a quanto sia evidenziabile clinicamente⁸⁵.

La classificazione della Sclerosi Multipla definita in base al decorso permette di identificare 4 forme cliniche principali di SM⁸⁶:

- a) Remittente recidivante (RR)
- b) Primariamente progressiva (PP)
- c) Secondariamente progressiva (SP)
- d) Progressiva recidivante (PR)

a) Remittente recidivante (RR): caratterizzata da ricadute clinicamente definite, seguite da un grado di recupero variabile (completo o con sequele e deficit residuo), con un decorso stabile tra gli attacchi. Le ricadute sono definite come episodi di peggioramento acuto della funzione neurologica, caratterizzati da nuovi sintomi o segni presenti per almeno 24 ore e non associati a rialzo febbrile. Si tratta della più comune forma di esordio della SM. I pazienti con SM-RR possono sviluppare anche grave disabilità, a gradini, quando il recupero dai singoli attacchi è incompleto. Questo non deve essere confuso con il graduale e continuo peggioramento che si realizza nelle forme progressive.

b) Primariamente Progressiva (PP): caratterizzata da progressione di malattia fin dall'esordio con occasionali plateaux. L'elemento essenziale della SM-PP è un peggioramento graduale, quasi continuo, con minori fluttuazioni, ma senza chiare recidive.

c) Secondariamente progressiva (SP): è caratterizzata da un iniziale decorso RR di malattia, seguito da progressione, con o senza occasionali recidive, lievi remissioni e plateaux. La SM-SP può essere considerata l'esito a lungo termine della SM-RR.

d) Progressiva recidivante (PR): è definita come una malattia progressiva sin dall'esordio, con sovrapposte recidive acute con o senza recupero; i periodi tra le recidive sono caratterizzati da progressione continua.

Nel singolo paziente il decorso di malattia è altamente variabile e imprevedibile⁸⁷ e, almeno nelle fasi iniziali di malattia, l'impatto maggiore sulla qualità della vita del paziente e della sua famiglia, aldilà dalle limitazioni fisiche, è dovuto alla sofferenza psicologica causata

dall'apprendere la diagnosi e soprattutto dall'incertezza relativa al decorso, alla progressione di malattia ed alla possibile disabilità futura.

Il progredire delle conoscenze sulla SM e sulla sua patologia, ha posto in discussione questa classificazione, basata sui fenotipi clinici, che non riflette in modo adeguato gli aspetti clinici di malattia identificati più di recente, né considera l'importanza dei dati di RM e di marcatori biologici. Questo ha indotto "l'Advisory Committee on clinical trials of MS" ad un riesame dei fenotipi di SM e all'elaborazione di una nuova classificazione, che considerasse l'attività di malattia, espressa sia come tasso di ricadute cliniche, sia come parametri di RM (indipendentemente dal fenotipo di malattia), e la progressione di malattia stessa⁸⁸ (**Figura 1.2.**).

Questo nuovo "consensus" ha anche formalizzato il riconoscimento di altre due forme di malattia:

a) Sindrome clinicamente isolata (CIS): definita da un primo episodio clinico isolato, caratterizzato da un disordine neurologico acuto o subacuto suggestivo di demielinizzazione e infiammazione, con durata di almeno 24h⁸⁹, che potrebbe essere SM, ma che non risponde ai criteri diagnostici di disseminazione nel tempo⁹⁰. La CIS è comunemente considerata la manifestazione clinica precoce della SM⁹¹, anche se non tutti i soggetti con CIS svilupperanno necessariamente la malattia. Infatti solo una percentuale variabile di pazienti con CIS, circa dal 30% al 70%, andrà incontro a una diagnosi di SM definita⁹⁰. La storia naturale di malattia ed i trials clinici con i farmaci immunomodulanti hanno mostrato che i pazienti con CIS che hanno lesioni alla RM hanno un rischio elevato di sviluppare una SM definita^{92,93,94}. I trials clinici con i farmaci modificanti il decorso di malattia (DMT) hanno dimostrato i pazienti con CIS trattati con DMT avevano un minor rischi di sviluppare una seconda ricaduta (l'evento che definisce una diagnosi di SM definita clinicamente) e minor attività di RM^{95,96}. L'accettazione da parte delle Agenzie Regolatorie di usare farmaci nelle CIS per ritardare la diagnosi di SM definita ha ulteriormente connotato la CIS come un elemento dello spettro fenotipico della SM. Infine, l'utilizzo della revisione del 2010 dei criteri diagnostici di McDonald⁹⁷, ha consentito di poter formulare una diagnosi di SM molto precocemente nei pazienti con CIS, solo in base ad un'unica sequenza di RM.

b) Sindrome radiologicamente isolata (RIS): è definita sulla base del riscontro di alterazioni alla RM tipiche della SM, riscontrate incidentalmente ed in assenza di qualsiasi espressione clinica^{98,99,100}. Le RIS non sono considerate sottotipi di SM per sé, data l'assenza di evidenza clinica di malattia demielinizzante e per il fatto che i dati di RM da soli

possono essere aspecifici. Tuttavia le RIS possono porre il sospetto di SM, in relazione alla morfologia e localizzazione delle lesioni di RM e cambiamenti a livello di neuroimmagini possono comportare un maggior rischio di sviluppare sintomi clinici di SM in futuro¹⁰¹. Lesioni midollari asintomatiche, lesioni che assumono il mezzo di contrasto o presenza di bande oligoclonali IgG nel liquor aumentano il rischio di una futura diagnosi di SM¹⁰².

Lo stesso consensus ha poi suggerito che l'attività di malattia fosse definita in base agli attacchi clinici o ai dati di RM (lesioni che assumono il gadolinio e lesioni nuove o aumentate di volume), così come in base alla progressione di disabilità, sia nelle forme recidivanti, che nelle progressive. Le evidenze di attività di malattia e di progressione clinica, che riflettono il sottostante processo infiammatorio o neurodegenerativo¹⁰³, possono influire sulla prognosi, decisioni terapeutiche e disegni di trials clinici.

E' stato quindi riconosciuto che sia le forme recidivanti, che quelle progressive, possano essere definite "*attive*" o "*non attive*" in base alla gravità dei segni e sintomi, frequenza degli attacchi, tasso di progressione, disabilità residua e alterazioni di RM.

La diagnosi di SM si basa sulla dimostrazione, attraverso evidenze anamnestiche, cliniche e strumentali, della presenza di lesioni demielinizzanti del SNC, disseminate nello spazio (più sedi lesionali) e nel tempo (due o più episodi di demielinizzazione) e l'esclusione di diagnosi alternative ("no better explanation")¹⁰⁴. Ad oggi non esiste un singolo e specifico test che permetta di formulare la diagnosi di SM, che quindi rappresenta un processo diagnostico complesso, e che spesso non si esaurisce in un unico atto clinico e può richiedere la collaborazione di diversi specialisti.

I criteri attualmente utilizzati per la diagnosi di SM sono quelli di Mc Donald, introdotti nel 2001¹⁰⁵, rivisti nel 2005¹⁰⁶ e aggiornati nel 2010⁹⁷ (**Tabella 1.2.**) .

Essi integrano la valutazione neuroradiologica con evidenze cliniche ed altri metodi strumentali e consentono una diagnosi più precoce, poiché la disseminazione temporale, che in passato veniva dimostrata con un secondo attacco clinico o una RM successiva con lesioni nuove, attualmente può essere dimostrata già al momento della prima RM, se coesistono lesioni attive, gadolinio-positive (Gd+), espressione di danno di barriera emato-encefalica, e lesioni gadolinio-negative (Gd-).

La *disseminazione nello spazio* può essere dimostrata con la presenza di una sola lesione T2 in almeno due siti del SNC considerati caratteristiche per la SM (peri-ventricolare, iuxta-corticale, infra-tentoriale, midollo spinale) con esclusione delle lesioni in regioni

sintomatiche nei pazienti con sindrome del tronco encefalico o midollare. La captazione del mezzo di contrasto (Gd) non è richiesta per la dimostrazione della disseminazione spaziale.

La *disseminazione temporale* può essere dimostrata dalla contemporanea presenza di una lesione in T2 Gd+ e una lesione non captante. Queste lesioni possono essere individuate già alla RM basale o in una RM successiva, confrontata con una scansione di base, indipendentemente da quando la RM basale sia stata ottenuta. Quando al primo evento demielinizzante fa seguito un secondo episodio clinico (ricaduta) si parla di SM Clinicamente Definita (SMCD).

Nel 2016 sono state fornite **le nuove raccomandazioni d'uso della RM ("MAGNIMS consensus Guidelines")** nella diagnosi e nella gestione dei pazienti con SM¹⁰⁷(Figura 1.3.).

Oltre alle quattro sedi tipicamente coinvolte dalla SM e contemplate negli attuali criteri diagnostici (periventricolare, iuxtacorticale, infratentoriale e midollo spinale), è preso in considerazione il **coinvolgimento del nervo ottico**, colpito in più del 30% dei pazienti, già all'esordio della malattia.

E' stato inoltre ridefinito il coinvolgimento a carico delle regioni periventricolari ed è stata inclusa la valutazione delle lesioni della sostanza grigia, presenti in un'alta percentuale di pazienti anche con sindromi clinicamente isolate (circa il 40%) e assenti in altre malattie neurologiche che possono richiedere una diagnosi differenziale rispetto alla SM.

Un aspetto ampiamente dibattuto degli attuali criteri diagnostici riguarda la distinzione **tra lesioni sintomatiche e asintomatiche**, che a volte può non risultare semplice da un punto di vista clinico. Negli attuali criteri diagnostici, le lesioni sintomatiche sono escluse dalla dimostrazione della disseminazione nello spazio e nel tempo della malattia. I dati analizzati nelle nuove linee guida indicano come tale distinzione non sia di fatto necessaria, semplificando notevolmente l'approccio diagnostico e consentendo una diagnosi più precoce.

1.1.4. Terapie

Ad oggi il trattamento farmacologico nella SM comprende farmaci immunomodulanti ed immunosoppressori, che hanno come obiettivo quello di prevenire le ricadute di malattia e la progressione della disabilità, modificando nel tempo la storia naturale della SM, tanto da prendere il nome di "disease- modifying therapies" (DMTs).

Studi importanti e ormai storici, tra cui il CHAMPS (*Controlled High-Risk Subjects Avonex Multiple Sclerosis Prevention*)¹⁰⁸, l'ETOMS (*the Early Treatment of MS*)⁹⁶, il BENEFIT (*the Betaferon in Newly Emerging Multiple Sclerosis for Initial Treatment*)¹⁰⁹ ed il PreCISe (*Comi. 2009*)¹¹⁰, hanno dimostrato come il trattamento precoce dopo il primo episodio demielinizzante sia in grado di ridurre il numero di ricadute, l'attività di malattia e il carico lesionale alla RM, riducendo notevolmente il rischio di sviluppare una invalidità futura e determinando complessivamente un miglioramento della salute e della qualità di vita del paziente. Il razionale di una terapia precoce risiede nelle robuste evidenze indicanti che il danno assonale inizia già nelle fasi precoci della malattia. Infatti, studi di RM sia convenzionale che non, hanno dimostrato che in alcuni pazienti l'atrofia cerebrale e il danno assonale iniziano già al primo episodio di malattia¹¹¹, e che il grado di atrofia cerebrale correla con il numero di lesioni infiammatorie alla RM¹¹². Questi dati sostengono l'ipotesi che il danno assonale sia il precursore della degenerazione neuronale, a sua volta coinvolta nello sviluppo del deficit neurologico irreversibile.

Le terapie attualmente disponibili per la SM sono in grado di agire quasi esclusivamente sulla componente infiammatoria, nelle prime fasi della malattia. Al contrario, quando i meccanismi neurodegenerativi sono preminenti, nelle forme progressive di malattia, nessuna delle terapie attualmente conosciute ha dimostrato, nei diversi studi clinici, una reale efficacia.

Il trattamento di un paziente con SMRR può seguire una strategia di “escalation” o una di “induction”. Nel primo caso, la terapia inizia con un farmaco “di prima linea”, caratterizzato cioè da un elevato profilo di sicurezza ma da una efficacia moderata, per poi intraprendere un trattamento con un farmaco “di seconda linea”, più efficace ma con maggiori rischi, in caso di risposta insoddisfacente alla prima linea. L'approccio di induzione, invece, prevede di impiegare subito un trattamento di seconda linea, in modo da ottenere una rapida risposta in una malattia molto attiva, la quale giustifica i maggiori rischi di eventi avversi.

Attualmente sono state approvate le seguenti terapie nel trattamento della SM dall'agenzia regolatoria Europea EMA (*European Medicines Agency*), tra cui gli interferoni beta (IFNb) in diverso dosaggio e diversa modalità di somministrazione; il glatiramer acetato (GA), la teriflunomide, il dimetil fumarato (BG-12), il mitoxantrone, il natalizumab (NAT), il fingolimod (FTY), l'alemtuzumab, il daclizumab.

Per una panoramica sulle modalità di somministrazione, posologia, potenziali effetti avversi e monitoraggio previsto dei diversi farmaci si rimanda alla **Tabella 1.3**.

L'IFN e il GA sono definiti farmaci della “prima generazione”, poiché sono approvati ormai già da un ventennio. Sono anche definiti farmaci di “prima linea” poiché approvati per l'utilizzo già dalle prime fasi della malattia. Entrambi sono caratterizzati da simile profilo di efficacia e buon profilo di sicurezza a lungo termine¹¹³ e rimangono ancora il trattamento di prima scelta in molti Paesi. Il fattore più importante che interferisce con il successo di questi farmaci è la loro modalità di somministrazione: sono infatti entrambi somministrati per via iniettiva e ciò interferisce con l'aderenza del paziente alla terapia.

In particolare:

a) l'interferone beta (di tipo 1 a e 1 b): è un polipeptide naturale, prevalentemente prodotto da fibroblasti. E' disponibile per il trattamento della SM in forme ricombinanti ed in diverse preparazioni, come IFN1a- β o IFN1b- β ¹¹⁴. Il meccanismo d'azione del farmaco prevede una inibizione dell'attivazione e della proliferazione delle cellule T, l'apoptosi delle cellule T autoreattive, l'induzione delle cellule Treg, uno shift dalla forma T helper 1 (o Th1) alla forma T helper 2 (o Th2), la modulazione citochinica e l'inibizione della migrazione dei leucociti attraverso la barriera emato–encefalica (BBB) all'interno del SNC^{115,116}.

Il trattamento con IFN- β può indurre la formazione di anticorpi neutralizzanti specifici (NABs), che annullano l'efficacia del trattamento. Di conseguenza, si raccomanda di testare tutti i pazienti per la presenza di NABs durante la terapia e di passarli ad un altro trattamento se la presenza di NABs è confermata¹¹⁴.

b) il *glatiramer acetato*: ha un meccanismo d'azione complesso e non del tutto chiarito che prevede l'attivazione di 5 processi differenti: si lega al complesso maggiore di istocompatibilità, interferisce con il processo di presentazione dell'antigene, interferisce con l'attivazione delle cellule T attraverso il mimetismo molecolare (struttura molecolare simile alla proteina basica della mielina), induce lo shift verso la produzione di citochine dal tipo Th1 vs Th2, agisce sulla neuroprotezione promuovendo fattori neurotrofici^{117,118, 119, 120}.

Negli anni novanta sono stati effettuati diversi studi che hanno testato i farmaci singolarmente contro il placebo^{121,122}: entrambi i farmaci hanno dimostrato un'efficacia paragonabile per la prevenzione delle recidive (una riduzione media del 30% delle recidive) e per la riduzione sullo sviluppo di nuove lesioni alla RM encefalo. Negli anni 2000 i due farmaci sono stati confrontati tra di loro in due importanti studi^{123,124}, i cui risultati hanno dimostrato che non vi erano differenze sul tasso di recidive (-30%), di nuove lesioni alla RM, o di progressione dell'EDSS tra i due farmaci. In una revisione Cochrane del 2014¹¹³, è stato confermato infatti che entrambe le terapie hanno una efficacia simile dopo 24 mesi di trattamento, misurata tramite il rischio di ricadute o di progressione. Anche gli effetti sulla

comparsa di nuove lesioni captanti mezzo di contrasto alla RM sono simili, mentre l'effetto dell'IFN sulla riduzione di lesioni in T2 e T1 sembra essere lievemente superiore rispetto al GA.

Tra i farmaci più recentemente approvati per il trattamento delle forme RR di malattia. ad uso orale ed indicati **in prima linea** vi sono:

a) Il **dimetil fumarato**, un estere metilico dell'acido fumarico, già usato dalla seconda metà degli anni '90 per il trattamento della psoriasi¹²⁵. Due studi di fase III hanno comparato l'efficacia del farmaco con il placebo e con il comparatore attivo nella SM^{126,127}. In entrambi è stata dimostrata una significativa riduzione nel numero di ricadute annuali e nell'attività di malattia alla RM. Il meccanismo d'azione principale prevede una polarizzazione della risposta immune da un'attività prevalentemente pro-infiammatoria (Th1-simile) a un profilo antinfiammatorio di tipo Th2, e una riduzione dello stress ossidativo a carico del SNC attraverso l'attivazione della via del *nuclear-related factor 2 (nrf-2)*, un fattore di trascrizione nucleare con proprietà antiossidanti^{128,129}.

b) la **teriflunomide** è un metabolita attivo della leflunomide, il cui meccanismo d'azione preciso non è stato completamente chiarito. È stato dimostrato che il farmaco inibisce la diidroorotato deidrogenasi, un enzima mitocondriale che riduce la sintesi di nucleotidi pirimidinici, riducendo così la proliferazione delle cellule T e B attivate¹³⁰. Attraverso altri meccanismi, la teriflunomide promuove la creazione di un micro-ambiente antinfiammatorio e inibisce l'interazione tra le cellule presentanti l'antigene (APC) e i linfociti T¹³¹. Sono stati approvati due dosaggi sulla base dei risultati di due trial clinici di fase 3; in questi studi è stata documentata efficacia sia per la riduzione del numero di ricadute che per la diminuzione del carico lesionale alla RM. Soltanto per la dose più elevata, tuttavia, è stato dimostrato un impatto positivo sulla progressione di disabilità^{132, 133,134,135}.

Tra i farmaci utilizzati attualmente in **“seconda linea”** vi sono il natalizumab ed il fingolimod, e più recentemente è stato reso disponibile l'alemtuzumab. Tali farmaci sono caratterizzati da un migliore profilo di efficacia, ma da un profilo di sicurezza più basso, pertanto sono autorizzati in Italia nelle forme più aggressive di SM-RR (natalizumab e alemtuzumab), e/o nei pazienti che non hanno risposto ad un ciclo di trattamento con i farmaci di prima linea (natalizumab, alemtuzumab e fingolimod). Il Daclizumab, approvato di recente come seconda linea dalle agenzie regolatorie italiane, sarà disponibile a breve per il trattamento delle forme RR.

Il **natalizumab** è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato, il primo

utilizzato nel trattamento della SM-RR ad alta attività di malattia. Si è dimostrato ridurre il numero di ricadute e migliorare sensibilmente tutti i parametri di misurazione della disabilità nella SM^{139,140}. Il meccanismo d'azione consiste nel legame dell'anticorpo alla molecola di adesione "very late antigen-4" (VLA-4), espressa sulla superficie di linfociti e monociti. Esso previene l'interazione tra la molecola VLA-4 e il suo ligando (VCAM-1) a livello dell'endotelio vascolare, bloccando l'ingresso dei linfociti nel SNC¹³⁸. Il trattamento è mirato a ristabilire l'integrità della barriera emato-encefalica ricreando un normale profilo di espressione citochinica e bloccando la migrazione trans-endoteliale dei linfociti¹³⁹. Tra gli effetti collaterali del NAT, si cita il rischio di sviluppo della leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), un'infezione del SNC sostenuta dal virus di John Cunningham (JCV) che conduce il paziente a morte o a disabilità neurologica irreversibile di tipo cognitivo, motorio o visivo, in assenza di trattamenti efficaci^{140,141}. Nel corso degli ultimi dieci anni sono state accumulate molte informazioni sui fattori di rischio di PML nei pazienti trattati con natalizumab e sono stati riconosciuti tre importanti fattori di rischio per PML: la sieropositività per JCV, durata della terapia superiore a due anni ed uso precedente di farmaci immunosoppressori^{142,143,144}. Inoltre, come IFN- β , il trattamento con NAT può indurre la formazione di anticorpi neutralizzanti che influenzano l'efficacia terapeutica¹⁴⁵.

Il **fingolimod** (FTY) è un modulatore del recettore sfingosina-1-fosfato. Dopo la fosforilazione, agisce come antagonista di questo recettore, inducendo la sua internalizzazione e inattivazione e impedendo ai linfociti l'uscita dai tessuti linfoidi secondari (ad esempio, linfonodi). La risultante redistribuzione dei linfociti circolanti fa sì che venga ridotta la quantità di cellule autoattivate nel SNC^{146,147}. Inoltre, FTY penetra nel SNC e interagisce con neuroni e glia esprimendo i recettori della S1P¹⁴⁸. FTY è stato approvato per il trattamento della SMRR, dimostrandosi superiore, in termini di riduzione del numero di attacchi di malattia, sia al placebo (50% di attacchi in meno), sia all'IFN-b-1a^{149,150}. Tra gli effetti collaterali più importanti, è riportata la possibilità di riattivazione del Virus Varicella Zoster (VZV), il rischio di bradicardie sintomatiche e di edema maculare retinico, per i quali sono richiesti opportune procedure di farmacovigilanza.

Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il CD52, una glicoproteina di superficie espressa in particolare sui linfociti T e B maturi. Il trattamento causa una citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente (ADCC), e produce una profonda linfopenia da cui le cellule B recuperano rapidamente, a differenza delle cellule T CD4+, che richiedono lunghi periodi di tempo per raggiungere i livelli di pretrattamento. Pertanto, si ipotizza che alemtuzumab eserciti i suoi effetti terapeutici attraverso la complessa

riorganizzazione del repertorio immunitario che segue la ricostituzione omeostatica dei linfociti dopo la deplezione, piuttosto che attraverso l'esaurimento delle cellule T effettrici¹⁵¹. L'effetto avverso principale di alemtuzumab è l'autoimmunità secondaria, in particolare i disturbi della tiroide, la glomerulonefrite e la porpora trombocitopenica autoimmune¹⁵². Il farmaco induce una riduzione significativa del rischio di ricadute, una riduzione del 42% del rischio di progressione di disabilità ed una riduzione significativa del numero di lesioni iperintense in T2 e Gd+ alla RM^{153,154,155,156}.

Daclizumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il CD25, ovvero la subunità α ad alta affinità del recettore per l'IL-2, espresso sulla membrana dei linfociti T attivati. Il meccanismo d'azione non è completamente chiarito, ma sicuramente riduce l'espansione delle cellule T attivate e la loro sopravvivenza, modula le vie di segnalazione dell'IL-2, induce espansione delle cellule natural killer (NK) circolanti^{157,158}. Gli studi registrativi hanno mostrato che il farmaco induce una significativa riduzione del rischio di ricadute, del numero di nuove lesioni iperintense in T2 e Gd+ alla RM e del rischio di progressione di disabilità sia verso il placebo che verso il comparatore attivo^{159,160,161}. E' stato attualmente approvato per il trattamento della SM-RR ad elevata attività, che non ha risposto ad altri farmaci o per coloro che hanno una forma di SM a rapida evoluzione e non possono utilizzare altri trattamenti.

Il **mitoxantrone** è un agente chemioterapico derivato dall'antracenedione sintetico che induce la rottura dei filamenti del DNA e ne inibisce la replicazione. Il target cellulare è caratterizzato dalle cellule immunitarie proliferanti ed i suoi principali meccanismi d'azione sono l'inibizione della proliferazione e l'induzione di apoptosi delle cellule T, cellule B, macrofagi e altre APC. Il mitoxantrone è approvato per il trattamento della SM RR e per le forme progressive di SM con documentata ed elevata attività di malattia¹⁶², ma è sempre meno utilizzato a causa del rischio di complicanze gravi (cardiotossicità e leucemia acuta)^{163,164,165} e grazie ad un numero crescente di opzioni terapeutiche alternative molto efficaci e con un profilo di sicurezza migliore^{166,167}.

E' in corso di approvazione da parte dell'EMA un altro anticorpo monoclonale umanizzato, **l'ocrelizumab**, in grado di legarsi in maniera specifica alla molecola CD20 presente sulla superficie di alcune cellule B. Il farmaco induce deplezione delle cellule B CD20+, aumenta la citotossicità anticorpo mediata e riduce la citotossicità mediata dal complemento¹⁶⁸. Gli studi clinici di fase III effettuati verso comparatore attivo hanno documentato nei pazienti con SM-RR una riduzione significativa del tasso annualizzato di

ricadute per un periodo di due anni, un ritardo significativo della progressione della disabilità ed una riduzione significativa rispetto alla comparsa di nuove lesioni captanti mezzo di contrasto alla risonanza magnetica nei pazienti trattati¹⁶⁹. ***Ocrelizumab è inoltre il primo farmaco approvato dall'FDA per la SMPP.*** Lo studio di fase III, randomizzato, in doppio cieco, multicentrico per valutare l'efficacia e la sicurezza di ocrelizumab rispetto al placebo in 732 persone con SM primariamente progressiva ha dimostrato l'efficacia del farmaco nel contrastare la progressione della disabilità mantenuta per 12 e 24 settimane, misurata tramite EDSS, nel diminuire il volume delle lesioni T2 iperintense alla RM e nel ridurre il tasso di atrofia cerebrale nei pazienti che avevano attività di malattia alla RM¹⁷⁰.

Infine, la SM è associata ad una serie di sintomi e deficit funzionali, la cui gestione è molto importante per migliorare la qualità della vita quotidiana e coinvolge trattamenti con farmaci e misure di riabilitazione. Mentre per alcuni sintomi comuni sono disponibili trattamenti efficaci, la gestione di molti altri sintomi è più complicata¹⁷¹. Inoltre, modifiche di stile di vita, compreso il raggiungimento di un peso corporeo ottimale, la cessazione del fumo e l'eccessivo l'uso di alcol, l'integrazione con la vitamina D, la dieta anti-infiammatoria a basso tenore di grassi e colesterolo, l'esercizio fisico regolare, l'igiene del sonno, il controllo della temperatura, programmi di gestione dello stress psicologico, la marijuana ad uso medico, la stimolazione mentale e sociale e l'identificazione e il trattamento dei fattori di rischio vascolare può migliorare la vita dei pazienti con SM¹⁷².

1.1.5. Aspetti anatomo-patologici della Sclerosi Multipla

L'impronta patologica della SM è rappresentata da aree focali di perdita di mielina all'interno del SNC, note come placche o lesioni¹⁷³. Tali lesioni sono disseminate all'interno di tutto il SNC, ma si riscontrano preferenzialmente a livello del nervo ottico, del midollo spinale, del tegmento del tronco encefalico, del cervelletto e delle aree di sostanza bianca iuxtacorticali e periventricolari¹⁷⁴. Oltre che a livello spaziale, le lesioni risultano disseminate anche nel tempo, come dimostrato dalla presenza di placche comparse in periodi differenti¹⁷⁵.

La formazione delle placche è un processo condotto da diverse componenti: infiammazione, demielinizzazione, rimielinizzazione, astrocitosi, perdita assonale e degenerazione neuronale, in grado variabile¹⁰.

Benché storicamente l'anatomia patologica della SM si sia focalizzata sulle lesioni della sostanza bianca del SNC, recenti studi hanno stabilito che è presente anche un danno nella sostanza grigia corticale dei pazienti affetti dalla malattia⁸⁴.

Le placche della SM evolvono in maniera differente nelle varie fasi di malattia: in ciascuna fase si evidenziano placche diverse per tipologia e grado di attività demielinizzante¹⁷⁶.

Le placche attive di malattia possono presentarsi in fase acuta e cronica: le placche attive ed in fase acuta sono caratterizzate dalla presenza di macrofagi che contengono sia prodotti di degradazione della mielina più piccoli che di maggiori dimensioni, mentre le placche croniche sono caratterizzate da macrofagi contenenti solo i prodotti di degradazione della mielina di dimensioni maggiori^{177,178}. Le placche attive ed in fase acuta sono più frequenti nella SM-RR e rappresentano il substrato patologico degli attacchi clinici di malattia¹⁷⁹. Le caratteristiche istologiche di tali lesioni della SM includono margini indistinti, ipercellularità, intensa infiltrazione peri-vascolare ad opera di piccoli linfociti, principalmente cellule T citotossiche CD8+, con minore numero di cellule T CD4+, cellule B e plasmacellule, macrofagi ripieni di mielina, edema parenchimale, perdita di mielina e oligodendrociti, danno assonale diffuso, astrociti ipertrofici¹⁸⁰. Il danno assonale è correlato al numero di linfociti e alla microglia attivata, ed è causato dalla liberazione di mediatori immunitari infiammatori tossici e non specifici¹⁷⁶.

Le lesioni attive della fase acuta di malattia mostrano in definitiva una profonda eterogeneità anatomico-patologica. Esse possono essere classificate in 4 diversi patterns di demielinizzazione, sulla base della perdita di mielina, della geografia e dell'estensione delle placche, del pattern di distruzione degli oligodendrociti e delle evidenze immunopatologiche di attivazione del complemento¹⁸¹. Si distinguono in particolare:

✓ Le placche di tipo I, riscontrate nel 15% dei pazienti affetti da SM, sono lesioni perivascolari con bordi taglienti, caratterizzate da infiammazione con presenza di cellule T e macrofagi, demielinizzazione attiva con perdita di tutte le proteine della mielina deposizione del complemento sulla mielina;

✓ Le placche di tipo II, riscontrate in circa il 58% delle biopsie, sono lesioni perivascolari caratterizzate da bordi taglienti e dalla deposizione di complemento e di immunoglobuline, i quali sarebbero i responsabili della demielinizzazione.

Le placche di tipo I e II presentano una perdita variabile di oligodendrociti al confine attivo, con comparsa di un elevato numero di oligodendrociti nel centro inattivo e un'alta incidenza di placche rimielinizzate.

✓ Le placche di tipo III, riscontrate nel 26% dei pazienti, sono scarsamente definite che mostrano una demielinizzazione attiva associata ad apoptosi degli oligodendrociti, specie a livello dei margini della placca attiva, con mancanza di Ig e deposizione del complemento sulla mielina. La perdita di oligodendrociti è pronunciata e talvolta si estende nella sostanza bianca apparentemente normale. Anche il centro inattivo è quasi completamente privo di oligodendrociti, e le placche rimielinizzate sono assenti.

✓ Le placche di tipo IV sono estremamente rare (meno dell'1%) e si caratterizzano per un'estesa morte non-apoptotica di oligodendrociti nella sostanza bianca circostante la placca, che suggerisce una disfunzione metabolica cellulare alla base della maggiore suscettibilità al danno tossico mediato dall'infiammazione^{176,181}.

In un determinato momento della malattia, i patterns di demielinizzazione sono eterogenei tra i pazienti, ma sono omogenei all'interno di più lesioni attive dello stesso paziente¹⁸².

Le **placche croniche** sono riscontrate più frequentemente in pazienti affetti da SM progressiva. Quelle attive sono nettamente demarcate, ai loro bordi si concentrano numerosi macrofagi carichi di mielina. Al contrario, le placche croniche inattive sono lesioni ben circoscritte, completamente demielinizzate e ipocellulari, caratterizzate da perdita assonale e oligodendrocitica, gliosi e infiltrazione minoritaria di macrofagi, microglia e linfociti¹⁸².

Man mano che la placca progredisce dalla forma acuta alla forma cronica inattiva, l'edema recede, l'infiammazione si riduce e i macrofagi e la microglia scompaiono gradualmente. Gli astrociti producono fibre gliali e, in definitiva, la placca è sostituita da una cicatrice gliale^{176,183}. Tali caratteristiche giustificano la denominazione di *sclerosi a placche* attribuita da Charcot alla malattia e sono responsabili dell'aspetto demarcato, solido e retratto delle placche croniche di lunga data all'analisi macroscopica¹⁷⁶.

Inoltre sono state descritte delle strutture simili ai *follicoli linfoidi*^{184,185}, che si formano nelle meningi e nei grandi spazi perivascolari e sono dovute all'accumulo di plasmacellule in questi spazi del tessuto cerebrale soprattutto in fase tardiva di malattia¹⁸⁶, e persistono anche quando l'infiammazione delle cellule T e B viene eliminata. Una possibile spiegazione è che nelle fasi tardive e croniche di malattia l'infiammazione si compartimentalizza all'interno del SNC.

La **rimielinizzazione** estensiva, contrassegnata dalla presenza di guaine mieliniche di nuova genesi e da precursori degli oligodendrociti, è frequentemente riscontrata nelle placche durante le fasi precoci della SM¹⁷⁶, ma la mielina ricostituita è di solito più sottile di prima,

con distanze internodali più brevi. Le lesioni completamente rimielinizzate, note come *placche ombra*, sono aree nettamente demarcate a ridotta densità mielinica e corrispondono a una fase tardiva della mielinizzazione. Le placche ombra sono maggiormente suscettibili di un secondo attacco infiammatorio rispetto alla sostanza bianca normale¹⁸⁷ e la rimielinizzazione degli assoni può progressivamente fallire^{183, 187}.

E' presente inoltre ***danno e perdita assonale***. A differenza di quanto si pensasse in passato, il danno assonale si verifica sia all'interno delle placche che nella sostanza bianca apparente sana, già in fase iniziale della malattia, come dimostrato dagli studi neuropatologici¹⁸⁸, dalle tecniche di RM¹⁸⁹, e utilizzando biomarkers^{190,191,192}. Numerosi studi suggeriscono che la perdita assonale seguita da astrogliosi è in ultima analisi responsabile dello sviluppo di deficit neurologici irreversibili^{193,194} che, nella SM, probabilmente emergono come conseguenza di lesioni accumulate partendo già dalle fasi iniziali della malattia. Tra i meccanismi proposti per spiegare il danno assonale cronico e la neurodegenerazione nella SM, vi sono la demielinizzazione ricorrente in placche precedentemente rimielinizzate, la degenerazione assonale dovuta a perdita di supporto trofico da parte della mielina e degli oligodendrociti, il fallimento mitocondriale cronico nei confronti di richieste energetiche aumentate, il danno ossidativo da attivazione della microglia, le alterazioni nell'espressione o nell'attività di canali ionici assonali, la degenerazione Walleriana^{195,196}.

Anche la ***corteccia cerebrale*** è coinvolta nella SM sia da processi di demielinizzazione che da perdita neuronale e atrofia.

Atrofia e placche di demielinizzazione sono state riscontrate sia nella corteccia cerebrale (in particolare temporale e frontale) che in altre aree di sostanza grigia, quali il talamo, i gangli della base, l'ipotalamo, l'ippocampo, il cervelletto, il midollo spinale⁸⁴. Spesso, le lesioni corticali si estendono lungo il margine sub-piale della corteccia e sono correlate topologicamente ad alterazioni infiammatorie delle meningi; ciò suggerisce che fattori solubili provenienti da infiltrati meningei possano scatenare lo sviluppo di tali lesioni¹⁹⁷. Altri tipi di lesioni corticali, descritte in base alla loro posizione all'interno della corteccia, sono le lesioni intra-corticali, confinate all'interno della corteccia, con risparmio sia della corteccia superficiale che della sostanza bianca adiacente e le lesioni leuco-corticali, che coinvolgono le zone di sostanza grigia e bianca alla loro giunzione, con la conseguente riduzione degli strati corticali superficiali¹⁷⁶.

La *demyelinizzazione corticale* è prominente ed estesa nei pazienti con forme progressive di SM e nei pazienti con deficit cognitivi e può essere il substrato patologico della progressione di malattia, della disabilità irreversibile e della disfunzione cognitiva. Dal punto di vista istopatologico le placche corticali nelle forme progressive e croniche di malattia sono caratterizzate dall'assenza di infiltrati infiammatori di macrofagi e linfocitici, deposizione del complemento e danno alla BBB, e da una popolazione dominante di cellule della microglia, con perdita assonale e di oligodendrociti e atrofia neuronale. La demielinizzazione corticale cronica può essere condotta in parte dagli aggregati infiammatori organizzati nelle meningi (i follicoli meningei). Infatti, questi infiltrati infiammatori meningei topograficamente associati a lesioni sub-piali si trovano nei pazienti con SM SP e PP e sono stati associati ad un decorso più accelerato di malattia¹⁹⁸. La demielinizzazione corticale inoltre può costituire il primo evento istopatologico in alcuni pazienti affetti da SM. Tuttavia, l'istopatologia delle lesioni precoci corticali è diversa da quella delle lesioni croniche poiché la maggioranza è costituita da infiltrati di cellule infiammatorie come macrofagi e linfocitici e presenta la rottura della BBB. Come nelle placche corticali croniche, anche le lesioni corticali precoci mostrano la perdita di oligodendrociti e lesioni assonali e neuronali, probabilmente il risultato dei danni infiammatori acuti. Il carattere infiammatorio della demielinizzazione corticale precoce suggerisce che la neuro-degenerazione nella SM si verifica su uno sfondo di infiammazione e la natura non infiammatoria della demielinizzazione corticale cronica può riferirsi a intervalli lunghi tra la formazione della lesione stessa ed il riscontro autoptico. Infatti, questa differenza tra la demielinizzazione corticale in fase precoce e in fase avanzata può essere spiegata con la transitorietà e la rapida risoluzione dell'infiammazione corticale, fenomeno dimostrato nel modello murino di malattia^{198,199,200}.

Pertanto, l'istopatologia della SM, insieme alle proprietà immunomodulanti o immunosoppressive delle terapie attualmente disponibili e alla rappresentazione di geni immunologicamente rilevanti tra quelli identificati di “suscettibilità alla SM”, suggeriscono tutti un coinvolgimento primario del sistema immunitario cellulare e umorale nella patogenesi della SM.

1.2. Patogenesi della sclerosi multipla: il ruolo dell'immunità adattiva e innata e delle cellule invariante natural killer (iNKT)

1.2.1. Ipotesi sulla patogenesi autoimmune

Come descritto nel paragrafo precedente (1.1.5), la caratteristica a livello istopatologico della SM è costituita dalla presenza di lesioni infiammatorie e di neurodegenerazione a carico del SNC. Tuttavia i meccanismi che conducono alla loro formazione sono attualmente sconosciuti e sono state proposte diverse ipotesi eziopatogenetiche, anche opposte tra di loro.

La SM è considerata ormai universalmente una malattia autoimmune il cui innesco è dato verosimilmente da linfociti autoreattivi che inducono risposte aberranti contro gli autoantigeni del SNC. Tuttavia non è chiaro se la SM sia innescata da una attivazione del sistema autoimmunitario a livello periferico o centrale¹⁷³.

Secondo l'ipotesi di attivazione "periferica" (modello "estrinseco") le cellule T autoreattive sarebbero attivate a tale livello mediante meccanismi di mimetismo molecolare o di attivazione più aspecifica, definita come "bystander"¹⁷⁴. I linfociti attivati dopo l'adesione alle pareti vascolari sarebbero in grado di superare la BEE e penetrare all'interno del SNC. Qui i linfociti sarebbero riattivati nuovamente da altre cellule APC, e attraverso il rilascio di citochine e chemochine, attiverebbero cellule residenti come microglia e astrociti e recluterebbero altre cellule immunitarie dalla periferia, compresi monociti, cellule T ma anche linfociti B^{201, 202}, con il risultato finale di infiammazione locale e danno ai tessuti¹⁷⁴. Ciò provocherebbe inoltre l'esposizione di ulteriori autoantigeni presenti all'interno del SNC e l'attivazione di altre cellule T autoreattive, che rafforzerebbero ulteriormente l'infiammazione e il danno tissutale¹⁷⁵.

In accordo con il modello estrinseco, gli studi effettuati nel modello animale dell'EAE hanno dimostrato che l'inoculazione di cellule T attivate ed immunizzate nel sangue periferico del topo sano contro la mielina ed altri antigeni riconosciuti come "bersaglio" (come la proteina Basica della Mielina o MBP, la proteina proteolipidica o PLP e la glicoproteina oligodendrocitaria della mielina o MOG)^{203,204,205,206,207}, risulta sufficiente a far sviluppare la malattia²⁰⁸.

In alternativa, secondo l'ipotesi di "attivazione centrale" (modello "intrinseco" di malattia), gli eventi intrinseci del SNC sarebbero in grado di innescare lo sviluppo della malattia, e l'infiltrazione di linfociti autoreattivi dalla periferia nel SNC sarebbe un fenomeno secondario. La natura precisa di questi eventi intrinseci del SNC è ancora sconosciuta, ma i meccanismi postulati includono risposte infiammatorie e un'infezione virale del SNC con processi che condurrebbero alla neurodegenerazione primaria, cioè guidata da cellule residenti nel SNC¹⁷³.

Nonostante l'evolversi delle conoscenze sui meccanismi immunitari alla base della SM, essa resta ancora oggi una malattia molto complessa, in cui i tipi di cellule e i recettori coinvolti, così come i meccanismi immunitari, sono numerosi e non tutti noti.

1.2.2. Ruolo dell'Immunità nella Sclerosi Multipla

Tradizionalmente, le risposte immunitarie sono state classificate dagli immunologi in due tipi: innate e adattative.

La SM è stata classificata storicamente come una malattia mediata dal sistema immunitario "**adattivo**", in cui le cellule T hanno il ruolo dominante nella cascata di eventi che portano al danno della mielina, all'infiammazione ed alla neurodegenerazione^{174, 209}.

Anche se lo stato dell'immunità "**innata**" e la sua relazione con i vari stadi di malattia non è stata ancora chiarita, si ipotizza che i componenti del sistema immunitario innato siano coinvolti in diversi passaggi della cascata autoimmune, quali l'attivazione dei linfociti T autoreattivi contro la mielina e lo sviluppo di complessi d'attacco di membrana nel SNC (*Lassmann, 2014*).

L'alterazione della risposta immune, in particolare delle cellule T autoreattive, è considerata alla base della cascata di eventi che portano a demielinizzazione, infiammazione e danno neuronale, anche se resta ancora molto da capire riguardo a come siano generati e controllati questi processi.

1.2.2.1. Immunità adattiva

Gli studi classici di immunologia riportano che le cellule T con profilo citochinico di tipo Th-1 (**cellule T helper-1 o CD4+**) possono essere isolate e clonate nel sangue periferico

dei pazienti con SM^{210,211}. Tali cellule sono state per molto tempo considerate le uniche responsabili del danno immunologico.

Le cellule **CD4+** sono in grado di riconoscere gli antigeni presentati sulle molecole MHC di classe II dalle APC, di migrare nel SNC e mediano il danno alla mielina sia direttamente, secernendo citochine pro-infiammatorie, sia richiamando altre cellule del sistema immunitario, quali le cellule B produttrici di anticorpi, macrofagi, cellule della microglia, mastociti. Tutte queste cellule contribuiscono a perpetuare l'infiammazione nel SNC, causando il danno neuronale.

Possono essere classificate in sottopopolazioni distinte a seconda delle citochine che secernono:

- le cellule **Th1**, che sono indotte da IL-12 e producono IFN- γ , coordinano la difesa dell'ospite contro gli agenti patogeni intracellulari;
- le cellule **Th2**, che secernono IL-4, IL-5 e IL-10, ma non IFN- γ , coordinano la difesa dell'ospite contro le infezioni parassitarie;
- le cellule **Th17**, che producono IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, coordinano la difesa dell'ospite contro le infezioni fungine.

Le cellule Th1 e Th17 sono le principali cellule implicate nella malattia, mentre le cellule CD4 + Th2 contro-regolano le risposte delle Th1 e Th17^{212,213,214,215}.

Le evidenze più stringenti a favore di questo scenario provengono dagli studi su modelli animali di EAE. Per lungo tempo si è ritenuto che le cellule T CD4+ che causano l'EAE avessero un profilo citochinico predominante di tipo Th-1. Gli esperimenti sugli animali suggeriscono che l'attivazione delle cellule T autoreattive CD4 + svolgano un ruolo fondamentale nel mediare l'infiammazione all'interno del SNC²¹⁶. Inoltre, l'importanza delle cellule T CD4 + nella SM è supportata dal fatto che la classe HLA II rappresenta il fattore di rischio genetico più forte per SM, probabilmente attraverso il ruolo di antigene-presentante molecole alle cellule CD4 + T patogene^{217, 218}.

Le cellule T **CD4+, di tipo Th-17** sono in grado di secernere IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22 e TNFa^{219, 220, 221}. Sebbene questa sottopopolazione di linfociti sia ancora oggetto di studi, nelle placche attive è stato riscontrato un elevato numero di cellule CD4+ e CD8+ positive per IL-17²²² così come è stata individuata un'elevata espressione di IL-17 da parte di linfociti ottenuti dal liquor²²³. Inoltre, i linfociti umani Th-17, sono in grado di promuovere il danno di barriera emato-encefalica (BEE) e causare la morte dei neuroni in vitro, sostenendo ulteriormente un loro ruolo patogeno²²⁴. Pur senza ridimensionare l'importanza delle cellule

Th-1 nella patogenesi della SM, queste osservazioni suggeriscono un ruolo cruciale anche delle cellule Th-17 per le patologie autoimmunitarie del SNC .

Un'altra popolazione recentemente identificata e con profilo funzionale di grande interesse è quella delle **cellule regolatorie T (T reg CD4+,CD25+)**, che esprimono il fattore di trascrizione Foxp3 e CD 25 e hanno il ruolo fisiologico di “sorveglianza” immunologica e determinano il mantenimento dell'omeostasi autoimmune²²⁵. Successivamente al primo studio del 2004²⁷, che suggeriva un potenziale difetto delle cellule Treg CD4+CD25+ circolanti in pazienti con SM, numerosi dati di letteratura hanno confermato ed esteso queste ricerche^{226,227,228}. E' stato inoltre possibile evidenziare una stretta correlazione tra cellule Treg e cellule Th-17: le cellule Treg possono essere riprogrammate a Th-17 in presenza di TGFβ e IL-6.

Anche i **linfociti CD8+** sono coinvolti nello sviluppo della SM: sono state infatti descritte da tempo alterazioni numeriche e funzionali delle cellule CD8+ nei pazienti con varie forme di malattia. In passato si riteneva che il loro coinvolgimento si esplicasse unicamente attraverso una riduzione della loro azione immuno-soppressiva, in favore della proliferazione delle cellule CD4+, mentre oggi si riconosce a questa popolazione cellulare un ruolo attivo nella patogenesi della SM^{212,229}. All'interno delle placche, le cellule CD8+ superano in numero le cellule CD4+ di circa 10 volte e il loro numero correla con l'entità del danno assonale²³⁰.

Le cellule T CD8+ mediano la soppressione della proliferazione dei linfociti CD4+, attraverso la secrezione di perforina, sostanza citotossica che conduce all'inattivazione delle cellule CD4+²³¹. Indirettamente, le cellule CD8+ interagiscono con le cellule presentanti l'antigene (APC), che a loro volta mediano l'inattivazione delle cellule CD4+. I linfociti CD8+ possono anche influenzare direttamente la malattia attraverso il riconoscimento di epitopi di classe I sulla superficie degli assoni, sono in grado di uccidere le cellule gliali, lasciando esposti gli assoni, di indurre la morte degli oligodendrociti e di promuovere la permeabilità vascolare²²⁹. L'isolamento dal sangue periferico o dal liquor di pazienti con SM delle cellule T, mostra un aumento selettivo in linfociti T CD8+ di memoria con espansione oligoclonale, indicando che queste cellule sono attivate e dirette contro un antigene specifico²³².

Sia i linfociti CD4+ che CD8+ possono esprimere sulla propria superficie cellulare un recettore (presente circa nel 25% dei Linfociti T circolanti), inizialmente associato alle cellule

NK, l'**PNK1.1 (o CD161)**, che conferisce ai Linfociti stessi proprietà funzionali peculiari^{233,234}. In particolare, le cellule **CD4+ CD161+** mostrano un fenotipo di cellule T della memoria sia effettrice che centrale, mentre le cellule **CD8+ CD161+** mostrano un fenotipo di cellule T prevalentemente della memoria effettrice. La maggior parte delle cellule che esprimono il CD161 sono risultate le CD8+²³⁵. Nel 2010 Billerbeck e coll. hanno dimostrato che l'espressione del CD161 nelle cellule CD8+ può essere ad alta (CD161++ o "bright") o bassa (CD161+ o "mild") intensità e che l'appartenenza all'una o all'altra tipologia conferisce funzioni diverse alle cellule. In particolare, solo il sottotipo CD8+CD161++ ha un profilo funzionale "Th17". Infatti, come i Linfociti TH17, esse secernono grandi quantità di citochine pro-infiammatorie, tra cui l'IL17, IL22, IFN- γ , inducono fattori di trascrizione ed esprimono recettori per citochine e per chemochine, tra cui il CCR2, CXCR6, CCR6, che conferiscono a queste cellule la capacità di raggiungere i siti dell'infiammazione (ovvero di fare "homing")²³⁶. Sono stati effettuati negli ultimi 10 anni studi nella SM^{237,238}, ma il loro potenziale ruolo nella patogenesi della malattia resta tuttora da chiarire.

E' sempre più evidente che non solo le cellule T, ma anche **le cellule B** giocano un ruolo patogenetico fondamentale nello sviluppo della SM²³⁹. Vi sono crescenti evidenze negli ultimi anni a favore del ruolo degli autoanticorpi e delle cellule B nella patogenesi della malattia. Nella SM l'importanza della risposta immune umorale è nota fin dai primi studi sul Liquor²⁴⁰, ma negli ultimi due decenni le conoscenze sul ruolo delle immunoglobuline, degli autoanticorpi, e dei disordini immunologici mediati dalle cellule B e T si sono ampliate grazie a studi eseguiti in vitro, in vivo e su modelli animali quali i topi transgenici e nelle varianti dell'EAE^{241,242,243,211}. Da questi studi è emerso come nella patogenesi delle malattie demielinizzanti immunomediate siano importanti sia la componente cellulare che quella umorale. I fattori che suggeriscono un ruolo patogenetico delle cellule B e degli anticorpi nella SM sono:

- La sintesi intratecale delle immunoglobuline (Ig), riscontrata nel liquor del 90-95% dei pazienti affetti da SM²⁴⁴;
- La presenza di cloni espansi di cellule B nelle lesioni croniche di SM e nel liquor²⁴⁵;
- L'identificazione istopatologica di demielinizzazione anticorpo-mediata²⁴⁶;
- Il riscontro di follicoli ectopici meningei contenenti centri germinativi nei pazienti con forma SP e infiltrazione meningale diffusa senza tali strutture nella forma PP¹⁸⁴;

○ L'efficacia di trattamenti che hanno come bersaglio le cellule B (anticorpi monoclonali anti CD20).

Le cellule B, oltre a produrre anticorpi, possono contribuire al danno tissutale come cellule presentanti l'antigene (APC)²⁴⁷ e rilasciando citochine²⁴⁸. A loro volta, gli anticorpi possono esercitare un effetto patogeno attraverso meccanismi di citotossicità complemento-mediata anticorpo-dipendente e di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente.

Studi immunoistochimici e molecolari hanno mostrato il coinvolgimento degli anticorpi nell'iniziale sviluppo della placca di demielinizzazione: è stato infatti riportato che la deposizione di Ig co-localizza con frammenti attivi del complemento ai bordi attivi delle placche²⁴⁹.

La specificità dell'antigene di queste risposte immunitarie è sconosciuta. Sono stati suggeriti alcuni antigeni "bersaglio" tra cui antigeni mielinici, ma anche antigeni non mielinici^{203,250}. Anticorpi contro i neurofilamenti sono stati identificati nel siero di pazienti con SM e sono stati reputati come responsabili del danno assonale, anche precoce^{251, 252,194}.

Il consenso generale è che, contrariamente ad altre malattie neurologiche, come la neuromielite ottica, non esiste uno, ma diversi autoantigeni implicati nella SM²⁵³.

1.2.2.2. Immunità innata

Le cellule dell'immunità innata, che comprendono i macrofagi, le cellule dendritiche ed i neutrofili, le cellule endoteliali ed epiteliali, la microglia, esprimono una specificità relativa poiché riconoscono dei profili molecolari presenti su microbi diversi (PAMP), ma non nelle cellule self. I PAMP vengono riconosciuti da recettori non clonali per tali profili di vario tipo, espressi sulle membrane di diversi compartimenti cellulari delle cellule dell'immunità innata, chiamati PRR (in particolare recettori Toll-like, TLR, recettori per il mannosio e della N-formil-metionina)²⁵⁴. Nella fase innata di una risposta immunitaria, le cellule riconoscono le molecole PAMP e vengono rapidamente attivate promuovendo rapide risposte dell'immunità innata, come la fagocitosi, la sintesi di peptidi antimicrobici e l'induzione di sintesi di ossido nitrico nei macrofagi. Inoltre secernono le citochine e le chemochine ed esprimono molecole co-stimolatorie, in modo da attivare i linfociti specifici, che poi iniziano la fase adattativa della risposta immunitaria²⁵⁵. A differenza dei macrofagi e delle cellule dendritiche, i linfociti usano recettori antigenici generati somaticamente e riconoscono epitopi antigenici specifici in un modo specifico ma temporalmente ritardato²⁵⁶.

Molti studi hanno posto attenzione sul ruolo che il sistema immunitario innato potrebbe avere nell'influenzare la comparsa o la progressione della Sclerosi Multipla. E' stato dimostrato infatti, che tutti i tipi di cellule innate sono coinvolte nei meccanismi dell'infiammazione all'interno del SNC ²⁵⁴.

Il ruolo funzionale di queste cellule nella malattia è stato descritto studiando il modello animale della SM²⁵⁷, che può essere pertanto considerata una malattia del sistema immunitario nella sua globalità²⁵⁸.

I fagociti mononucleari, come i macrofagi e la microglia, sono tra i più importanti attori cellulari che contribuiscono ai cambiamenti patologici nella SM. I fagociti mononucleari sono le principali cellule immunitarie situate nelle placche della SM nelle fasi iniziali e progressive della malattia e hanno un ruolo importante nell'infiammazione durante entrambe le fasi. Queste cellule possono esercitare effetti proinfiammatori ma anche effetti antinfiammatori e neuro-riparativi. Infatti, i fagociti mononucleari interagiscono con le cellule del sistema immunitario adattativo, come le cellule T e B, e sono responsabili del danno e della rimozione della mielina e delle lesioni assonali (ad esempio attraverso il rilascio di ossigeno reattivo). Inoltre, promuovono la soppressione della risposta immunitaria adattativa all'interno del SNC e la riparazione dei tessuti attraverso il rilascio di fattori di crescita neurotrofici. Queste azioni divergenti dei fagociti mononucleari sono probabilmente correlate, almeno in parte, alle loro origini e ai fenotipi distinti: i macrofagi derivanti da monociti sembrano avviare la demielinizzazione, mentre i macrofagi derivanti dalla microglia sembrano eliminare i detriti, promuovendo così la riparazione dei tessuti^{215,254, 255}.

Tra le altre cellule dell'immunità innata storicamente coinvolte nelle patologie autoimmuni sono comprese **le cellule NK**.

La scoperta dell'esistenza di questa popolazione cellulare ad attività citotossica "naturale" risale al 1970 quando, quasi simultaneamente a Stoccolma e a Los Angeles, due gruppi distinti di ricercatori osservarono la presenza di una popolazione cellulare ad attività litica non specifica, né ristretta dalle molecole MHC (per questo viene definita "natural"), nei confronti di cellule tumorali, in assenza di stimolazione preliminare in vivo o in vitro. La loro capacità citotossica è alla base della loro denominazione²⁵⁹. Questa linea cellulare è considerata parte fondamentale del sistema immunitario innato ed è rappresentata da linfociti primitivi, privi di recettori antigene-specifici e pertanto considerate le cellule meno specializzate del sistema immunitario, che eliminano tutto ciò che è riconosciuto come "non self"²⁶⁰. Le NK costituiscono circa il 10% dei linfociti nel sangue periferico e sono distinte, sulla base dell'espressione o meno dei recettori di superficie CD16 e CD56, in

CD56dimCD16+ (mature) e CD56bright CD16-(immature). Esprimono inoltre sulla superficie cellulare il recettore NK1.1 (o CD161), membro della famiglia dei recettori NKR-P1²⁶¹. Le funzioni delle NK sono molteplici e comprendono il controllo delle infezioni virali, la crescita tumorale e l'immunoregolazione. Il meccanismo d'azione è il medesimo e prevede, una volta avvenuto il contatto tra la cellula bersaglio e la cellula NK, la lisi della cellula stessa tramite la produzione di numerose citochine, tra cui l'IFN-g, il TGF-b, il TNF e le perforine²⁶².

La capacità di riconoscere e rispondere alle molecole MHC classe 1 rende queste cellule interessanti per lo studio della SM, ed infatti, negli ultimi 30 anni, un gran numero di studi sulle cellule NK hanno stabilito un loro ruolo significativo nella malattia^{174, 263,264,265}. La maggior parte delle ricerche indicano un deficit dell'attività citolitica delle NK nel sangue periferico dei pazienti con SM, altre hanno dimostrato che l'attività citotossica delle cellule NK nei pazienti con SM può essere “temporaneamente” ridotta e ciò correla con lo sviluppo di lesioni attive alla RMN o con la comparsa di ricadute cliniche²⁶⁶.

Più di recente, stanno assumendo grande interesse scientifico alcune popolazioni con caratteristiche strutturali peculiari, definite funzionalmente cellule a “ponte” tra l'immunità adattativa e quella innata, dette cellule *“innate-like”*, tra cui le cellule *NKT*, ed in particolare le *NKT invarianti (iNKT)*.

Le cellule “innate-like” appartengono a diversi sottogruppi di Linfociti T, ognuno dei quali possiede caratteristiche uniche e sono definite cellule dell'immunità innata con proprietà immunomodulanti e fungano in qualche modo da ponte tra immunità innata e adattativa^{267, 268}.

Infatti, pur essendo recettive a ligandi esterni attraverso il legame con i recettori specifici esse, quando devono rispondere rapidamente a degli stimoli, si comportano come cellule dell'immunità innata. Una volta attivate, queste cellule sono in grado di rilasciare, nell'arco di minuti o ore, una grande quantità di citochine, che possono a loro volta influenzare la forza e il carattere delle risposte immunitarie, attraverso l'interazione con cellule dendritiche, neutrofili, linfociti e spostando le risposte di citochine da/per diversi profili cellulari (Th1, Th2 o Th17).

Studi recenti dimostrano inoltre che le cellule innate-like possono regolare attivamente anche la risposta delle cellule T, influenzando in tal modo il sistema immunitario adattativo^{268, 269}. In sintesi, le cellule “innate-like” sono cellule multipotenti che lavorano al confine ed a ponte tra immunità innata e adattativa per evitare l'induzione, la propagazione, e

l'attivazione delle cellule T autoimmuni, anche se il ruolo specifico di queste cellule nella patogenesi di alcune malattie autoimmuni, tra cui la SM, resta ancora da chiarire.

1.2.3. Le cellule a ponte tra l'immunità innata ed adattativa: le cellule T natural killer (NKT) e il sottotipo invariante (iNKT)

1.2.3.1. Cellule T Natural Killer (NKT)

Le NKT rappresentano una sotto-popolazione di cellule T (circa il 15% di tutti i linfociti T circolanti) in grado di riconoscere antigeni glico-lipidici legati a molecole presentanti l'antigene (MHC) "non classiche" di tipo 1, chiamate "MHC-like"^{270,271}.

Il termine "NKT" era stato inizialmente introdotto per definire un sottotipo di Linfociti T circolanti (circa l'1%), che esprimevano un marcatore di superficie tipico delle cellule NK, chiamato NK1.1 (CD161)²⁷².

Successivamente, la classificazione delle NKT è risultata essere più complessa e sono state riconosciute a queste cellule proprietà strutturali e funzionali uniche ed è attualmente considerata una popolazione eterogenea suddivisa in due sottogruppi cellulari principali²⁷³:

- **NKT di tipo I, o cellule NKT invarianti (iNKT)**: caratterizzate principalmente dalla presenza di un recettore (TCR) **semi-invariante**, che riconosce glicolipidi presentati dalla molecola CD1d dell'MHC, come l' α -galattosilceramide (α -Galcer) (formando il complesso antigene- CD1d) . Nell'uomo rappresentano tra lo 0,001% e il 3% (di solito 0,01-0,1%) delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ma sono abbondanti nell'Omento (fino al 10%)²⁷⁴. Il numero cellule iNKT è controllato geneticamente²⁷⁵.

Il TCR α - β è costituito da una catena α invariante (V α 24-J α 18 nell'uomo) associata ad una catena β a riarrangiamento limitato (V β 11 nell'uomo). Mediante il TCR, le iNKT riconoscono molecole non proteiche presentate dal CD1d delle MHC non convenzionali²⁷¹ contrariamente ai linfociti T tradizionali e alle cellule Treg, e sono classicamente attivate dall'interazione con l'antigene glicolipidico α -galattosilceramide (α -GalCer), legato al CD1d²⁷⁶. Un certo numero di glicolipidi presenti sulle pareti cellulari dei batteri stimolano

l'attivazione del CD1 delle cellule iNKT, le quali potrebbero svolgere un ruolo nella difesa da batteri che non possono essere rilevati dal PRR²⁷⁷.

Oltre agli antigeni delle cellule NK, le cellule iNKT esprimono costantemente le molecole di superficie delle cellule CD25, CD69 e CD122, che sono caratteristiche delle cellule T effettrici e di memoria²⁷⁸.

- **NKT di tipo II:** riconoscono anch'esse glicolipidi presentati dal CD1d dell'MCH, ma non sono attivate/non rispondono all' α -Galcer. Esse hanno un TCR non "invariante", poiché possiedono un repertorio di catene α per il TCR più vario (associato ad una ristretta variabilità per la catena β) e riconoscono e rispondono ad antigeni come i sulfatidi o la lisofosfatidilcolina e altre molecole non lipidiche^{279,280}. Diversi studi hanno mostrato un ruolo di queste cellule nel modulare e sopprimere la risposta autoimmune²⁸¹, compresa la capacità di inibire la risposta di immuno-sorveglianza nei tumori²⁸², a differenza delle i-NKT tipo I, con le quali sembra che abbiano delle funzioni complementari²⁸³. Sono tuttavia molto difficili da identificare e da studiare per le loro caratteristiche strutturali (soprattutto per la mancanza di antigeni da utilizzare negli studi e diretti contro questo sottotipo di NKT), pertanto il loro ruolo nella risposta autoimmune resta tuttora controverso e poco chiaro²⁷³.

- "**NKT-like**", tra cui cellule con **TCR non invariante**, che riconoscono molecole presentate dal CD1a, CD1b, CD1c dell'MCH, che non sono attivate dall' α -Galcer e non legano molecole lipidiche. Il loro ruolo è riconosciuto nei processi infettivi, ma non in quelli immunologici.

1.2.3.2. Cellule T Natural Killer invariant (iNKT)

Le iNKT sono quindi caratterizzate principalmente dalla presenza del **TCR semi-invariante**, la cui interazione con il complesso antigene-CD1d rappresenta il momento cruciale per la loro attivazione e l'esplicazione delle varie funzioni. Tuttavia, gli stimoli presenti nel *microambiente* sono in grado di guidare la risposta mediata dalle *iNKT*, mediante l'interazione con recettori chemochinici presenti sulla loro superficie (come il CCR4 per le iNKT CD4+, il CCR1 e CCR6 per le CD4-,CD8-) o di contribuire all'attivazione delle iNKT mediante il rilascio di alcune citochine, come l' IL12 e l'IL18 secrete dalle MHC²⁸⁴. Questo passaggio accade quando l'interazione tra il TCR e il complesso CD1d-Antigene (self o non –

self) non è ad alta affinità e non è da solo sufficiente ad attivare la cellula i-NKT²⁸⁵. L'attivazione delle iNKT può avvenire pertanto sia mediante la via del TCR, che mediante stimolazione citochinica da parte del microambiente.

Segnali co-stimolatori provengono anche da cellule dendritiche, macrofagi, neutrofili e Linfociti T e B²⁸⁵.

In seguito all'attivazione, le iNKT iniziano a produrre una quantità elevata di citochine, promuovendo o sopprimendo la risposta immunitaria²⁸⁶.

Sulla base dell'espressione del CD4 e CD8 e del profilo citochinico che esse emettono, le iNKT mature possono essere *funzionalmente* suddivise in^{287,284}:

- **CD4+CD8-**, associate nell'uomo a risposte immunitarie **di tipo TH0** (cioè inducono il rilascio di citochine sia di tipo Th1 che Th2);
- **CD4-CD8-** (o **Double Negative**), che mostrano un chiaro profilo citochinico **di tipo TH1**;
- **CD4+CD8+** (o **Double positive**), cellule **immature** che esprimono già il recettore TCR, ma che non hanno ancora superato la fase di selezione positiva timica;

A questi due sottotipi più importanti si aggiungono i seguenti di più recente caratterizzazione:

- **CD4-CD8+** (presenti solo nell'uomo e non nel topo), che sembra abbiano funzioni citolitiche e di soppressione sulla proliferazione e l'espansione delle cellule T attivate;
- **CD4-CD8-, CD161+**, esprimono quindi solo il recettore CD161; sono state individuate più recentemente come sottotipo funzionale di iNKT, e sono caratterizzate dalla produzione di IL17 ad elevate quantità.

L'acquisizione di un profilo citochinico di tipo Th1 o Th2 è correlato con le diverse risposte funzionali delle iNKT, ed in particolare²⁷⁴:

1) la produzione di citochine pro-infiammatorie (di tipo TH1) come l'IFN- γ , l'IL12 e il TNF- α è correlata con le funzioni di risposta anti-tumorale e con la risposta innata nei confronti dei patogeni (*funzione effettrice*), verso cui agiscono come cellule dell'immunità innata, rappresentando la prima linea di difesa;

2) il rilascio di citochine del tipo TH2 (IL4, IL5, IL10 e IL13) è correlato con le funzioni di immuno-tolleranza, importanti per il controllo delle malattie autoimmuni (*funzione regolatoria*). L'immuno-tolleranza per le cellule iNKT, analogamente alle cellule T convenzionali, viene acquisita durante la fase di maturazione timica, durante la quale esse si

sottopongono ad una selezione positiva, mediante il riconoscimento di antigeni “self” presentati dalle MHC.

Un’associazione causale tra le iNKT e lo sviluppo di malattie è tuttora poco chiara. ma si può ipotizzare uno dei due seguenti meccanismi:

- *Difetti quantitativi o qualitativi delle iNKT*, che si pensa possano compromettere la regolazione immunitaria ed aumentare la predisposizione dell’individuo a malattie autoimmuni (come il diabete tipo 1, l’Artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico e la sclerosi multipla), tumori (sia solidi che della linea ematologica) ed alcune infezioni (Tubercolosi, malattia di Lyme);

- *Inappropriata attivazione delle cellule iNKT (ruolo patogenetico diretto o indiretto)*, in cui le cellule iNKT, normali in numero e funzionalmente competenti, potrebbero rispondere in modo improprio agli antigeni glicolipidici sia “self “ che non, oppure a stimolazioni citochiniche. Questo processo potrebbe contribuire alla patogenesi di diverse malattie, tra cui l’asma e le allergie, nonché allo sviluppo della GVHD (“graft versus host disease”).

La maggior parte delle evidenze dirette che supportano l’ipotesi di un coinvolgimento delle iNKT nelle malattie autoimmuni provengono da studi effettuati sul modello animale, completamente depleto di cellule iNKT²⁸⁸. Studi più recenti sull’uomo hanno riportato una correlazione tra carenza di iNKT e insorgenza di malattie autoimmuni, tumori e infezioni^{289, 290}. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, gli studi portano a risultati contraddittori.

Un problema rilevante è che in molti studi condotti sull’uomo sono stati utilizzati metodi non accurati per l’identificazione delle cellule iNKT e che solo pochi studi sono stati portati a termine, e con scarsi risultati, in merito alla distribuzione e/o funzione dei diversi sottogruppi di iNKT.

Negli studi clinici sono stati spesso utilizzati metodi sostitutivi poco specifici per l’identificazione le cellule iNKT. Per esempio, l’identificazione di queste cellule in base all’espressione di marcatori associati alle cellule NK (come il CD56 e CD161) da parte delle cellule T è insufficiente, perché non tutte le cellule che esprimono questi marcatori hanno le caratteristiche funzionali tipiche della linea cellulare NKT e non tutte le cellule NKT esprimono gli antigeni cellulari delle NK²⁸⁴. Le cellule NKT di tipo 1 umane sono meglio identificabili se vengono utilizzati reagenti che si legano al TCR semi-invariante (V α 24-J α 18, V β 11). L’identificazione delle diverse sottopopolazioni di NKT è quindi importante, perché la

semplice enumerazione può non identificare difetti di sottogruppi specifici, che potrebbero influenzare la funzione delle cellule NKT e contribuire allo sviluppo di malattie.

La **Tabella 1.4.** riassume le caratteristiche principali fenotipiche e funzionali descritte delle iNKT umane.

1.2.3.3. iNKT e Sclerosi Multipla

Dati ottenuti dagli studi sul modello animale della SM, l'EAE, hanno dimostrato che vi è una correlazione inversa tra numero delle cellule iNKT, la loro capacità di produrre citochine TH2 (come l'IL4) e la suscettibilità allo sviluppo della malattia^{291,292}. Inoltre, in diversi studi funzionali effettuati sia in vitro che sul modello animale, è stato riportato un ruolo protettivo dell' α -Galcer nei confronti dello sviluppo dell'EAE, attraverso la produzione di citochine TH2 da parte delle iNKT^{292,293}. La sede e la modalità di somministrazione dell' α -Galcer, nonché la fase della malattia influiscono sulla capacità di agire da parte dell' α -Galcer nell'EAE^{293,294}.

Il meccanismo d'azione delle cellule iNKT in questi processi restano ancora poco chiari, tuttavia è stato dimostrato che le iNKT possono inibire la risposta citochinica TH1 e TH17, inducendo una risposta TH2 mediata, e ciò previene l'EAE^{295,296}.

Alcuni autori hanno dimostrato che le iNKT influenzano il decorso dell'EAE, mediante il rilascio di citochine come l' IL-4 e l'IL-10, che inibiscono la risposta TH1 mediata, ma non la risposta Th17²⁹⁷.

Altri autori hanno inoltre dimostrato un effetto protettivo delle iNKT nell'EAE, indipendentemente dalla produzione dell'IL4, ma per esempio per inibizione della produzione di IFN- γ -specifico, che modula comunque una risposta Th1 indipendente da IL-4 e dal CD1d^{298,299}.

Più recentemente, è stato osservato che le cellule iNKT impediscono l'EAE inibendo la differenziazione delle cellule T naive CD4 + in cellule effettrici Th1 e Th17, e che l'IL-4, IL-10 e IFN- γ sono necessari per controllare la risposta Th17²⁹⁶.

Un altro studio ha dimostrato che un analogo glicolipido sintetico dell' α -GalCer induce una produzione predominante di IL-4 dalle cellule iNKT portando alla soppressione dell' EAE²⁹³. Ciò è d'accordo con l'osservazione che le cellule iNKT attivate da α -GalCer proteggono i topi suscettibili contro l'EAE sopprimendo le risposte Th1 specifiche e promuovendo le risposte Th2 specifiche e che sia IL-4 che IL-10 hanno un ruolo in tali meccanismi²⁹².

Il ruolo delle cellule iNKT che producono IFN- γ è invece tuttora meno chiaro²⁹⁴.

È stato anche dimostrato che alterando la composizione della flora intestinale per somministrazione orale della miscela di antibiotici non assorbenti, come la kanamicina, la colistina e la vancomicina hanno migliorato lo sviluppo di EAE e che questo effetto dipende dalle cellule iNKT³⁰⁰.

In definitiva, tutti gli studi sul modello animale stabiliscono un ruolo delle cellule iNKT nella patogenesi della EAE, attraverso la produzione di citochine pro o anti-infiammatorie che attivano o inibiscono la risposta di altri tipi di cellule T.

Nell'uomo sono stati finora effettuati pochi studi riguardanti il ruolo delle cellule iNKT nella SM e con risultati spesso contrastanti. Diversi studi hanno valutato sia la frequenza che le funzioni delle cellule iNKT nei pazienti con SM e sono stati riportati deficit delle cellule iNKT sia in termini numerici che funzionali, sostenendo un ruolo attivo di queste cellule nello sviluppo della malattia.

In particolare, nei primi studi effettuati con tecniche di PCR ("Polymerase chain reaction") e SSCP ("single-strand conformation polymorphism"), usate per studiare l'espressione e il repertorio del TCR delle iNKT, è stata confermata la riduzione delle iNKT nei pazienti con SM³⁰¹. Illes ha dimostrato in particolare che le iNKT totali erano ridotte nel sangue periferico di pazienti con SM, soprattutto nelle fasi di remissione della malattia. Più recentemente, per lo studio delle iNKT circolanti nel sangue periferico nei pazienti con SM, sono state utilizzate tecniche di citometria a flusso. Il primo studio condotto con questa tecnica³⁰² si proponeva di studiare la frequenza e il fenotipo citochinico delle iNKT CD4+ e CD4- e la risposta alla stimolazione in vitro con α -Galcer, confrontando pazienti con SM, (suddivisi in due gruppi: in remissione e in fase di ricaduta) verso i controlli. In tale studio è emerso che vi era una significativa riduzione delle iNKT totali nei pazienti con SM rispetto ai controlli e la riduzione nel numero di queste cellule era più pronunciata nei pazienti in fase di remissione rispetto a quelli in fase di ricaduta di malattia. Le iNKT DN erano ridotte maggiormente nei pazienti con SM in fase di attività, rispetto ai pazienti in remissione, mentre le cellule iNKT CD4+ non differivano significativamente tra SM e controlli. Tuttavia, la produzione di citochine da parte di cellule iNKT CD4+ con profilo Th2, quale l'IL4, era maggiore nei pazienti con SM in fase di remissione rispetto ai controlli e ai pazienti in fase di ricaduta, mentre le cellule CD4- non avevano una produzione particolarmente aumentata di citochine del tipo Th1 o TH2. Successivamente, anche altri studi hanno confermato una riduzione delle iNKT DN ed un profilo citochinico del tipo Th2 delle iNKT CD4+ nei pazienti SM non in fase di ricaduta clinica²⁸⁴.

In base a queste osservazioni, è stato ipotizzato che la riduzione delle cellule iNKT, osservata nel sangue periferico di pazienti con SM, potesse essere il risultato di un “trasferimento” di queste cellule all’interno del SNC, ma tale ipotesi non è stata confermata da altri studi che riportano invece una bassa percentuale di iNKT nel SNC³⁰¹.

A differenza di quanto finora descritto, in uno studio di *O’Keeffe* e coll.³⁰³ è emerso che le cellule iNKT erano aumentate nei pazienti con SM rispetto ai controlli e rispetto ai pazienti con altre patologie neurologiche. All’interno dei vari sottogruppi di pazienti, solo quelli con forme RR e non quelli con forme PP o SP, presentavano un aumento delle iNKT. Dopo stimolazione con α -Galcer in vitro, la maggior parte delle cellule iNKT dei pazienti risultavano però anergiche. Lo studio si concludeva con l’osservazione che, probabilmente, le differenze nei risultati possono risentire delle diverse metodiche utilizzate per il rilevamento di queste cellule: PCR, citometria a flusso e analisi dell’mRNA. L’estensione di questo studio³⁰⁴ ha confermato che, mentre la risposta all’ α -Galcer in vitro nei soggetti sani induce l’aumento delle cellule iNKT e la produzione di citochine del tipo TH1, TH2, e TH17, tale risposta non si ottiene invece nei pazienti con varie forme di SM.

L’importanza delle iNKT nella SM è stata ulteriormente enfatizzata dall’osservazione che il trattamento dei pazienti con IFN- β aumenta significativamente le percentuali di cellule NKT V α 24+, e che, in risposta al farmaco, le cellule iNKT aumentano la secrezione di alcune citochine (IL-4, IL-5 e IFN- γ) in risposta alla stimolazione antigenica, con una presentazione dell’antigene più efficiente da parte delle APC. Per tale motivo, l’effetto dell’IFN- β sull’immunoregolazione potrebbe esplicarsi, almeno in parte, mediante la modulazione dell’attività delle cellule iNKT³⁰⁵.

Sulla base di quanto finora espresso, è ipotizzabile un’associazione tra le iNKT e la SM, mentre i risultati spesso contrastanti degli studi finora eseguiti potrebbero essere spiegati con i limiti metodologici utilizzati, quali l’utilizzo di varie metodiche e diversi marcatori di superficie per identificare le iNKT, o l’utilizzo negli studi funzionali di pattern citochinici sempre diversi e ristretti. Anche la selezione dei pazienti spesso non è stata sufficientemente accurata e, comunque, tutti gli studi hanno preso in considerazione pazienti con forme RR di malattia, mentre non è mai stato preso in considerazione il potenziale contributo delle iNKT nelle altre forme di SM.

Ad oggi, pochissimi studi hanno inoltre esaminato l’effetto dei farmaci immunomodulanti come l’IFN- β , il glatiramer acetato o il natalizumab sulle cellule iNKT né, han preso in considerazione l’analisi di un marcatore potenzialmente cruciale, quale il CD161, che è espresso approssimativamente nel 15% delle cellule T umane.

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Sebbene sia accertato il ruolo patogenetico dei meccanismi autoimmuni nella SM, non sono stati ancora individuati ad oggi marcatori immunologici di malattia che aiutino nella diagnosi e a predirne il decorso.

Oltre all'immunità adattativa mediata da linfociti T e B, anche l'immunità innata sembra essere sempre più implicata nella patogenesi della malattia.

Inoltre, recenti studi scientifici sostengono il coinvolgimento attivo di cellule funzionalmente “a ponte” tra l'immunità adattativa e quella innata, nel regolare le risposte autoimmuni.

Queste includono le cellule iNKT, una rara popolazione di linfociti T che esprimono un TCR semi-invariante, che riconosce antigeni glicolipidici presentati dalla molecola CD1d delle MHC non convenzionali, ed una varietà di altri recettori comunemente associati alle cellule NK, e che producono grandi quantità di citochine una volta attivate, mediando varie risposte immunitarie.

Nei pazienti con SM è stata descritta un'alterazione del numero e dell'attività di queste cellule, tuttavia gli studi condotti fino ad oggi restano esigui e spesso con risultati contrastanti.

Quindi, non è ancora chiaro se le iNKT esercitino un ruolo protettivo o proinfiammatorio e dannoso e occorre una caratterizzazione più completa della cellula iNKT per chiarire il loro coinvolgimento nella SM.

Il presente studio si propone pertanto di valutare la presenza di alterazioni quantitative e qualitative delle cellule iNKT presenti nel sangue periferico di pazienti affetti da varie forme di SM e sottoposti a diversi trattamenti immunomodulanti, di caratterizzare le loro attività funzionali osservando eventuali differenze sia nelle diverse forme cliniche sia in relazione al trattamento con le terapie immunomodulanti, e di correlare infine i dati immunologici con i principali parametri clinici.

In particolare, mediante il metodo della citometria a flusso policromatica, si intende valutare la presenza di eventuali differenze nel numero assoluto e nella percentuale delle cellule iNKT e delle principali sottopopolazioni (CD4+, CD8+, CD161++) in pazienti con diverse forme di SM, in pazienti con SM-RR non trattati con farmaci immunomodulanti e in pazienti con SM-RR in trattamento da almeno sei mesi con tali farmaci.

Inoltre si vuole caratterizzare il profilo funzionale dei diversi sottotipi di iNKT identificati con metodi rigorosi, ovvero la loro capacità di produrre, una volta stimulate, diverse citochine con proprietà sia pro- che antiinfiammatorie.

I dati immunologici saranno successivamente correlati con i parametri clinici, per valutare l'esistenza di correlazioni tra sottotipi cellulari e forma di malattia.

Infine, ci si propone di studiare se i trattamenti immunomodulanti siano in grado di modificare la frequenza e il fenotipo delle cellule iNKT nei pazienti affetti da SM, confrontando i parametri immunologici prima di iniziare il trattamento (tempo 0), con quelli ottenuti dopo 6 e 12 mesi di terapia e di correlare i dati immunologici ottenuti, pre e post-trattamento, con i parametri clinici (es. tasso di recidive, EDSS).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Selezione dei pazienti

Tra tutti i pazienti seguiti presso il “Centro per le malattie demielinizzanti” della Clinica Neurologica dell’ “Ospedale Civile Sant’Agostino Estense” di Modena, sono stati arruolati nello studio 165 pazienti, selezionati sulla base dei seguenti criteri di inclusione: età compresa tra i 18 e i 65 anni, diagnosi di Sclerosi Multipla formulata secondo i criteri di McDonald del 2010⁹⁷.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con SM che avevano assunto cortico-steroidi o farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) nelle 48 h precedenti, pazienti con infezioni concomitanti (sindromi influenzali o infezioni batteriche) e pazienti che avevano presentato una ricaduta clinica entro il mese precedente e che erano stati trattati con terapia steroidea.

In particolare, sono stati arruolati i seguenti gruppi di pazienti:

- 17 pazienti con recente diagnosi di SM-RR, arruolati prima dell’inizio del trattamento con farmaci immunomodulanti e dopo 6 e 12 mesi di terapia. Questo gruppo è stato classificato come RR-“attive” (ARR), tenendo conto della recente revisione dei fenotipi clinici di malattia⁸⁸. In particolare, l’attività di malattia è stata determinata valutando le recidive cliniche e/o l’attività alla RM (lesioni che aumentano il contrasto, lesioni nuove/ingrandite alle scansioni T2) nell’anno precedente;
- 19 pazienti con SM-RR, non trattati con farmaci immunomodulanti da almeno sei mesi e senza attività di malattia clinica e neuroradiologica nell’anno precedente⁸⁸. Questo gruppo è stato classificato come RR- “non attive” (NARR);
- 85 pazienti con SM-RR trattati con DMT da almeno sei mesi: 31 pazienti in terapia con IFN beta 1-a; 29 pazienti in terapia con glatiramer acetato (GA) e 25 trattati con natalizumab (NAT);
- 24 pazienti con SM-SP non trattati con farmaci immunomodulanti/immunosoppressori da almeno sei mesi, che non avevano ricadute cliniche da almeno due anni e che non erano eleggibili al trattamento con farmaci approvati per tale forma di malattia;
- 20 pazienti con SM-PP, non trattati con farmaci immunomodulanti/immunosoppressori da almeno sei mesi.

L'analisi polifunzionale è stata effettuata su un campione rappresentativo di 57 pazienti appartenenti ai seguenti gruppi: 13 pazienti RR trattati con NAT, 11 con GA, 12 con IFN; 5 pazienti con NARR, 4 con PP, 12 con forma SP e 26 controlli (CTR).

Sono stati inoltre arruolati come controlli 55 soggetti sani, divisi in due sottogruppi sulla base dell'età media: gruppo “young” (39 soggetti) con età media di 34,7 anni ($ES \pm 1,1$) e gruppo “old” (16 soggetti) con età media di 53,8 anni ($ES \pm 1,5$), così da poter essere equiparati ai diversi sottogruppi di pazienti che presentavano età medie molto differenti tra loro (com'è prevedibile dalla storia naturale della malattia). Tali soggetti non presentavano storia di malattie autoimmuni e non assumevano farmaci immunomodulanti o immunosoppressori.

Lo studio è stato sottoposto e approvato dal comitato etico locale di Modena (n°246/12) e al momento dell'arruolamento ogni paziente o soggetto di controllo ha firmato il consenso informato alla partecipazione e alla donazione di un campione di sangue prelevato dalla vena radiale.

3.2. Raccolta dei dati clinici

3.2.1. Studio trasversale “cross-sectional”

Sono state raccolte le seguenti variabili di tipo demografico, clinico e di RM: età, sesso, età all'esordio della malattia, sintomi all'esordio, durata di malattia, disabilità clinica misurata mediante la scala EDSS⁸¹, delta-EDSS nell'anno precedente, ultima ricaduta clinica, tasso annuale di ricadute (ARR), “MS Severity Score” (MSS)³⁰⁶. Allo scopo di definire la fase di attività o di stabilità di malattia, sono state anche raccolte informazioni relative all'ultima RM cerebrale e spinale eseguita, tra cui la presenza di nuove lesioni pesate in T2, la presenza di lesioni Gd+ ed il tempo intercorso rispetto alla precedente RM usata per confronto.

3.2.2. Studio longitudinale

I pazienti che hanno partecipato allo studio longitudinale, arruolati prima di iniziare il trattamento con farmaci immunomodulanti di prima linea (IFN o GA), sono stati seguiti per un anno ed hanno ripetuto il prelievo di sangue venoso periferico a sei e dodici mesi. E' stata

prevista per questi pazienti una valutazione neurologica ogni 6 mesi o prima, in caso di ricaduta.

Sono stati raccolti i seguenti dati, oltre a quelli basali: EDSS a 6 e 12 mesi, delta-EDSS e ARR durante l'anno di terapia. Sono stati inoltre applicati *i criteri modificati di Rio a un anno di trattamento*³⁰⁷, che unificano i criteri clinici e di RM, applicando un punteggio (score=0, se nuove lesioni in T2 $\leq$ 4 e ricadute cliniche=0; score=1, se nuove lesioni in T2 $\leq$ 4 e ricadute=1, o se lesioni in T2 $>$ 4 e ricadute cliniche=0; score=2, se nuove lesioni in T2 $\leq$ 4 ma ricadute cliniche $\geq$ 2 oppure se lesioni in T2 $>$ 4 ma ricadute cliniche = 1; score 3= se nuove lesioni in T2 $>$ 4 e ricadute cliniche $\geq$ 2). Sono stati considerati “responders” alla terapia, i pazienti che, dopo un anno di trattamento, avevano un “Rio score” compreso tra 0-1, mentre i pazienti che avevano interrotto il trattamento per iniziare una terapia di seconda linea o con “Rio score” di almeno 2, sono stati classificati come “non responders”. Il “disability progression” è stato valutato come un incremento di almeno 1 punto all'EDSS (0,5 se l'EDSS iniziale era maggiore di 6), confermato a 6 mesi, o come l'interruzione o il cambio di terapia dovuto al fallimento della terapia in atto.

3.3. Procedure di laboratorio

3.3.1. Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico e citometria a flusso policromatica

Previa firma di consenso informato, ogni paziente è stato sottoposto a prelievo di sangue venoso periferico (10 ml) da vena radiale, raccolto in provette contenenti acido etildiamminotetracetico (EDTA).

In tutti i campioni, è stata eseguita la conta dei linfociti CD3+, usando il KitCD3 “Easy Count” (che non prevede l'utilizzo di reagenti lisanti e la necessità di lavaggi per la conta assoluta delle cellule T) e il citofluorimetro CyFlow Counter (Partec, Münster, Germany). Dopo aver isolato le cellule mononucleate del sangue periferico (“peripheral blood mononucleated cells” o PBMC) secondo protocolli standard, queste sono state immediatamente processate per l'analisi immuno-fenotipica.

Per eseguire la citometria a flusso policromatica, le cellule mononucleate isolate dal sangue periferico sono state marcate con un cocktail di anticorpi monoclonali, precedentemente preparato, che riconosce gli antigeni di superficie dei vari sottotipi cellulari.

Sono stati utilizzati i seguenti Anticorpi: anti-TCR V α 24J α 18 (clone 6B11), -CD4 (clone RPA-T4), -CD8 (clone RPA-T8), -CD161 (clone DX12), -CD3 (clone UCHT1) (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), -CD19 (clone J3-119) e -CD14 (clone RMO52) (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA).

Le cellule sono state lasciate in incubazione per 20 minuti al buio a temperatura ambiente (20°), successivamente lavate in PBS (Phosphate buffer saline), ri-sospese in PBS ed immediatamente acquisite dal citofluorimetro.

Sono stati acquisiti almeno 10 milioni di eventi per campione, utilizzando l'Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer (Attune NxT, ThermoFisher). I dati sono stati acquisiti in "list mode" con il software "Attune Cytometric" (versione 1.2.5), e analizzati con FlowJo 9.8.1 (Tree Star Inc., Ashland, OR) con MacOS X.

L'analisi fenotipica delle cellule CD8+CD161+ e delle cellule iNKT con le sue sottopopolazioni è stata eseguita seguendo la strategia di "gating" (vedi sezione risultati).

3.3.2. Produzione in vitro di citochine da parte delle cellule iNKT

Per i test funzionali, le PBMC fresche isolate sono state stimulate per 4 ore a 37 ° C in atmosfera con concentrazione di CO₂ al 5%, con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (200 ng / mL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) ionomicina (1 mg / mL, Sigma-Aldrich) in mezzo di coltura (RPMI 1640 integrato con 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di L-glutamina, 1% di piruvato di sodio, 1% aminoacidi non essenziali, 1% di antibiotici, 1% di HEPES 0,1 M, 55 μ M β -mercapto-etanolo). Per ogni campione, almeno 5 milioni di cellule sono state lasciate non stimulate come controllo negativo e almeno 15 milioni di cellule sono state stimulate. Tutti i campioni sono stati incubati con un inibitore di trasporto proteico contenente brefeldina A (Golgi Plug, BD).

Dopo 4 ore di stimolazione, le cellule sono state marcate con la sonda Live Dead Aqua (ThermoFisher) e con il seguente cocktail di anticorpi monoclonali : anti-TCR V α 24J α 18 PE (da BD) -CD3 PE-Cy5, -CD4 AF700 e -CD8 APC-Cy7 (da BioLegend, San Diego , California, USA). Le cellule sono state poi lavate con tampone (BD) e fissate e permeabilizzate con il set di tampone citofix/ citoperm (BD) per la rilevazione della citochina. Infine, le cellule sono state marcate con Anticorpi che riconoscono **IL-17A** BV421 (clone BL168), **TNF- α** BV605 (clone MAb11), **IFN- γ** FITC (clone B27) e **IL-4** APC (clone 8D4-8) (tutti da BioLegend).

I dati sono stati acquisiti in “list mode” con il software “Attune NxT 2.1” e analizzati da FlowJo 9.8.5 (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA) sotto Mac OSX. I campioni sono stati compensati dal software dopo l'acquisizione. La singola colorazione e la fluorescenza sono stati eseguiti per tutti gli anticorpi del pannello per impostare la compensazione corretta e definire i segnali positivi.

3.4. Analisi statistiche

Le variabili quantitative sono state confrontate con il test U di Mann-Whitney, test non parametrico.

Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$, tranne in caso di analisi multiple, quando è stata applicata la correzione di Bonferroni. I dati sono rappresentati come la media $\pm$ errore medio standard.

La valutazione delle possibili correlazioni tra i parametri clinici ed immunologici è stata eseguita con il test delle correlazioni di Spearman (livello di significatività stabilito : $p < 0.025$) e con l'analisi di regressione lineare.

Per lo studio longitudinale le correlazioni tra i dati immunologici dei pazienti prima di iniziare un trattamento e dopo sei e dodici mesi di terapia sono state eseguite mediante un t test non parametrico e mediante il test ANOVA.

Tutte le analisi di cui sopra sono state eseguite dai software Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA) e STATA 13.0 (College Station, TX).

Per analizzare i dati di citometria a flusso policromatica è stata utilizzata una presentazione semplificata del software di valutazione incredibilmente complesso (versione 5.3, fornita gentilmente dal Dott. Mario Roederer, Vaccine Research Center, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland, USA)^{308,309}.

Per l'analisi della funzionalità delle cellule iNKT, è stata impostata una soglia dello 0,05% sulla base della distribuzione dei valori negativi generati dopo la sottrazione di sottofondo^{310,311}.

4. RISULTATI

4.1. Popolazione in esame

Sono stati arruolati in totale 165 pazienti con SM, di cui 17 con SM-RR e diagnosi recente di malattia, “naive” a qualsiasi trattamento immunomodulante. In questo gruppo di pazienti è stata determinata anche un’attività di malattia recente valutando le recidive cliniche e/o l’attività alla RM, e pertanto i pazienti sono stati classificati come “attivi”(ARR), secondo i nuovi criteri dei fenotipi clinici ⁸⁸. In contrapposizione a questi, abbiamo arruolato 19 pazienti con SM-RR senza riscontro di attività di malattia clinica e neuroradiologica recente; questo gruppo è stato classificato come RR-“non attive”(NARR). Negli altri gruppi sono stati arruolati: 85 pazienti con forma RR in terapia da almeno sei mesi con farmaci immunomodulanti (31 in IFN, 29 in GA e 25 in NAT); 24 pazienti con forma SP che non avevano ricadute cliniche da almeno due anni e che non erano eleggibili al trattamento con farmaci approvati per tale forma di malattia e 20 pazienti con forma PP non in terapia immunomodulante o immunosoppressiva.

In particolare, per i pazienti di nuova diagnosi, **l'attività di malattia** al momento dell'arruolamento è stata valutata considerando il tempo medio (in mesi) dall'ultima ricaduta clinica ($7,05 \pm 9,5$) e il tempo medio intercorso dall'ultima RM cerebrale e/o spinale che mostrasse nuove lesioni assumenti il Gadolinio ($1,5 \pm 1,07$) rispetto ad un precedente esame. Considerando entrambi i parametri (ricaduta clinica o nuove lesioni alla RM recente) i pazienti avevano presentato in media negli ultimi 45 giorni una documentata attività di malattia (in mesi: $1,7 \pm 1,18$).

Allo stesso modo, per i pazienti classificati come “non attivi”, **la stabilità della malattia** al momento del prelievo è stata documentata considerando il tempo medio (in mesi) dall'ultima ricaduta clinica ($129,06 \pm 79$) e l'ultima RM cerebrale e/o spinale risultata stazionaria rispetto (ad almeno) un precedente esame (20 ± 17). Unificando entrambi i parametri si può affermare che questi pazienti non presentavano ricadute cliniche o attività alla RM in media da circa sei anni (in mesi: 75 ± 42).

L'analisi funzionale delle iNKT è stata effettuata su un campione rappresentativo di 57 pazienti appartenenti ai seguenti gruppi: 13 pazienti RR trattati con NAT, 11 con GA, 12 con IFN, 5 pazienti con RR non attiva (NARR), 4 con PP, 12 con forma SP e 26 controlli (CTR).

Da sottolineare che l'età media di tutti i pazienti arruolati (43 M, 122 F) era di $45,1 \pm 11,6$ anni, ma analizzando tale dato nei vari sottogruppi di pazienti è emerso che l'età media era minore nei pazienti con diagnosi recente di SM ($35,5 \pm 8,7$) e nei pazienti RR in trattamento con i diversi farmaci immunomodulanti (gruppo in IFN: $42,9 \pm 8,4$; gruppo in GA: $40,7 \pm 8,2$; gruppo in NAT: $35,5 \pm 9,7$) rispetto ai pazienti con storia RR non attiva ($51,1 \pm 7,7$), ai pazienti con forma secondariamente ($55,7 \pm 7,9$) e primariamente progressiva ($57,2 \pm 7,4$) di SM. Tale dato è in linea con i dati di letteratura e con la storia naturale della malattia.

Abbiamo pertanto arruolato due gruppi di controllo, di cui il gruppo “young” (di 39 soggetti) con età media pari a 34,7 anni ($ES \pm 1,1$), equiparabile per età al gruppo dei pazienti con età media inferiore. e il gruppo “old” (di 16 soggetti) con età media pari a 53,8 anni ($ES \pm 1,5$), equiparabile per età al gruppo dei pazienti con età media maggiore.

Non sono emerse differenze statisticamente significative nei parametri immunologici dei soggetti appartenenti ai due gruppi di controllo.

Le caratteristiche demografiche e cliniche di tutti i pazienti arruolati sono mostrate nella **Tabella 4.1**.

Dei 19 pazienti arruolati inizialmente nello studio longitudinale, 2 pazienti hanno interrotto il trattamento per comparsa di effetti collaterali (uno per intolleranza cutanea e uno per rialzo enzimi epatici) prima dei 12 mesi e sono pertanto usciti dallo studio.

Dei 17 pazienti rimasti nello studio, 3 hanno interrotto il trattamento durante l'anno di follow up per inefficacia (ricadute cliniche o aumento del carico lesionale alla RM) eseguendo uno shift terapeutico, e pertanto li abbiamo classificati, sulla base dei criteri di Rio³⁰⁷ come “non responder”. Per questi ultimi, che non hanno completato i 6 o 12 mesi di terapia, i dati immunologici non sono stati analizzati in questo studio.

Abbiamo raccolto per tutti i pazienti le variabili cliniche di EDSS a 6 e 12 mesi, il delta-EDSS e il delta ARR (annualized relapse rate, ovvero il numero ricadute in un anno) riferito ai 12 mesi di follow up; sono stati inoltre applicati i criteri modificati di Rio ad un anno di trattamento per valutare i “non responder” ed i pazienti con progressione di disabilità.

Quattordici pazienti hanno completato i 12 mesi di trattamento, di questi 8 pazienti sono stati posti in terapia con IFN β e 6 con GA. Per questi pazienti sono state effettuate le analisi immunologiche.

I dati del follow-up a 6 e 12 mesi nei pazienti RR di nuova diagnosi sono mostrati nella **Tabella 4.2**.

4.2. Identificazione delle cellule NKT invarianti

Per identificare le cellule iNKT circolanti, la cui percentuale nel sangue periferico è tipicamente molto inferiore all'1%. è mandatorio acquisire un numero enorme di cellule³¹². Pertanto, per l'analisi fenotipica e funzionale è stato utilizzato un nuovo citometro acustico in grado di allineare le cellule nella camera di flusso utilizzando ultrasuoni e acquisire fino a 35.000 eventi / secondo. Questo è stato cruciale per ottenere il numero di cellule necessarie per un'analisi statistica corretta (> 5 milioni).

La strategia di “gating” utilizzata per identificare le cellule iNKT e i vari sottotipi cellulari è mostrata nella **Figura 4.3**, ed è riferita a 22 milioni di cellule.

La parte iniziale dell'acquisizione è stata rimossa dall'analisi per evitare eventuali instabilità del flusso. Un “gate” è stato impostato per identificare le cellule viventi, cioè quelle negative per la colorazione con la sonda Live Dead.

I linfociti T sono stati identificati con la positività per il CD3 e negatività per i CD14 e CD19, marcatori inclusi nel canale DUMP per eliminare rispettivamente i monociti e le cellule B.

Le cellule iNKT sono state identificate in base alla presenza della catena V α 24J α Q del TCR.

Sulla base dell'espressione o meno del CD4 e CD8, sono stati identificati i tre sottotipi di cellule iNKT: CD4 +, CD8 + e CD4-CD8-.

In ogni sottotipo cellulare di iNKT è stata valutata inoltre l'espressione del CD161.

4.3. Il fenotipo delle cellule NKT invarianti cambia nei pazienti con diverse forme di sclerosi multipla

La percentuale di linfociti T e il loro numero assoluto sono risultati simili a tutti i gruppi di pazienti, eccetto che per i pazienti con SM-RR trattati con NAT che hanno mostrato di avere un numero maggiore di linfociti T rispetto ad altri pazienti trattati con farmaci DMT (i dati non sono stati mostrati).

Non sono state riscontrate differenze significative nel numero totale delle cellule iNKT nei pazienti con diverse forme di SM (**Figura 4.4 a**) o tra pazienti con SM-RR trattati con differenti DMT (**Figura 4.4 b**).

Per quanto riguarda i vari sottotipi cellulari delle iNKT, i pazienti con RR- “ATTIVA” ed i pazienti con SM-PP hanno mostrato di avere livelli superiori di cellule iNKT-CD4 + rispetto ai controlli di pari età (**Figura 4.4 c**), mentre nessuna differenza significativa è stata riscontrata nei pazienti RR che erano trattati con diversi farmaci immunomodulanti (Figura 4.4 d).

I pazienti con forma SP di malattia avevano livelli inferiori di cellule iNKT CD4 + che esprimevano CD161 rispetto ai pazienti con RR “non attiva” (**Figura 4.4 e**).

Tra i pazienti trattati, quelli in terapia con NAT avevano una percentuale maggiore di iNKT CD4 + CD161+, mentre i pazienti RR trattati con IFN hanno mostrato una riduzione delle della stessa popolazione cellulare, anche se queste differenze non hanno raggiunto una significatività statistica (**Figura 4.4 f**).

4.4. Produzione di citochine da parte dei vari sottotipi cellulari di iNKT

Per studiare la polifunzionalità delle cellule iNKT, abbiamo stimolato in un ampio set di esperimenti le PBMC in vitro con uno stimolo massivo, cioè PMA / ionomicina.

Tuttavia, prima di iniziare questi esperimenti, abbiamo analizzato la risposta polifunzionale in linee cellulari di iNKT generate da pazienti con SM o controlli e stimulate con α -GalCer in presenza di elevate quantità di IL-2 e di uno strato di alimentazione autologo.

Abbiamo caratterizzato il fenotipo cellulare delle iNKT prima della purificazione e dell'espansione delle cellule e abbiamo scoperto che dopo alcune settimane di coltura tutte le cellule, sia quelle provenienti da pazienti con SM che dai controlli, presentavano quasi lo stesso fenotipo con una drastica diminuzione delle cellule iNKT CD4 +, un aumento delle cellule iNKT CD8 + e un significativo aumento delle cellule iNKT DN; inoltre quasi tutte le cellule erano positive per il CD161.

Così abbiamo scelto di analizzare i cambiamenti fenotipici e funzionali dopo una stimolazione a breve termine, ossia 4 ore, essendo consapevoli che PMA / ionomicina è un stimolo massivo, anche in grado di indurre la morte cellulare (in tutti i campioni abbiamo usato un marker di vitalità per eliminare le cellule morte dall'analisi).

In un gruppo rappresentativo costituito da 57 pazienti affetti da SM (suddivisi nei seguenti gruppi: 13 pazienti con RR trattati con NAT, 11 pazienti con RR trattati con GA, 12 RR trattati con IFN, 5 pazienti con RR non attiva (NARR), 4 pazienti con forma PP, 12 con forma SP) ed in 26 controlli corrispondenti di pari età e sesso, abbiamo studiato la capacità delle cellule iNKT di produrre citochine diverse mediante la colorazione intracellulare e la citometria a flusso policromatica. Poiché in questa serie di analisi è stata abbinata l'età dei pazienti con SM e i rispettivi controlli, abbiamo potuto utilizzare un solo gruppo di controllo.

La strategia di gating utilizzata per identificare la produzione fino a quattro citochine da parte dei sottotipi di iNKT è mostrata in **Figura 4.5**.

I linfociti viventi T sono stati selezionati in base alla negatività per il colorante Live Dead e per la positività per CD3.

Le cellule iNKT sono state identificate in base alla presenza della catena V α 24J α Q del TCR.

E' stata analizzata l'espressione del CD4 e del CD8 e la presenza intracellulare di IFN- γ , IL-17, TNF- α e IL-4 in ciascun sottogruppo di cellule iNKT di pazienti affetti da varie forme di SM e nei pazienti sottoposti ai diversi trattamenti immunomodulanti.

In particolare abbiamo misurato:

- ✓ **la risposta "totale"**, cioè la somma di tutte le cellule positive per almeno un marker ; tale dato fornisce il numero globale delle cellule in grado di rispondere ad un stimolo producendo una determinata citochine;
- ✓ **la risposta "qualitativa"**, che descrive il contributo di ogni pattern funzionale al totale della risposta.

Sorprendentemente, abbiamo notato che cellule iNKT dei pazienti affetti da SM e dei controlli non hanno mostrato alcuna caratteristica polifunzionale significativa, ad eccezione della co-produzione di IFN- γ e TNF- α da parte delle cellule iNKT CD4-CD8- dei pazienti con SM-RR trattati con differenti DMT.

I sottotipi cellulari delle cellule iNKT sono stati caratterizzati dalla produzione predominante di citochine di tipo Th1 e Th17, ma questa produzione di citochine non era contemporanea a quella di altre molecole. Per questo motivo abbiamo riportato risultati che si riferiscono alla produzione totale di ogni citochina da parte di ogni sottotipo cellulare (numero % di cellule che producono una determinata citochina).

4.5. I pazienti con SM secondaria progressiva hanno percentuali superiori di cellule T natural killer invariati in grado di produrre IL-17

La percentuale di cellule **iNKT CD4+** risultate anergiche dopo la stimolazione in vitro è simile nelle varie forme di malattia ed ammonta a circa il 70% del totale delle cellule stimulate; tale dato è sovrapponibile a quello dei controlli sani (**Figura 4.6 a**). Il restante 30% delle cellule **iNKT CD4 +** è stato in grado di produrre citochine del tipo Th1 e Th17.

In particolare, i pazienti con SM-SP hanno mostrato di avere più cellule **iNKT CD4+** (dato in %) in grado di produrre IL-17 rispetto ai pazienti PP ed ai controlli (**Figura 4.6 b**), e i pazienti NARR hanno una percentuale maggiore di cellule **iNKT CD4 +** che producono TNF- α rispetto ai controlli (**Figura 4.6 c**). Non sono state riscontrate differenze nella percentuale di cellule **iNKT CD4 +** che producono IFN- γ (**Figura 4.6 d**).

Anche la percentuale di cellule **iNKT CD8 +** in grado di produrre citochine dopo stimolazione in vitro è risultata simile in tutte le forme di SM e nei controlli (**Figura 4.6 e**). Tuttavia, i pazienti progressivi (sia SP che PP) hanno percentuali più elevate di cellule **iNKT CD8 +** in grado di produrre IL-17 rispetto ai controlli, mentre i pazienti con NARR hanno mostrato percentuali inferiori di queste cellule rispetto ai controlli (**Figura 4.6 f**). Inoltre, i pazienti con RR “non attiva” avevano più cellule **iNKT CD8 +** in grado di produrre TNF- α rispetto ai controlli (**Figura 4.6 g**), mentre nel caso delle cellule **iNKT CD8 +** non sono state riscontrate differenze tra i gruppi riguardanti la produzione di IFN- γ (**Figura 4.6 h**).

4.6. Il Natalizumab spegne la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule T natural killer invarianti

Abbiamo studiato gli effetti di diversi trattamenti immunomodulanti sulla polifunzionalità delle cellule iNKT nei pazienti con SM-RR e trattati con GA, IFN o NAT da almeno 6 mesi.

La percentuale complessiva delle cellule iNKT CD4 + che hanno risposto ad una potente stimolazione in vitro è risultata simile in tutti i gruppi (**Figura 4.7 a**).

Tuttavia, i pazienti trattati con NAT hanno mostrato di avere percentuali inferiori di cellule **iNKT CD4 +** che producono IL-17 rispetto ad altri trattamenti (**Figura 4.7 b**), nonché livelli inferiori di cellule iNKT CD4 + che producono TNF- α rispetto ai pazienti in terapia IFN (**Figura 4.7 c**). Nessuna differenza è stata riscontrata nella produzione di IFN- γ (**Figura 4.7 d**) nei vari gruppi di pazienti trattati con vari farmaci.

Circa l'80% delle cellule **iNKT CD8 +** di pazienti trattati con NAT non ha risposto alla stimolazione in vitro, una percentuale superiore a quella riscontrata nei pazienti che in terapia con GA o IFN (**Figura 4.7 e**). Di conseguenza, questi pazienti hanno mostrato i livelli più bassi di cellule iNKT CD8 + in grado di produrre IL-17 (**Figura 4.7 f**), TNF- α (**Figura 4.7 g**) e IFN- γ (**Figura 4.7 h**).

Per quanto riguarda le cellule iNKT DN (CD4-,CD8-), i pazienti trattati con NAT avevano anche la percentuale più elevata di cellule DN iNKT non in grado di produrre citochine dopo stimolazione in vitro (quindi anergiche) (**Figura 4.7 i**) e percentuali più basse di cellule iNKT DN che producono IL-17 (**Figura 4.7 j**), TNF- α 3,5 (**Figura 4.7 k**) e IFN- γ (**Figura 4.7 l**).

Considerando la polifunzionalità di queste cellule, abbiamo trovato che le cellule iNKT DN che producono simultaneamente IFN- γ e TNF- α , ma non IL-4 o IL-17, erano diminuite nei pazienti trattati con NAT rispetto ad altri trattamenti (**Figura 4.7 m**).

Utilizzando il software SPICE, non sono state evidenziate modifiche significative per quanto riguarda le altre combinazioni di citochine (i dati non sono mostrati).

4.7. IFN e GA non inducono modificazioni fenotipiche delle cellule NKT invariati dopo 6 e 12 mesi di terapia

Infine abbiamo valutato se i trattamenti immunomodulanti, in particolare IFN e GA, siano in grado di modificare la frequenza e il fenotipo delle cellule iNKT nei pazienti affetti da SM, confrontando i dati ottenuti dai parametri immunologici prima di iniziare il trattamento (in pazienti naive) con quelli ottenuti dopo 6 e 12 mesi di terapia.

Dei 17 pazienti arruolati inizialmente nello studio, 14 pazienti hanno completato i 12 mesi di trattamento, di questi 8 sono stati posti in terapia con IFN β e 6 con GA.

I parametri immunologici, ovvero il numero e la percentuale delle iNKT e dei vari sottotipi cellulari (CD4+, CD8+, DN, CD4+ CD161+, CD8+ CD161+, CD161+) sono stati confrontati ad ogni tempo (baseline, 6 e 12 mesi) nei due diversi gruppi di pazienti. Tali analisi non hanno documentato differenze significative.

Anche la valutazione delle modificazioni nel tempo della stessa popolazione cellulare all'interno dello stesso gruppo di pazienti non ha prodotto risultati significativi.

E' possibile che la numerosità campionaria abbia influito sulla significatività statistica di tali risultati.

4.8. Correlazioni tra dati clinici ed immunologici

La valutazione delle possibili correlazioni tra i parametri clinici (per lo studio trasversale sono stati considerati nelle analisi: l'età, il sesso, l'età ed i sintomi all'esordio della malattia, la durata della malattia in mesi, i mesi dall'inizio di una terapia nei pazienti trattati, il relapse rate, il tasso annuale di ricadute (ARR), l'EDSS ed il delta-EDSS nell'anno precedente, l'MS severity score, tempo in mesi tra il prelievo e l'ultima ricaduta clinica, tempo in mesi dell'ultima RM cerebrale e spinale e se attiva o no; per lo studio longitudinale sono stati considerati, oltre ai dati al baseline: l'EDSS a 6 e 12 mesi, il delta-EDSS ed il numero di ricadute riferiti agli ultimi 12 mesi, mRio score ad un anno di trattamento, i "responders" alla terapia si/no, ed il "disability progression") ed immunologici dei vari sottogruppi di pazienti sono state eseguite mediante il test delle correlazioni di Spearman (significatività statistica stabilita per un valore di $p < 0.025$) e successivamente l'analisi di regressione lineare.

Tali analisi non hanno documentato delle modificazioni statisticamente significative dei parametri clinici nel confronto con i parametri immunologici dei pazienti, sia sia considerando le varie forme di malattia che in relazione ai diversi gruppi divisi sulla base del trattamento con diversi DMT. Non vi sono comunque al momento altri studi pubblicati in letteratura in cui siano stati correlati tali parametri clinici (a parte la forma di malattia) e parametri immunologici simili a quelli esaminati nel nostro studio.

5. DISCUSSIONE

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare, nel sangue periferico di 165 pazienti affetti da SM, la presenza di alterazioni fenotipiche e funzionali dei vari sottotipi di cellule iNKT e di osservare eventuali differenze nelle diverse forme cliniche di malattia e in risposta al trattamento con differenti terapie immunomodulanti, al fine di identificare diversi profili immunologici di SM e di individuare possibili nuovi marcatori immunologici di malattia e/o per la terapia.

5.1. Popolazione di studio

I dati clinici della popolazione esaminata, composta in totale da 165 pazienti con SM nelle varie forme cliniche, sono paragonabili a quelli presenti in letteratura.

In particolare, è noto dalla letteratura che la SM esordisce nel 70% dei casi tra i 20 e i 40 anni e che il 70% dei pazienti con SM sono donne, con rapporto tra sessi di 2,5:1².

Gli studi sulla storia naturale della malattia documentano che circa la metà dei pazienti entra in una forma secondariamente progressiva (SP) dopo 15 anni di malattia⁸⁷, mentre approssimativamente il 20% esordisce con una forma progressivamente ingravescente fin dall'inizio (PP)³. In entrambi i casi, l'età media dei pazienti con forma progressiva di malattia è di 40 anni².

I pazienti arruolati in modo prospettico nel nostro studio sono stati in totale 165, di cui 122 (74%) femmine e 43 (26%) maschi, con età media di $45,1 \pm 11,6$ anni. Centoventuno pazienti presentavano una forma RR, con età media totale di $39,95 \pm 9,49$ anni, mentre i pazienti con forma SP e PP erano 44, con età media pari a $55,37 \pm 6,59$.

Per tale motivo, sono stati arruolati due diversi gruppi di soggetti di controllo, con età media pari a $38,75 \pm 4,7$ (gruppo a) e di $52,83 \pm 7,1$ (gruppo b), equiparabili e confrontati rispettivamente con i pazienti RR e PR (SP+PP), in modo da evitare errori statistici relativi

all'età. I due gruppi di controllo non hanno mostrato differenze significative tra di loro per nessuno dei parametri immunologici esaminati.

Il tempo medio di malattia era di $8,5 \pm 7,75$ anni per le forme RR, di $21,16 \pm 7,83$ anni per le forme SP e di $13,5 \pm 8,1$ per le forme PP di malattia.

Anche l'EDSS medio era notevolmente inferiore per i pazienti con forma RR ($1,36 \pm 1$) rispetto ai pazienti con forma progressiva di malattia ($5,8 \pm 1,5$), rispettando quindi la storia naturale della SM.

5.2. Dati immunologici

Nel campo delle malattie autoimmunitarie, l'importanza delle cellule iNKT è stata inizialmente riconosciuta attraverso l'osservazione in vivo di topi privi di cellule iNKT, i quali risultavano essere predisposti a sviluppare diverse malattie autoimmuni³¹³.

Nonostante siano stati effettuati diversi studi negli ultimi due decenni, esistono ad oggi pochi dati, e non univoci, sul potenziale ruolo di queste cellule nella patogenesi della SM.

Pertanto, lo scopo principale di questo studio era di caratterizzare finemente le cellule iNKT in un campione esteso di pazienti con SM, rispetto ai soggetti di controllo.

Studi precedenti hanno riportato risultati contrastanti in merito al numero di cellule iNKT nella SM, in particolare è stata descritta sia una riduzione nel numero di tali cellule nel sangue periferico^{301, 302}, che un aumento³⁰³ o nessuna differenza³¹⁴ rispetto ai controlli.

I nostri risultati hanno evidenziato che non vi sono differenze nella percentuale e nel numero assoluto di cellule iNKT totali né in relazione alle varie forme di malattia e né in relazione ai diversi trattamenti con DMT. Tuttavia, abbiamo riscontrato cambiamenti significativi nell'analisi dei sottogruppi di cellule iNKT.

Inoltre, sono state individuate differenze funzionali, non solo nei pazienti con diverse forme di SM, ma anche tra quelli trattati con i diversi DMT.

Le discrepanze nei risultati tra i vari studi precedenti possono essere attribuite a diverse ragioni, tra cui incongruenze tecniche e metodologiche, per esempio nei diversi pannelli di

anticorpi utilizzati per l'analisi fluorocitometrica delle cellule iNKT e strategie diverse impiegate per la loro identificazione.

Il nostro approccio si è basato sulla strategia di individuazione di cellule rare: abbiamo utilizzato sangue fresco e abbiamo analizzato almeno 10 milioni di eventi per campione, contro i 100.000-200.000 eventi mediamente acquisiti negli studi precedenti.

Inoltre, negli studi precedenti sono state arruolate piccole coorti di pazienti, mentre nel nostro studio abbiamo incluso non solo un numero molto maggiore di pazienti e controlli, ma i vari gruppi di pazienti sono risultati anche molto più omogenei, poiché abbiamo considerato attentamente il profilo di attività di malattia, il tipo di trattamento effettuato e l'età.

Abbiamo riscontrato che, nei pazienti con SM-RR, la percentuale di cellule iNKT non è influenzata dai vari DMT. Altri studi avevano riportato in precedenza che il trattamento con IFN- β aumentava la percentuale delle cellule iNKT V α 24 + circolanti³⁰⁵. Tuttavia, le coorti di pazienti trattati e non trattati erano relativamente piccole in questi studi.

Per quanto riguarda i sottotipi di cellule iNKT, nel nostro studio i pazienti con forma RR "attiva" e i pazienti PP avevano una percentuale più elevata di cellule iNKT CD4 + rispetto al rispettivo gruppo di controllo. I pazienti con forma SP hanno mostrato la stessa tendenza, anche se la significatività statistica non è stata raggiunta.

Questi risultati suggeriscono che sia la fase attiva della SM, ma anche la fase progressiva di malattia, sembrano essere caratterizzate da una presenza più sostenuta di cellule iNKT CD4 +, che probabilmente contribuiscono all'instaurazione e / o alla persistenza di uno stato infiammatorio.

Abbiamo anche riscontrato che i pazienti con forma RR e senza attività recente di malattia hanno una percentuale più alta di iNKT CD4 + che esprimono anche il CD161 rispetto ai pazienti con forma SP.

Anche se il significato dell'espressione del CD161 da parte delle cellule iNKT deve essere ancora chiarito, è ampiamente accettato che tale recettore sia coinvolto nella regolazione della funzione delle cellule iNKT e l'attivazione del CD161 migliora la proliferazione cellulare delle iNKT³¹⁵. Inoltre, l'espressione di CD161 è associata a cellule T che presentano un

fenotipo di memoria ed è stata correlata alla secrezione di IL-17, una potente citochina proinfiammatoria con un ruolo rilevante nella SM²³⁴.

Per quanto riguarda la funzionalità delle cellule iNKT, studi precedenti hanno riportato che linee cellulari espanse di iNKT CD4⁺ estratte da pazienti con SM-RR con malattia "inattiva" (cioè in remissione) producono più IL-4 rispetto a quelle ottenute da pazienti con SM-RR durante una recidiva clinica o dai controlli, e che sono funzionalmente deviate verso un fenotipo Th2. Al contrario, le linee espanse di iNKT CD4⁻ derivate dagli stessi pazienti non sono funzionalmente orientate verso un fenotipo Th1 o Th2³¹⁶.

Dal punto di vista tecnico, nel nostro studio, le cellule iNKT CD4⁺ e CD4⁻ sono state "ordinate" partendo da linee cellulari stimulate prima con α -GalCer, quindi sono state stimulate con microsfere rivestite con anticorpi anti-CD3 / CD28 in presenza di IL-2 e identificate sulla base della presenza di IL-4 e IFN- γ nei supernatanti mediante un test ELISA. I nostri risultati non documentano la presenza di un fenotipo di tipo Th2 delle iNKT CD4⁺ in vivo, ma indicano comunque che la disfunzione della regolazione dell'immunità della SM potrebbe comprendere anche le cellule iNKT CD4⁺. Ritenendo che la produzione di citochine da parte delle iNKT CD4⁺ e CD4⁻ potrebbe riflettere ciò che accade in vivo abbiamo preferito analizzare la risposta funzionale delle cellule iNKT dopo una stimolazione a breve termine (cioè 4 ore) di PBMC freschi isolati con PMA/ionomicina, allo scopo di mimare lo stato di attivazione iniziale di tali cellule. Quindi i nostri dati sono scarsi paragonabili a quelli ottenuti dagli studi precedenti in cui sono state utilizzate linee cellulari espanse di iNKT.

Nel nostro protocollo citofluorimetrico, abbiamo utilizzato un marcatore di vitalità, che consente una misurazione precisa e accurata della produzione di citochine da parte delle cellule viventi. Questo è fondamentale perché un marcatore di vitalità è considerato assolutamente essenziale per qualsiasi saggio che identifichi le celle la cui frequenza è bassa³¹⁷, come le cellule iNKT. Inoltre, PMA / ionomicina è uno stimolo massivo, anche in grado di indurre la morte cellulare, e le cellule morte possono legarsi ad anticorpi in maniera non specifica, dando risultati falsi.

Noi abbiamo trovato che le cellule iNKT di pazienti con forme diverse di SM hanno risposto ad una potente stimolazione in vitro producendo principalmente citochine del tipo Th1 e Th17, cioè TNF- α , IFN- γ e IL-17.

È interessante notare che non abbiamo riscontrato nessuna produzione di IL-4 né risposte polifunzionali da parte delle iNKT.

Il fenotipo funzionale di tipo Th1/Th17 è risultato essere nel nostro studio più pronunciato nei pazienti con SP, i quali hanno mostrato una maggiore produzione di IL-17 da parte delle cellule iNKT CD4 + e CD8 + rispetto ai controlli, suggerendo quindi che la fase progressiva della malattia è caratterizzata da attivazione e spostamento funzionale delle iNKT verso un fenotipo proinfiammatorio stabile.

Sebbene ad oggi sia ancora controverso e poco chiaro il meccanismo patogenetico della progressione della SM, ed in particolare, se, essa sia causata dai processi infiammatori o se il danno assonale e l'infiammazione siano due processi che agiscono indipendentemente l'uno dall'altro¹⁸³, è ormai indiscusso che vi sia una associazione stretta tra infiammazione e neurodegenerazione in tutte le fasi della malattia¹⁸³, e che l'entità del danno neuronale correla con il grado di infiammazione¹⁸⁸, così come la perdita assonale correla con l'accumulo di disabilità neurologica^{318,319}.

Anche gli studi anatomico-patologici hanno più recentemente evidenziato che, nella fase progressiva di malattia, l'infiammazione all'interno del SNC è abbondante e correla sia col danno assonale che con la progressione di malattia. Inoltre, a livello istopatologico, la forma SP di SM si caratterizza per la simultanea presenza di lesioni demielinizzanti nella sostanza bianca del SNC, infiammazione diffusa, perdita assonale, cambiamento nel rapporto fisiologico tra sostanza grigia e sostanza bianca cerebrale^{183,320}.

Studi precedenti hanno indicato una maggiore attivazione delle cellule immunitarie del sangue periferico da pazienti con forma progressiva di SM, ma non è chiaro se ciò che accade a livello periferico sia specchio di ciò che avviene all'interno del SNC o se l'infiammazione sistemica contribuisca all'infiammazione a livello intratecale e alla progressione della malattia.

Il primo studio effettuato per valutare il grado di infiammazione sistemica nelle fasi progressive di malattia è stato condotto da Christensen e coll.³¹⁹, i quali hanno documentato un

aumento delle Th1, Th17 e delle cellule B attivate nel siero dei pazienti con forme progressive, rispetto ai pazienti con forma RR e controlli. Essi inoltre, hanno riportato un'aumentata espressione genica per interleuchine e recettori per interleuchine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-21r), dimostrando che queste cellule infiammatorie, sebbene confinate nel torrente ematico, possono avere un ruolo nei meccanismi di progressione.

I nostri dati sulla funzionalità delle cellule iNKT, in particolare sulle cellule iNKT CD4⁺ e CD8⁺ che producono IL-17 soprattutto nelle forme progressive di SM, supportano l'ipotesi di un ruolo patogenetico dei processi infiammatori nel guidare la progressione della malattia.

Studi recenti hanno documentato un ruolo fondamentale dell'IL-17 nella SM e la presenza di una alterata regolazione dell'asse IL-23 / IL-17 nei pazienti con forma SP, che correla con aumento del carico lesionale alla RM e maggiore atrofia cerebrale³²¹.

Inoltre, studi condotti nel modello animale dell'EAE hanno documentato che le cellule Th17 attivate contro la mielina hanno indotto specificamente la formazione di follicoli linfoidi ectopici nel SNC, e che tale processo in parte dipende dall' IL-17³²².

E' stato infine dimostrato che nei pazienti con SP le cellule infiammatorie si raccolgono a formare all'interno del SNC delle strutture simil "follicolari" ectopiche perivascolari o meningei e che questi follicoli costituiscono i siti in cui l'infiammazione viene perpetuata nelle fasi croniche di malattia, che risulta compartimentalizzata all'interno del SNC^{184,174,186}. La presenza di questi follicoli è associata inoltre ad un maggior grado di infiammazione meningeale diffusa e ciò correla con il grado di demielinizzazione e di atrofia corticale^{320,323}.

In definitiva, i nostri dati sullo stato funzionale delle cellule iNKT nei pazienti con SP sono coerenti con l'ipotesi che le risposte Th17 svolgano un ruolo cruciale nello sviluppo delle fasi progressive della SM^{324,325,326}, in parte tramite l'attivazione di iNKT e la secrezione di citochine pro-infiammatorie di tipo Th1 e Th17.

Per quanto riguarda la funzionalità delle cellule iNKT nei pazienti con forma RR trattati con diversi farmaci immunomodulanti, abbiamo riscontrato che i vari i trattamenti

immunomodulanti non hanno influenzato la risposta funzionale e polifunzionale delle cellule iNKT, ad eccezione del NAT.

Infatti, abbiamo osservato che i pazienti trattati con NAT hanno livelli inferiori di cellule iNKT che producono citochine Th1 e Th17, ovvero IL-17, TNF- α e IFN- γ , rispetto ai pazienti che assumono IFN o GA, suggerendo che questo farmaco biologico sia un modulatore della funzionalità delle cellule iNKT.

Inoltre, i pazienti trattati con NAT avevano livelli inferiori di cellule iNKT DN che co-producono IFN- γ e TNF- α rispetto ad altri trattamenti.

NAT è una delle terapie più efficaci approvate per la forma RR di malattia¹³⁶. Gli effetti immunologici di questo farmaco sulle cellule del sangue periferico dei pazienti RR sono ancora in parte da chiarire. Esso funziona in gran parte attraverso l'antagonismo dell'integrina VLA-4, inibendo così la tras migrazione dei leucociti attivati nel SNC³²⁷. Tuttavia, probabilmente questo non è il suo unico meccanismo di azione biologico.

È stato dimostrato che nei pazienti trattati con NAT vi è uno spostamento nel sangue periferico dell'asse Th1/Th2 a favore di un profilo funzionale Th1, con una maggiore espressione di citochine pro-infiammatorie circolanti, probabilmente a causa del sequestro periferico di linfociti T attivati³²⁸.

Inoltre, recenti studi hanno suggerito che gli effetti del farmaco sulla ridistribuzione del numero circolante delle cellule B, T ed NK possa verificarsi mediante l'azione su markers di attivazione, di co-stimolazione e segnali cellulari che coinvolgono altri attori cellulari³²⁹.

Finora, a nostra conoscenza, non sono stati ancora effettuati studi su pazienti con SM in terapia con NAT che valutassero le modificazioni del profilo delle cellule iNKT durante il trattamento.

Il possibile ruolo dei cambiamenti di profilo citochinico indotti dal trattamento con NAT rimane in gran parte inesplorato e richiede ulteriori indagini.

Tuttavia, i nostri risultati sulla funzionalità delle cellule iNKT suggeriscono che NAT potrebbe inibire la loro azione proinfiammatoria.

6. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, le idee sviluppate nell'ambito della ricerca epidemiologica, genetica, patologica, immunologica e neurobiologica, per cercare di identificare la causa e la patogenesi della Sclerosi Multipla, hanno spostato lo studio della malattia da un sistema basato su approcci esplorativi ad una disciplina produttiva, che occupa i primi posti nell'ambito delle scienze cliniche.

Di conseguenza, stanno emergendo sempre più quesiti in merito alla definizione e classificazione della malattia, alle caratteristiche nosologiche, alle possibili cause, ai meccanismi patogenetici e alla gestione dei pazienti.

L'individuazione di marcatori biologici, tra cui marcatori immunologici, indirizzati all'identificazione di fenotipi immunologici correlati alle diverse forme di malattia, ma anche alla prognosi, alla risposta ai farmaci e alla possibilità di sviluppare eventi avversi alle terapie, consentirebbe di cambiare radicalmente l'approccio del clinico nei confronti di questa malattia, da un pensiero indotto per categorie cliniche ad uno per categorie biologiche e immunologiche, valutando quali siano i meccanismi immuno-mediati in atto in quella determinata fase della malattia per cercare di interromperli, e ciò nell'ottica di una reale personalizzazione delle cure dei pazienti e di ottimizzazione delle risorse.

L'obiettivo principale del nostro studio era quello di individuare possibili marcatori immunologici di malattia e/o di terapia, che potessero aiutare il clinico nella gestione di questa complessa patologia. Per tale motivo ci siamo concentrati su una particolare popolazione cellulare, di recente scoperta ed interesse immunologico, ma ancora scarsamente caratterizzata dal punto di vista fenotipico e funzionale nella malattia, ovvero le cellule iNKT.

Le cellule iNKT sono cellule T non convenzionali che risultano a ponte tra l'immunità innata ed adattativa. Sono una popolazione rara di linfociti T derivati dal timo che esprimono un TCR semi-invariante e altri antigeni tipici delle cellule NK e riconoscono i glicolipidi presentati dal CD1d. Le cellule iNKT possono essere suddivise nei sottogruppi funzionali sulla base dell'espressione o meno del CD4 e del CD8, e sono caratterizzate da una rapida funzione

effettrice (cioè una potente secrezione di citochine e attività citotossica) dopo l'attivazione e mediano diverse e addirittura opposte funzioni immunitarie, inclusa la regolazione di malattie autoimmuni, la sorveglianza dei tumori e la protezione contro le infezioni²⁷⁴.

Il contributo di queste cellule alla patogenesi della SM è stato studiato sia nei pazienti con la malattia sia nei modelli sperimentali di topo, ed i diversi studi che hanno valutato sia la frequenza che le funzioni delle cellule iNKT nei pazienti con SM hanno mostrato la presenza di difetti sia quantitativi^{301,330} che qualitativi^{316,303}, delle iNKT. Tuttavia, nei diversi studi sono emersi risultati contraddittori e non è ancora chiaro ad oggi se le cellule iNKT esercitino un ruolo protettivo o proinfiammatorio e dannoso.

In questo studio è stata eseguita una caratterizzazione approfondita della frequenza, del fenotipo e della funzionalità delle cellule iNKT nelle diverse forme di SM e durante il trattamento con diversi DMTs.

Abbiamo identificato in maniera rigorosa le cellule iNKT e abbiamo valutato i profili funzionali attraverso la capacità di produzione simultanea di diverse citochine proinfiammatorie nei vari sottotipi di iNKT, utilizzando tecniche avanzate di citometria a flusso policromatica.

Abbiamo riscontrato che la frequenza delle cellule iNKT totali era simile tra i pazienti con forme diverse di SM e nei pazienti sottoposti a diversi trattamenti per la malattia, ma le modifiche avvenivano tra i sottogruppi di iNKT e nella loro risposta funzionale dopo stimolazione in vitro.

In particolare, abbiamo osservato uno spostamento funzionale verso un profilo Th1/Th17 nei pazienti con SM, che è stato più importante nei pazienti con forma secondaria progressiva. Questi infatti hanno mostrato una maggiore produzione di IL-17 da parte delle iNKT CD4 + e CD8 +.

Ciò suggerirebbe che la forma SP è caratterizzata da un'attivazione della cellula iNKT orientata verso un fenotipo proinfiammatorio stabile e supporta l'ipotesi di un ruolo importante dell'infiammazione anche nella fase progressiva di malattia.

Inoltre, tra le terapie studiate, il NAT sembra modulare una riduzione delle cellule iNKT che producono citochine Th1 e Th17. Quindi possiamo ipotizzare che questo farmaco biologico

possa avere, tra gli altri effetti, anche una funzione di modulatore della funzione cellulare delle iNKT.

Nel complesso, i risultati più importanti del nostro studio sono legati alla funzionalità delle cellule iNKT e alla loro capacità di modulare e influenzare l'omeostasi citochinica.

Dato che in generale la produzione di citochine delle cellule iNKT dipende dalla loro distribuzione e localizzazione dei tessuti³³¹, ulteriori studi sono necessari per indagare se il profilo proinfiammatorio delle iNKT è presente in altri tessuti e organi oltre il sangue periferico dei pazienti con SM e se queste cellule possono esercitare effetti rilevanti per la patologia.

Tali informazioni potrebbero aiutare ad identificare dei marcatori biologici di malattia e possibili marcatori predittivi di decorso, che infine potrebbero aiutare il neurologo nella scelta e tempistica delle risorse terapeutiche da mettere in atto e a valutarne l'efficacia o i danni che possono causare, a selezionare meglio gli interventi terapeutici sui pazienti.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Hauser SL, Oksenberg JR. The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron*. 2006;52(1):61-76. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.011.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
3. McDonnell G, Hawkins S. Primary progressive multiple sclerosis: a distinct syndrome? *Mult Scler J*. 1996;2(3):137-141. doi:10.1177/135245859600200304.
4. Banwell B, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol*. 2007. doi:10.1016/S1474-4422(07)70242-9.
5. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. 2010;9(5). doi:10.1016/j.autrev.2009.11.010.
6. Browne P, Chandraratna D, Angood C, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83(11):1022-1024. doi:10.1212/WNL.0000000000000768.
7. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010. doi:10.1016/S1474-4422(10)70064-8.
8. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*. 2013;13(1):128. doi:10.1186/1471-2377-13-128.
9. Multiple Sclerosis International Federation (2013). Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. *Mult Scler Int Fed*. 2013. doi:10.1093/brain/awm236.
10. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9648):1502-1517. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
11. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004;3(February):104-110.
12. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and

- sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(22):12877-12882. doi:10.1073/pnas.1932604100.
13. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. 1995;377(6545):150-151. doi:10.1038/377150a0.
 14. Dyment DA, Yee IML, Ebers GC, Sadovnick AD. Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(2):258-259. doi:10.1136/jnnp.2005.063008.
 15. Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IML, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: Observations in half-siblings. *Lancet*. 2004;363(9423):1773-1774. doi:10.1016/S0140-6736(04)16304-6.
 16. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A ANTIGENS AND MULTIPLE SCLEROSIS. *Lancet*. 1972;299(7762):1240-1241. doi:10.1016/S0140-6736(72)90962-2.
 17. NAITO S, NAMEROW N, MICKEY MR, TERASAKI PI. Multiple Sclerosis: Association with HL???A3. *Tissue Antigens*. 1972;2(1):1-4. doi:10.1111/j.1399-0039.1972.tb00111.x.
 18. Compston DAS, Batchelor JR, Mcdonald WI. B-LYMPHOCYTE ALLOANTIGENS ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS. *Lancet*. 1976;308(7998):1261-1265. doi:10.1016/S0140-6736(76)92027-4.
 19. Lincoln MR, Ramagopalan S V., Chao MJ, et al. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(18):7542-7547. doi:10.1073/pnas.0812664106.
 20. Hauser S, Goodin D. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: Longo DL, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2012:3395-3409.
 21. Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol*. 2013;74(3):317-327. doi:10.1002/ana.24009.
 22. Consortium IMMSG. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2011;12(8):615-625. doi:10.1038/gene.2011.34.

23. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007;61(3):228-236. doi:10.1002/ana.21063.
24. Healy BC, Liguori M, Tran D, et al. HLA B*44: Protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology*. 2010;75(7):634-640. doi:10.1212/WNL.0b013e3181ed9c9c.
25. Ramagopalan S V., Morris AP, Dymment DA, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet*. 2007;3(9):1607-1613. doi:10.1371/journal.pgen.0030150.
26. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *N Engl J Med*. 2007;357(9):2373-2383. doi:10.1056/NEJMoa1407764.
27. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Med*. 2004;199(7):971-979. doi:10.1084/jem.20031579.
28. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):518-524. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.012.
29. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-219. doi:10.1038/nature10251.
30. Baranzini SE. The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(6):596-605. doi:10.1016/j.coi.2009.09.014.
31. Cotsapas C, Voight BF, Rossin E, et al. Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genet*. 2011;7(8). doi:10.1371/journal.pgen.1002254.
32. Hoppenbrouwers IA, Hintzen RQ. Genetics of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):194-201. doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.017.
33. Ramagopalan S V, Dymment DA, Ebers GC. Autoimmune disease in patients with multiple sclerosis and their first-degree relatives: a nationwide cohort study in Denmark. *Mult Scler*. 2008;14(9):1288-9-1. doi:10.1177/1352458508096869.
34. Kurtzke JF, Bui-Quoc-Huong. Multiple sclerosis in a migrant population: 2. Half-orientals

- immigrating in childhood. *Ann Neurol*. 1980;8(3):256-260. doi:10.1002/ana.410080306.
35. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 1995;47(4-5):425-448. doi:0301-0082(95)80008-V [pii].
 36. Dean G. Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J*. 1967;2(5554):724-730. doi:10.1136/bmj.2.5554.724.
 37. Alter M, Kahana E, Loewenson R. Migration and risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 1978;28(11):1089-1093.
 38. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990;53(10):906-911.
 39. Van Der Mei IAF, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T. Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology*. 2001;20(3):168-174. doi:10.1159/000054783.
 40. Swank RL, Lerstad O, Backer J, Strom A. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. *N Engl J Med*. 1952;246(19):722-728.
 41. van der Mei I a F, Ponsonby a-L, Dwyer T, et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ*. 2003;327(7410):316. doi:10.1136/bmj.327.7410.316.
 42. Munger KL, Zhang S, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;62:60-65.
 43. Munger KL, Levin L, Hollis B, Horward N, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Am Med Assoc*. 2006;296:2832-2838.
 44. Simon KC, Munger KL, Kraft P, Hunter DJ, De Jager PL, Ascherio A. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2011;258(9):1676-1682. doi:10.1007/s00415-011-6001-5.
 45. Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013. doi:1352458513509508

[pii]r10.1177/1352458513509508.

46. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ*. 2005;330(7483):120. doi:10.1136/bmj.38301.686030.63.
47. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol*. 2008;194(1-2):7-17. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.11.014.
48. Correale J, Ysrraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1146-1160. doi:10.1093/brain/awp033.
49. Xiao X-H, Liu Z-L, Wang H, et al. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *Chinese Med Sci J = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih*. 2006;21(2):95-98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845795>. Accessed October 20, 2017.
50. Mai X-M, Chen Y, Camargo CA, Langhammer A. Cross-sectional and prospective cohort study of serum 25-hydroxyvitamin D level and obesity in adults: the HUNT study. *Am J Epidemiol*. 2012;175(10):1029-1036. doi:10.1093/aje/kwr456.
51. Mai X-M, Langhammer A, Camargo CA, Chen Y. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and incident asthma in adults: the HUNT Study. *Am J Epidemiol*. 2012;176(12):1169-1176. doi:10.1093/aje/kws235.
52. Lemire J, Archer D. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 1991;87:1103-1107.
53. Cantorna M, Hayes C, DeLuca H. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7861-7864.
54. Burton JM, Kimball S, Vieth R, et al. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(23):1852-1859. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e1cec2.
55. Mosayebi G, Ghazavi A, Ghasami K, Jand Y, Kokhaei P. Therapeutic effect of vitamin D3 in multiple sclerosis patients. *Immunol Invest*. 2011;40(6):627-639.

doi:10.3109/08820139.2011.573041.

56. Soilu-Hanninen M, Aivo J, Lindstrom BM, et al. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon beta-1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(5):565-571. doi:10.1136/jnnp-2011-301876.
57. Ascherio A, Munger KL, White R, et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol*. 2014;71(3):306-314. doi:10.1001/jamaneurol.2013.5993.
58. Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic Review and Meta-Analysis of the Sero-Epidemiological Association between Epstein Barr Virus and Multiple Sclerosis. Khan G, ed. *PLoS One*. 2013;8(4):e61110. doi:10.1371/journal.pone.0061110.
59. Hawkes CH, Giovannoni G, Keir G, Cunningham M, Thompson EJ. Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2006;114(6):363-367. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00677.x.
60. Ordoñez G, Pineda B, Garcia-Navarrete R, Sotelo J. Brief presence of varicella-zoster viral DNA in mononuclear cells during relapses of multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2004;61(4):529-532. doi:10.1001/archneur.61.4.529.
61. Simpson S, Taylor B, Dwyer DE, et al. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2012;18(6):799-806. doi:10.1177/1352458511428081.
62. Warner HB, Carp RI. MULTIPLE SCLEROSIS AND EPSTEIN-BARR VIRUS. *Lancet*. 1981;318(8258):1290. doi:10.1016/S0140-6736(81)91527-0.
63. Castellazzi M, Tamborino C, Cani A, et al. Epstein-Barr virus-specific antibody response in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2010;16(7):883-887. doi:10.1177/1352458510368051.
64. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, et al. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol*. 2007;64:72-75. doi:10.1001/archneur.64.1.72.
65. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of

- multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001;286(24):3083-3088.
66. Munger KL, Levin LI, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio a. Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler*. 2011;17(10):1185-1193. doi:10.1177/1352458511408991.
 67. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA*. 2004;291(15):1875-1879. doi:10.1001/jama.291.15.1875.
 68. Pohl D, Krone B, Rostasy K, et al. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*. 2006;67(11):2063-2065. doi:10.1212/01.wnl.0000247665.94088.8d.
 69. Soldan S, Berti R, Salem N, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med*. 1997;3(12):1394-1397.
 70. Sola P, Merelli E, Marasca R, et al. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(8):917-919.
 71. Simpson SJ, Taylor B, Dwyer D, et al. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(6):799-806.
 72. Tselis A. Evidence for Viral Etiology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2011;31(3):307-316. doi:10.1055/s-0031-1287656.
 73. Libbey JE, Cusick MF, Fujinami RS. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol*. 33(4):266-283. doi:10.3109/08830185.2013.823422.
 74. Berer K, Mues M, Koutrolos M, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*. 2011;479(7374):538-541. doi:10.1038/nature10554.
 75. Fleming JO. Helminths and multiple sclerosis: Will old friends give us new treatments for MS? *J Neuroimmunol*. 2011;233(1-2):3-5. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.01.003.
 76. Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61(8):1122-1124. doi:10.1212/01.WNL.0000081305.66687.D2.

77. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007;61(6):504-513. doi:10.1002/ana.21141.
78. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006;129(Pt 3):606-616. doi:10.1093/brain/awl007.
79. Berkovich R. Treatment of Acute Relapses in Multiple Sclerosis. In: *Translational Neuroimmunology in Multiple Sclerosis: From Disease Mechanisms to Clinical Applications*. ; 2016:307-326. doi:10.1016/B978-0-12-801914-6.00024-6.
80. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: A unifying concept. *Brain*. 2006;129(3):606-616. doi:10.1093/brain/awl007.
81. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1444. doi:10.1212/WNL.33.11.1444.
82. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: Current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol*. 2006;5(4):343-354. doi:10.1016/S1474-4422(06)70410-0.
83. Stadelmann C, Brück W. Lessons from the neuropathology of atypical forms of multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2004;25 Suppl 4:S319-22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727225>. Accessed October 23, 2017.
84. Geurts JJG, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7(9):841-851. doi:10.1016/S1474-4422(08)70191-1.
85. Miller DH, Albert PS, Barkhof F, et al. Guidelines for the use of magnetic resonance techniques in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1996;39(1):6-16. doi:10.1002/ana.410390104.
86. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis : results of an international survey. *Neurology*. 1996;46(4):907-911.
87. WEINSHENKER BG, BASS B, RICE GPA, et al. THE NATURAL HISTORY OF MULTIPLE SCLEROSIS: A GEOGRAPHICALLY BASED STUDY. *Brain*. 1989;112(6):1419-1428. doi:10.1093/brain/112.6.1419.
88. Lublin FD, Reingold SC, Cohen J a, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis : The 2013 revisions Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013

revisions. 2014. doi:10.1212/WNL.0000000000000560.

89. Frohman EM, Goodin DS, Calabresi P a, et al. The utility of MRI in suspected MS: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2003;61:602-611. doi:10.1212/WNL.63.6.1140.
90. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: Natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol*. 2005;4(5):281-288. doi:10.1016/S1474-4422(05)70071-5.
91. Bates D. Summary: Registry data. *Neurology*. 2011;76(1 Suppl 1):S39-41. doi:10.1212/WNL.0b013e31820505ec.
92. Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, et al. Isolated demyelinating syndromes: Comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol*. 2000;21(4):702-706. doi:10782781.
93. O 'riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DPE, et al. The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS A 10-year follow-up. *Brain*. 1998;121:495-503. doi:10.1093/brain/121.3.495.
94. Filippi M, Horsfield MA, Morrissey SP, et al. Quantitative brain {MRI} lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neurology*. 1994;44(4):635. doi:10.1212/WNL.44.4.635.
95. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, et al. *Intramuscular Interferon Beta-1a Therapy Initiated during a First Demyelinating Event in Multiple Sclerosis. CHAMPS Study Group*. Vol 343.; 2000. doi:10.1056/NEJM200009283431301.
96. Comi G, Filippi M, Barkhof F, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: A randomised study. *Lancet*. 2001;357(9268):1576-1582. doi:10.1016/S0140-6736(00)04725-5.
97. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302. doi:10.1002/ana.22366.
98. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, et al. Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging,

- cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: follow-up of 70 patients. *Arch Neurol*. 2009;66(7):841-846. doi:10.1001/archneurol.2009.119.
99. Siva A, Saip S, Altintas A, Jacob A, Keegan BM, Kantarci OH. *Multiple Sclerosis Risk in Radiologically Uncovered Asymptomatic Possible Inflammatory-Demyelinating Disease*. Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England) 15, 918-927 (2009). doi:10.1177/1352458509106214.
 100. Lebrun C. The radiologically isolated syndrome. *Rev Neurol (Paris)*. 2015;171(10):698-706. doi:10.1111/jon.12182.
 101. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72(9):800-805. doi:10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a.
 102. Okuda DT, Mowry EM, Cree BAC, et al. Asymptomatic spinal cord lesions predict disease progression in radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2011;76(8):686-692. doi:10.1212/WNL.0b013e31820d8b1d.
 103. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. In: *Brain Pathology*. Vol 17. ; 2007:210-218. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x.
 104. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *J Autoimmun*. 2014;48-49:134-142. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.022.
 105. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis : Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121-127.
 106. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis : 2005 Revisions to the “ McDonald Criteria .” *Ann Neurol*. 2005;58(6):840-846. doi:10.1002/ana.206703.
 107. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol*. 2016;15(3):292-303. doi:10.1016/S1474-4422(15)00393-2.

108. Beck RW, Chandler DL, Cole SR, et al. Interferon beta-1a for early multiple sclerosis: CHAMPS trial subgroup analyses. *Ann Neurol*. 2002;51(4):481-490. doi:10.1002/ana.10148 [pii].
109. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006;67(7):1242-1249. doi:10.1212/01.wnl.0000237641.33768.8d.
110. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, et al. *Effect of Glatiramer Acetate on Conversion to Clinically Definite Multiple Sclerosis in Patients with Clinically Isolated Syndrome (PreCISe Study): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. Vol 374.; 2009. doi:10.1016/S0140-6736(09)61259-9.
111. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*. 2001;58(1):65-70. doi:10.1001/archneur.58.1.65.
112. Tedeschi G, Lavorgna L, Russo P, et al. Brain atrophy and lesion load in a large population of patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2005;65(2):280-285. doi:10.1212/01.wnl.0000168837.87351.1f.
113. La Mantia L, Di Pietrantonj C, Rovaris M, et al. Interferons-beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane database Syst Rev*. 2014;7:CD009333. doi:10.1002/14651858.CD009333.pub2.
114. Torkildsen O, Myhr KM, Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol*. 2016;23:18-27. doi:10.1111/ene.12883.
115. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74 Suppl 1:S17-S24. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97d99.
116. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011;25(6):491-502. doi:10.2165/11591110-000000000-00000.
117. Schmied M, Duda PW, Krieger JI, Trollmo C, Hafler DA. In vitro evidence that subcutaneous administration of glatiramer acetate induces hyporesponsive T cells in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2003;106(3):163-174. doi:S1521661603000202 [pii].

118. Schrempf W, Ziemssen T. Glatiramer acetate: Mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2007;6(7):469-475. doi:10.1016/j.autrev.2007.02.003.
119. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74(SUPPL.). doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97e39.
120. Aharoni R. The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond. *Autoimmun Rev.* 2013;12(5):543-553. doi:10.1016/j.autrev.2012.09.005.
121. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick R a, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol.* 1996;39(3):285-294. doi:10.1002/ana.410390304.
122. Johnson KP, Brooks BR, Cohen J a, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1995;45(7):1268-1276. doi:10.1212/WNL.45.7.1268.
123. O'Connor P, Filippi M, Arnason B, et al. 250 Mug Or 500 Mug Interferon Beta-1b Versus 20 mg Glatiramer Acetate in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: a Prospective, Randomised, Multicentre Study. *Lancet Neurol.* 2009;8(10):889-897. doi:10.1016/S1474-4422(09)70226-1.
124. Mikol DD, Barkhof F, Chang P, et al. Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *Lancet Neurol.* 2008;7(10):903-914. doi:10.1016/S1474-4422(08)70200-X.
125. Linker RA, Gold R. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: Mechanism of action, effectiveness, and side effects. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(11). doi:10.1007/s11910-013-0394-8.
126. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1087-1097. doi:10.1056/NEJMoa1206328.

127. Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1098-1107. doi:10.1056/NEJMoa1114287.
128. Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, et al. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):163. doi:10.1186/1742-2094-9-163.
129. Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, et al. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341(1):274-284. doi:10.1124/jpet.111.190132.
130. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J, Wiendl H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs*. 2014;74(6):659-674. doi:10.1007/s40265-014-0212-x.
131. Claussen MC, Korn T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clin Immunol*. 2012;142(1):49-56. doi:10.1016/j.clim.2011.02.011.
132. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, et al. Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1293-1303. doi:10.1056/NEJMoa1014656.
133. Vermersch P, Czlonkowska A, Grimaldi LME, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler*. 2014;20(6):705-716. doi:10.1177/1352458513507821.
134. Chan A, De Seze J, Comabella M. Teriflunomide in Patients with Relapsing-Remitting Forms of Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2016;30(1):41-51. doi:10.1007/s40263-015-0299-y.
135. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13(3):247-256. doi:10.1016/S1474-4422(13)70308-9.
136. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. *A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis*. Vol 354.; 2006.

doi:10.1056/NEJMoa044397.

137. Radue EW, Stuart WH, Calabresi PA, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a reduces lesion formation in relapsing multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2010;292(1-2):28-35. doi:10.1016/j.jns.2010.02.012.
138. Lutterotti A, Martin R. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7(6):538-547. doi:10.1016/S1474-4422(08)70110-8.
139. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003;9(6):540-549. doi:10.1191/1352458503ms965oa.
140. Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med.* 2010;61:35-47. doi:10.1146/annurev.med.080708.082655.
141. Clifford DB, DeLuca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, Nath A. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol.* 2010;9(4):438-446. doi:10.1016/S1474-4422(10)70028-4.
142. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, et al. Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(20):1870-1880. doi:10.1056/NEJMoa1107829.
143. McGuigan C, Craner M, Guadagno J, et al. Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: recommendations from an expert group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;87(2):jnnp-2015-311100. doi:10.1136/jnnp-2015-311100.
144. Ho P-R, Koendgen H, Campbell N, Haddock B, Richman S, Chang I. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: a retrospective analysis of data from four clinical studies. *Lancet Neurol.* 2017;16(11):925-933. doi:10.1016/S1474-4422(17)30282-X.
145. Sørensen PS, Hyldgaard Jensen PE, Haghikia A, et al. Occurrence of antibodies against natalizumab in relapsing multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Mult Scler.* 2011;17(9):1074-1078. doi:10.1177/1352458511404271.
146. Kappos L, Antel J, Comi G, et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple

- sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;355(11):1124-1140. doi:10.1056/NEJMoa052643.
147. David OJ, Kovarik JM, Schmouder RL. Clinical pharmacokinetics of fingolimod. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(1):15-28. doi:10.2165/11596550-000000000-00000.
 148. Noda H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *J Neuroimmunol*. 2013;256(1-2):13-18. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.12.005.
 149. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362(5):402-415. doi:10.1056/NEJMoa0907839.
 150. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, et al. *A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis*. Vol 362.; 2010. doi:10.1056/NEJMoa0909494.
 151. Wiendl H, Kieseier B. Multiple sclerosis: Reprogramming the immune repertoire with alemtuzumab in MS. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(3):125-126. doi:10.1038/nrneurol.2013.2.
 152. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in multiple sclerosis: Mechanism of action and beyond. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16414-16439. doi:10.3390/ijms160716414.
 153. Bourdette D, Yadav V. Alemtuzumab versus interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2009;9(5):341-342. doi:10.1007/s11910-009-0062-1.
 154. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;380(9856):1829-1839. doi:10.1016/S0140-6736(12)61768-1.
 155. Havrdova E, Horakova D, Kovarova I. Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: key clinical trial results and considerations for use. *Ther Adv Neurol Disord*. 2015;8(1):31-45. doi:10.1177/1756285614563522.
 156. Willis MD, Robertson NP. Alemtuzumab for Multiple Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016;16(9). doi:10.1007/s11910-016-0685-y.
 157. Papadopoulou A, Derfuss T, Sprenger T. Daclizumab for the treatment of multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*. August 2017:nmt-2017-0023. doi:10.2217/nmt-2017-0023.
 158. Komori M, Kosa P, Stein J, et al. Pharmacodynamic effects of daclizumab in the

- intrathecal compartment. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4(7):478-490.
doi:10.1002/acn3.427.
159. Baldassari LE, Rose JW. Daclizumab: Development, Clinical Trials, and Practical Aspects of Use in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. July 2017. doi:10.1007/s13311-017-0553-8.
 160. Cohan S, Kappos L, Giovannoni G, et al. Efficacy of daclizumab beta versus intramuscular interferon beta-1a on disability progression across patient demographic and disease activity subgroups in DECIDE. *Mult Scler*. October 2017:1352458517735190.
doi:10.1177/1352458517735190.
 161. Herwerth M, Hemmer B. Daclizumab for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17(6):747-753.
doi:10.1080/14712598.2017.1304913.
 162. Lasek-Bal A, Bartoszek K, Steposz A, Puz P, Bal W, Kazibutowska Z. Efficacy and safety of mitoxantrone use in primary and secondary progressive multiple sclerosis – study site experience based on the therapy of 104 patients. *Int J Neurosci*. 2017;127(10):859-863.
doi:10.1080/00207454.2016.1269327.
 163. Pastuszak Ż, Tomczykiewicz K, Piusińska-Macoch R, Stępień A. Cardiac effects of mitoxanthrone therapy in patients with multiple sclerosis. *Kardiol Pol*. 2016;74(4):380-384. doi:10.5603/KP.a2015.0195.
 164. Martinelli V, Cocco E, Capra R, et al. Acute myeloid leukemia in Italian patients with multiple sclerosis treated with mitoxantrone. *Neurology*. 2011;77(21).
doi:10.1212/WNL.0b013e318238ee00.
 165. Buttmann M, Seuffert L, Mäder U, Toyka K V. Malignancies after mitoxantrone for multiple sclerosis: A retrospective cohort study. *Neurology*. 2016;86(23):2203-2207.
doi:10.1212/WNL.0000000000002745.
 166. Cocco E, Marrosu MG. The current role of mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2014;14(6):607-616. doi:10.1586/14737175.2014.915742.
 167. Fernández Ó. Is there a change of paradigm towards more effective treatment early in the course of apparent high-risk MS? *Mult Scler Relat Disord*. 2017;17:75-83.

doi:10.1016/j.msard.2017.07.003.

168. Jakimovski D, Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, et al. Ocrelizumab: a B-cell depleting therapy for multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(9):1163-1172. doi:10.1080/14712598.2017.1347632.
169. Frampton JE. Ocrelizumab: First Global Approval. *Drugs.* 2017;77(9):1035-1041. doi:10.1007/s40265-017-0757-6.
170. Montalban X, Belachew S, Wolinsky JS. Ocrelizumab in Primary Progressive and Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(17):1694. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445663>. Accessed October 24, 2017.
171. Kesselring J, Beer S. Symptomatic therapy and neurorehabilitation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2005;4(10):643-652. doi:10.1016/S1474-4422(05)70193-9.
172. Coyle PK. Symptom Management and Lifestyle Modifications in Multiple Sclerosis. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2016;22(3):815-836. doi:10.1212/CON.0000000000000325.
173. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* August 2015. doi:10.1038/nri3871.
174. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
175. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2015;5(9). doi:10.1002/brb3.362.
176. Popescu BFG, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneap Minn).* 2013;19(4 Multiple Sclerosis):901-921. doi:10.1212/01.CON.0000433291.23091.65.
177. Bruck W, Porada P, Poser S, et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1995;38(5):788-796. doi:10.1002/ana.410380514.
178. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol.* 2015;78(5):710-721. doi:10.1002/ana.24497.
179. Hauser SL, Oksenberg JR, Filippi M, et al. Association between pathological and MRI

- findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2012;11(4):349-360. doi:10.1016/S1474-4422(12)70003-0.
180. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354:942-955. doi:10.1056/NEJMra052130.
 181. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47(6):707-717.
 182. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of Demyelinating Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;7(1):185-217. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132443.
 183. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132(5):1175-1189. doi:10.1093/brain/awp070.
 184. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2004;14(2):164-174.
 185. Haugen M, Frederiksen JL, Degen M. B cell follicle-like structures in multiple sclerosis- With focus on the role of B cell activating factor. *J Neuroimmunol.* 2014;273(1-2):1-7. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.05.010.
 186. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130(4):1089-1104. doi:10.1093/brain/awm038.
 187. Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, et al. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2010;133(10):2983-2998. doi:10.1093/brain/awq250.
 188. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338(5):278-285. doi:10.1056/NEJM199801293380502.
 189. Ceccarelli A, Rocca MA, Falini A, et al. Normal-appearing white and grey matter damage in MS. *J Neurol.* 2007;254(4):513-518. doi:10.1007/s00415-006-0408-4.
 190. Petzold a, Brettschneider J, Jin K, et al. CSF protein biomarkers for proximal axonal

- damage improve prognostic accuracy in the acute phase of Guillain-Barré syndrome. *Muscle Nerve*. 2009;40(1):42-49. doi:10.1002/mus.21239.
191. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;72(15):1322-1329. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a0fe3f.
 192. Tumani H, Hartung H-P, Hemmer B, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2009;35(2):117-127. doi:10.1016/j.nbd.2009.04.010.
 193. Lim ET, Sellebjerg F, Jensen C V, et al. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 2005;11(5):532-536. doi:10.1191/1352458505ms1218oa.
 194. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. October 2017;10.1212/WNL.0000000000004683. doi:10.1212/WNL.0000000000004683.
 195. Dutta R, Trapp BD. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 2011;93(1):1-12. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
 196. Raff MC, Whitmore A V, Finn JT. Axonal Self-Destruction and Neurodegeneration. 2002;296(May):868-871.
 197. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(9):2755-2771. doi:10.1093/brain/awr182.
 198. Gh Popescu BF, Lucchinetti CF. Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2012;12(1):11. doi:10.1186/1471-2377-12-11.
 199. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, et al. Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2188-2197. doi:10.1056/NEJMoal100648.
 200. Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, Brück W, Stadelmann C. A new focal EAE model of cortical demyelination: Multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain*. 2006;129(8):1972-1983.

doi:10.1093/brain/awl135.

201. Lu DR, Robinson WH. Street-experienced peripheral B cells traffic to the brain. *Sci Transl Med.* 2014;6(248):248fs31. doi:10.1126/scitranslmed.3009919.
202. Stern JNH, Yaari G, Vander Heiden JA, et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med.* 2014;6(248):248ra107. doi:10.1126/scitranslmed.3008879.
203. Sellebjerg F, Christiansen M, Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 1998;4(3):127-131. doi:10.1177/135245859800400307.
204. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immuno-dominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature.* 1990;346(6280):183-187. doi:10.1038/346183a0.
205. Wucherpfennig KW, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunol Today.* 1991;12(8). doi:10.1016/0167-5699(91)90126-E.
206. Kondo T, Ohashi T. [T cell immunity to proteolipid protein (PLP) in multiple sclerosis (MS): identification of DR2-associated PLP determinants and conserved TCR CDR3 motifs]. *Nihon Rinsho.* 1994;52(11):2940-2945.
207. Ohashi T, Yamamura T, Inobe J ichi, Kondo T, Kunishita T, Tabira T. Analysis of proteolipid protein (PLP)-specific T cells in multiple sclerosis: Identification of PLP 95-116 as an HLA-DR2,w15-associated determinant. *Int Immunol.* 1995;7(11):1771-1778. doi:10.1093/intimm/7.11.1771.
208. Zamvil S, Nelson P, Trotter J, et al. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature.* 1985;317(6035):355-358. doi:10.1038/317355a0.
209. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(2):115-127. doi:10.1055/s-0036-1579739.
210. Hemmer B, Cepok S, Zhou D, Sommer N. Multiple sclerosis -- a coordinated immune attack across the blood brain barrier. *Curr Neurovasc Res.* 2004;1(2):141-150. doi:10.2174/1567202043480152.

211. Weber MS, Hemmer Bernhard B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2011;1812(2):239-245. doi:10.1016/j.bbadis.2010.06.009.
212. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8(9):913-919. doi:10.1038/ni1507.
213. Steinman L. 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.* 2007;13(2):139-145. doi:10.1038/nm1551.
214. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P. NEW CONCEPTS IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(4):291-301. doi:10.1038/nrn784.
215. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015;14:406-419. doi:10.1016/S1474-4422(14)70305-9.
216. Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology.* 2010;74(Suppl):S2-8.
217. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2015;47(10):1107-1113. doi:10.1038/ng.3395.
218. Goris A. Comment: The HLA region in multiple sclerosis. *Neurology.* 2012;79(6):544. doi:10.1212/WNL.0b013e318263c45b.
219. Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2004;172(6):3893-3904. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3893.
220. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-2279. doi:10.1084/jem.20061308.
221. Moreira-Teixeira L, Resende M, Coffre M, et al. Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells. *J Immunol.* 2011;186(10):5758-5765. doi:10.4049/jimmunol.1003043.

222. Tzartos JS, Friese M a, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008;172(1):146-155. doi:10.2353/ajpath.2008.070690.
223. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler J*. 1999;5(2):101-104. doi:10.1177/135245859900500206.
224. Kebir H, Kreyenborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-1175. doi:10.1038/nm1651.
225. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):849-859. doi:10.1038/nri2889.
226. Venken K, Hellings N, Hensen K, et al. Secondary Progressive in Contrast to Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients Show a Normal CD4+ CD25+ Regulatory T-Cell Function and FOXP3 Expression. *J Neurosci Res*. 2006;83:1432-1446. doi:10.1002/jnr.
227. Venken K, Hellings N, Thewissen M, et al. Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. 2008;123(1):79-89. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02690.x.
228. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2009;183(11):7602-7610. doi:10.4049/jimmunol.0901881.
229. Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology*. 2010;74(SUPPL.). doi:10.1212/WNL.0b013e3181c97c8f.
230. Babbe H, Roers A, Waisman A, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000;192(3):393-404.
231. Johnson A, Suidan G, McDole J, Pirko I. The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor

cell or mediator of neuropathology? *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:73-97.

232. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain.* 2002;125(Pt 3):538-550. doi:10.1093/brain/awf059.
233. Takahashi T, Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol.* 2006;176(1):211-216. doi:176/1/211 [pii].
234. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol.* 2011;2(AUG). doi:10.3389/fimmu.2011.00036.
235. Takahashi T, Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol.* 2006;176(1):211-216. doi:10.4049/jimmunol.176.1.211.
236. Billerbeck E, Kang Y-H, Walker L, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8⁺ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(7):3006-3011. doi:10.1073/pnas.0914839107.
237. Annibali V, Ristori G, Angelini DF, et al. CD161^{high}CD8⁺T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134(2):542-554. doi:10.1093/brain/awq354.
238. Nicol B, Salou M, Vogel I, et al. An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8⁺ T cells involved in multiple sclerosis. *J Autoimmun.* October 2017. doi:10.1016/j.jaut.2017.10.005.
239. von Büdingen H-C, Bar-Or A, Zamvil SS. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(6):713-720. doi:10.1016/j.coi.2011.09.003.
240. KABAT EA, FREEDMAN DA. A study of the crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of 100 cases of multiple sclerosis and in other diseases. *Am J Med Sci.* 1950;219(1):55-64.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15402305>. Accessed October 30, 2017.
241. Qin Y, Duquette P. B-cell Immunity in MS. *Int MS J.* 2003;10(4):110-120.
242. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz J-D, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.*

- 2008;118(10):3420-3430. doi:10.1172/JCI36030.3420.
243. Peterson LK, Tsunoda I, Fujinami RS. Role of CD5+ B-1 cells in EAE pathogenesis. *Autoimmunity*. 2008;41(5):353-362. doi:10.1080/08916930801890280.
 244. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):17-28. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.07.006.
 245. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 1998;102(5):1045-1050. doi:10.1172/JCI3568.
 246. Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*. 1996;6(3):259-274. doi:8864283.
 247. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*. 1985;314(6011):537-539.
 248. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*. 2010;67(4):452-461. doi:10.1002/ana.21939.
 249. Mancardi G, Hart BA, Capello E, et al. Restricted immune responses lead to CNS demyelination and axonal damage. *J Neuroimmunol*. 2000;107(2):178-183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854654>. Accessed October 30, 2017.
 250. Greer JM, Pender MP. Myelin proteolipid protein: An effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2008;31(3):281-287. doi:10.1016/j.jaut.2008.04.018.
 251. Zhang Y, Li X, Qiao J. [Neurofilament protein light in multiple sclerosis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007;87(39):2745-2749. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167263>.
 252. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kukal J, Malbohan I, Piřha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2007;116(2):100-107. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00794.x.
 253. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1180-1188. doi:10.1172/JCI58649.1180.

254. Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev.* 2012;248(1):170-187. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01135.x.
255. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* 2014;211(8):1533-1549. doi:10.1084/jem.20132477.
256. Schenten D, Medzhitov R. The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. *Adv Immunol.* 2011;109:87-124. doi:10.1016/B978-0-12-387664-5.00003-0.
257. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2012;142(1):2-8. doi:10.1016/j.clim.2011.03.004.
258. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: A potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. In: *Journal of Neurology.* Vol 255. ; 2008:3-11. doi:10.1007/s00415-008-1002-8.
259. Trinchieri G. Biology of Natural Killer Cells. *Adv Immunol.* 1989;47(C):187-376. doi:10.1016/S0065-2776(08)60664-1.
260. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(5):503-510. doi:10.1038/ni1582.
261. Montaldo E, Vitale C, Cottalasso F, et al. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood.* 2012;119(17):3987-3996. doi:10.1182/blood-2011-09-379693.
262. Montaldo E, Del Zotto G, Chiesa M Della, et al. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom Part A.* 2013;83(8):702-713. doi:10.1002/cyto.a.22302.
263. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1998;86(2):123-133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663557>. Accessed October 30, 2017.
264. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Wiendl H, et al. Regulatory functions of natural killer cells in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2016;7(DEC). doi:10.3389/fimmu.2016.00606.
265. Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in

- multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol*. 2013;4(MAR). doi:10.3389/fimmu.2013.00063.
266. Rinaldi L, Gallo P, Calabrese M, et al. Longitudinal analysis of immune cell phenotypes in early stage multiple sclerosis: distinctive patterns characterize MRI-active patients. *Brain*. 2006;129(8):1993-2007. doi:10.1093/brain/awl179.
 267. Bendelac A, Fearon DT. Innate immunity: Innate pathways that control acquired immunity. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):1-3. doi:10.1016/S0952-7915(97)80151-3.
 268. Shi FD, Ljunggren HG, Sarvetnick N. Innate immunity and autoimmunity: From self-protection to self-destruction. *Trends Immunol*. 2001;22(2):97-101. doi:10.1016/S1471-4906(00)01821-4.
 269. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* (80-). 2010;327(5963):291-295. doi:10.1126/science.1183021.
 270. Taniguchi M, Seino K-I, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1164-1165. doi:10.1038/ni1203-1164.
 271. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
 272. Ballas ZK, Rasmussen W. NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol*. 1990;145(4):1039-1045.
 273. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010;11(3):197-206. doi:10.1038/ni.1841.
 274. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):131-142. doi:10.1038/nri2904.
 275. Jordan MA, Fletcher J, Baxter AG. Genetic control of NKT cell numbers. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(3):276-284. doi:10.1111/j.0818-9641.2004.01264.x.
 276. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 1997;278(5343):1626-1629. doi:10.1126/science.278.5343.1626.
 277. Kinjo Y, Wu D, Kim G, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer

- T cells. *Nature*. 2005;434(7032):520-525. doi:10.1038/nature03407.
278. Van Kaer L, Parekh V V., Wu L. Invariant natural killer T cells: Bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):43-55. doi:10.1007/s00441-010-1023-3.
 279. Matsuda JL, Naidenko O V, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000;192(5):741-754. doi:10.1084/jem.192.5.741.
 280. Matsuda JL, Gapin L, Fazilleau N, Warren K, Naidenko O V, Kronenberg M. Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12636-12641. doi:10.1073/pnas.221445298.
 281. Berzofsky JA, Terabe M. The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity. *Curr Mol Med*. 2009;9(6):667-672.
 282. Terabe M, Berzofsky J a. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Adv Cancer Res*. 2008;101(8):277-348. doi:10.1016/S0065-230X(08)00408-9.The.
 283. Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, Gapin L, Godfrey DI. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(12):845-857. doi:10.1038/nri3328.
 284. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*. 2002;195(5):625-636. doi:10.1084/jem.20011786.
 285. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):101-117. doi:10.1038/nri3369.
 286. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):231-237. doi:10.1038/nri1309.
 287. Chang KH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V α 24. 2002;100(1):11-16. doi:10.1182/blood-2001-12-0196.Supported.
 288. Wu L, Gabriel CL, Parekh V V., Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: Innate-like T

- cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens*. 2009;73(6):535-545. doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01256.x.
289. Swann JB, Coquet JMC, Smyth MJ, Godfrey DI. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;314:293-323. doi:10.1007/978-3-540-69511-0-12.
 290. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1628-1642. doi:10.1038/jid.2009.30.
 291. Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4⁺, NK1.1⁺ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(25):11931-11934. doi:10.1073/pnas.92.25.11931.
 292. Singh AK, Wilson MT, Hong S, et al. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001;194(12):1801-1811. doi:10.1084/jem.194.12.1801.
 293. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 2001;413(6855):531-534. doi:10.1038/35097097.
 294. Furlan R, Bergami A, Cantarella D, et al. Activation of invariant NKT cells by α GalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: Critical roles for administration route and IFN- γ . *Eur J Immunol*. 2003;33(7):1830-1838. doi:10.1002/eji.200323885.
 295. Mars LT, Laloux V, Goude K, et al. Cutting edge: V α 14-j α 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2002;168(12):6007-6011.
 296. Mars LT, Araujo L, Kerschen P, et al. Invariant NKT cells inhibit development of the Th17 lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6238-6243. doi:10.1073/pnas.0809317106.
 297. Oh SJ, Chung DH. Invariant NKT cells producing IL-4 or IL-10, but not IFN- γ , inhibit the Th1 response in experimental autoimmune encephalomyelitis, whereas none of these cells

- inhibits the Th17 response. *J Immunol.* 2011;186(12):6815-6821.
doi:10.4049/jimmunol.1003916.
298. Mars LT, Laloux V, Goude K, et al. Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2002;168(12):6007-6011. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6007.
 299. Mars LT, Gautron A-S, Novak J, et al. Invariant NKT cells regulate experimental autoimmune encephalomyelitis and infiltrate the central nervous system in a CD1d-independent manner. *J Immunol.* 2008;181(4):2321-2329.
doi:10.4049/JIMMUNOL.181.4.2321.
 300. Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. NKT Cell-Dependent Amelioration of a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering Gut Flora. *Am J Pathol.* 2008;173(6):1714-1723. doi:10.2353/ajpath.2008.080622.
 301. Illés Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell Vα24JαQ invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol.* 2000;164(8):4375-4381.
doi:10.4049/jimmunol.164.8.4375.
 302. Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol.* 2003;15(2):279-288.
doi:10.1093/intimm/dxg029.
 303. O’Keeffe J, Gately CM, Counihan T, et al. T-cells expressing natural killer (NK) receptors are altered in multiple sclerosis and responses to α-galactosylceramide are impaired. *J Neurol Sci.* 2008;275(1-2):22-28. doi:10.1016/j.jns.2008.07.007.
 304. Gately CM, Podbielska M, Counihan T, et al. Invariant Natural Killer T-cell anergy to endogenous myelin acetyl-glycolipids in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;259(1-2):1-7. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.02.020.
 305. Gigli G, Caielli S, Cutuli D, Falcone M. Innate immunity modulates autoimmunity: Type 1 interferon-β treatment in multiple sclerosis promotes growth and function of regulatory invariant natural killer T cells through dendritic cell maturation. *Immunology.* 2007;122(3):409-417. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02655.x.

306. Roxburgh RHR, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: Using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144-1151. doi:10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8.
307. MP Sormani, A Signori, ML Stromillo, N De Stefano. Refining response to treatment as defined by the Modified Rio Score. *Mult Scler J*. 2013;19(9):1246-1247. doi:10.1177/1352458513483892.
308. Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. Data analysis in flow cytometry: The future just started. *Cytom Part A*. 2010;77(7):705-713. doi:10.1002/cyto.a.20901.
309. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytom Part A*. 2011;79 A(2):167-174. doi:10.1002/cyto.a.21015.
310. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, et al. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol*. 2008;38(2):350-363. doi:10.1002/eji.200737768.
311. Nemes E, Lugli E, Bertoncelli L, et al. CD4⁺ T-cell differentiation, regulatory T cells and gag-specific T lymphocytes are unaffected by CD4-guided treatment interruption and therapy resumption. *AIDS*. 2011;25(12):1443-1453. doi:10.1097/QAD.0b013e328347b5e2.
312. Biasi S De, Cerri S, Bianchini E, et al. Levels of circulating endothelial cells are low in idiopathic pulmonary fibrosis and are further reduced by anti-fibrotic treatments. *BMC Med*. 2015;13:277. doi:10.1186/s12916-015-0515-0.
313. Wilson SB, Delovitch TL. Regulatory Lymphocytes: Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):211-222. doi:10.1038/nri1028.
314. Gausling R, Trollmo C, Hafler DA. Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4(-)CD8(-)V alpha 24J alpha Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2001;98(1):11-17. doi:10.1006/clim.2000.4942\rs1521-6616(00)94942-8 [pii].
315. Pozo D, Valés-Gómez M, Mavaddat N, Williamson SC, Chisholm SE, Reyburn H. CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase.

J Immunol. 2006;176(4):2397-2406. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2397.

316. Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol.* 2003;15(2):279-288. doi:10.1093/intimm/dxg029.
317. De Rosa SC, Carter DK, McElrath MJ. OMIP-014: Validated multifunctional characterization of antigen-specific human T cells by intracellular cytokine staining. *Cytom Part A.* 2012;81 A(12):1019-1021. doi:10.1002/cyto.a.22218.
318. Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2000;48(6):893-901. doi:10.1002/1531-8249(200012)48:6<893::AID-ANA10>3.0.CO;2-B.
319. Christensen JR, Börnsen L, Ratzer R, et al. Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression. *PLoS One.* 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0057820.
320. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134(9):2755-2771. doi:10.1093/brain/awr182.
321. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, et al. Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3- and Foxp3+ Regulatory CD4+ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity.* 2011;34(4):554-565. doi:10.1016/j.immuni.2011.01.020.
322. Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, et al. Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity.* 2011;35(6):986-996. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.015.
323. Meinl E, Krumbholz M, Derfuss T, Junker A, Hohlfeld R. Compartmentalization of inflammation in the CNS: A major mechanism driving progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2008;274(1-2):42-44. doi:10.1016/j.jns.2008.06.032.
324. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar MDJ, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflam.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/651503.

325. Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- β . *Ann Neurol*. 2009;65(5):499-509. doi:10.1002/ana.21652.
326. Kebir H, Kreyenborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-1175. doi:10.1038/nm1651.
327. Ransohoff RM. Natalizumab for Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2007;356(25):2622-2629. doi:10.1056/NEJMct071462.
328. Oreja-Guevara C, Ramos-Cejudo J, Aroeira LS, Chamorro B, Diez-Tejedor E. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol*. 2012;12(1):95. doi:10.1186/1471-2377-12-95.
329. Benkert TF, Dietz L, Hartmann EM, et al. Natalizumab Exerts Direct Signaling Capacity and Supports a Pro-Inflammatory Phenotype in Some Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052208.
330. Démoulin T, Gachelin G, Bequet D, Dormont D. A biased V α 24⁺ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett*. 2003;90(2-3):223-228. doi:10.1016/j.imlet.2003.09.014.
331. Lee YJ, Wang H, Starrett GJ, Phuong V, Jameson SC, Hogquist KA. Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity*. 2015;43(3):566-578. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.025.
332. Ingwersen J, Aktas O, Hartung HP. Advances in and Algorithms for the Treatment of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2016;13(1):47-57. doi:10.1007/s13311-015-0412-4.
333. Bianchini E, De Biasi S, Simone AM, et al. Invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Immunol Lett*. 2017;183. doi:10.1016/j.imlet.2017.01.009.

8. FIGURE E TABELLE

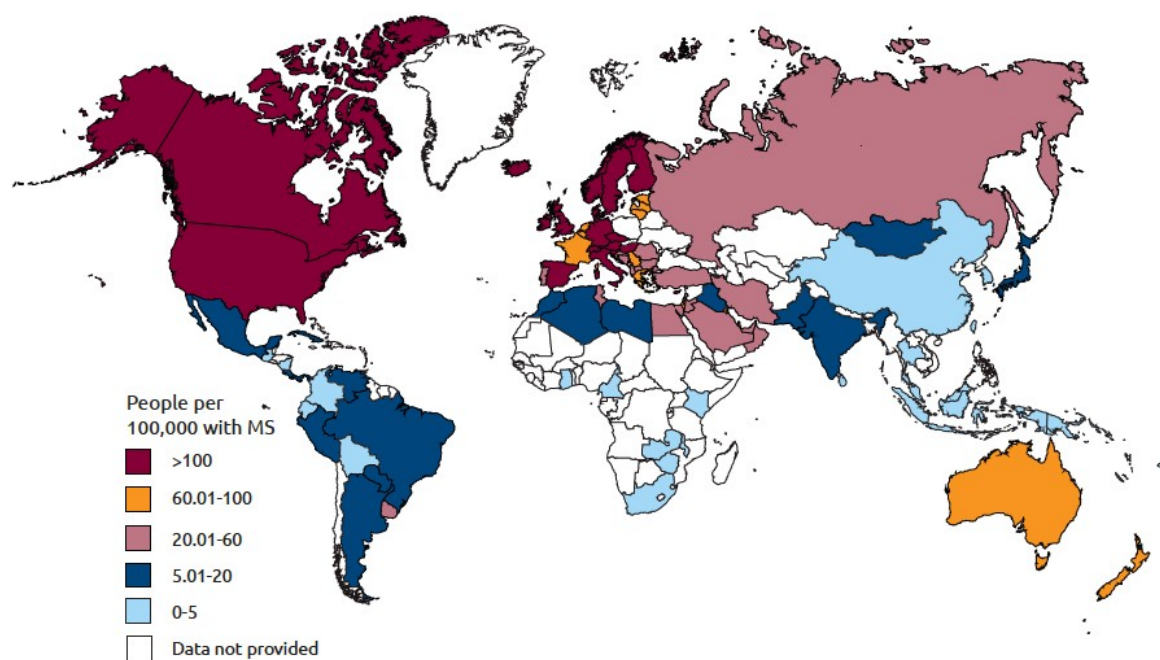


Figura 1.1: prevalenza globale della sclerosi multipla nel 2013. Immagine riprodotta da “Atlas of MS 2013”.

Sede	Sintomi	Segni
Encefalo	Disturbi cognitivi	Deficit di attenzione, ragionamento, funzioni esecutive (precoci); demenza (tardiva)
	Motori e sensitivi	Segni del motoneurone superiore
	Affettivi (depressione) Epilessia (raro) Deficit corticali focali (raro)	
Nervo ottico	Perdita unilaterale della vista dolorosa	Scotoma, ridotta acuità visiva, ridotta percezione dei colori, difetto pupillare afferente
Cervelletto e vie cerebellari	Tremore	Tremore posturale e d'azione, disartria
	Goffaggine e deficit di equilibrio	Incoordinazione degli arti e atassia della marcia
Tronco encefalico	Diplopia, oscillopsia, vertigini	Nistagmo, oftalmoplegia internucleare e altre oftalmoplegie complesse
	Disturbi della deglutizione, Disturbi del linguaggio e labilità emotiva	Disartria, paralisi pseudobulbare
	Sintomi parossistici	
Midollo spinale	Debolezza	Segni del motoneurone superiore
	Rigidità e spasmi dolorosi	Spasticità
	Disfunzione vescicale Impotenza erettile Costipazione	
Altri	Dolore Fatica Sensibilità al calore e intolleranza all'esercizio	

Tabella 1.1 Segni e sintomi della Sclerosi Multipla, per sede

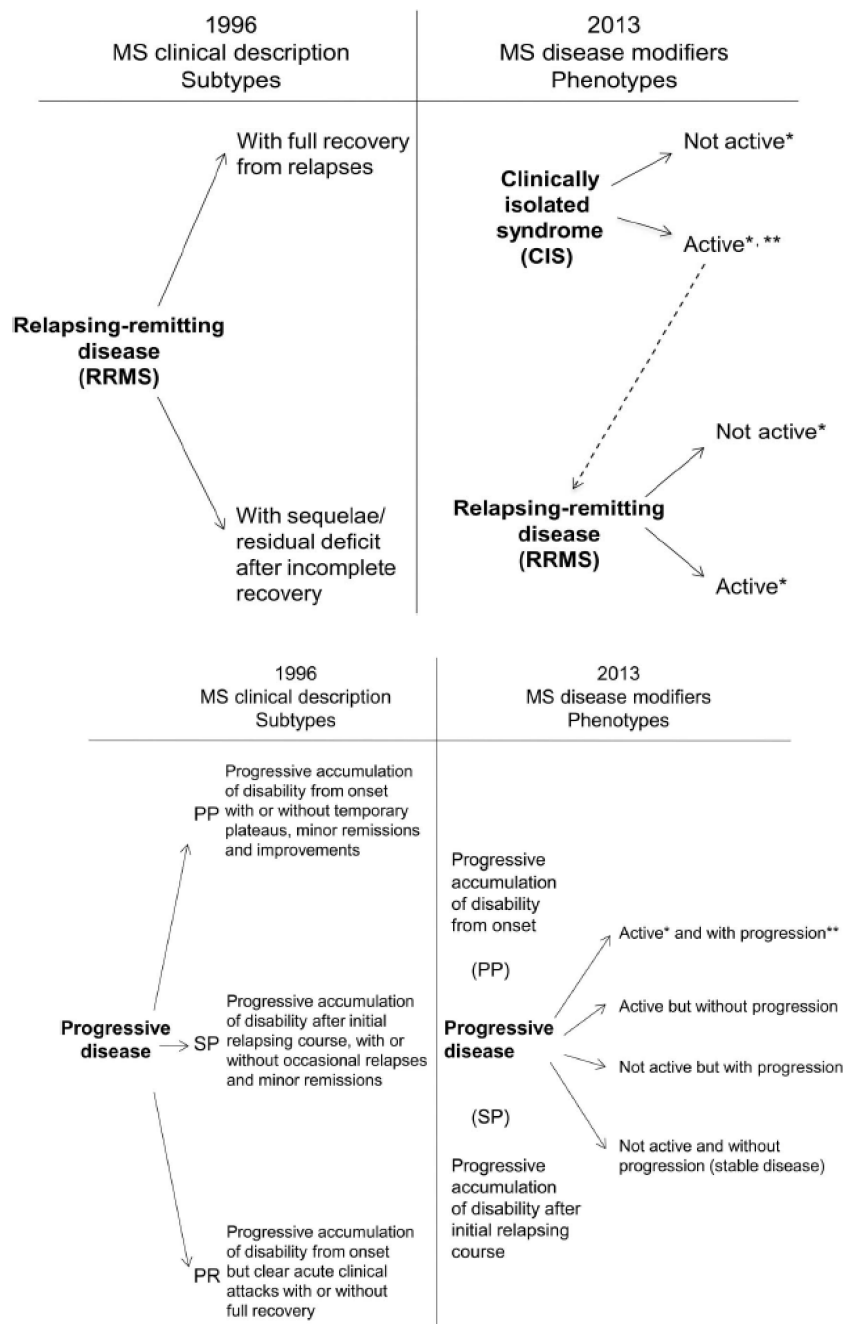


Figura 1.2: descrizione dei fenotipi clinici della SM per la forma recidivante-remittente e progressiva di malattia⁸⁸. L'attività di malattia è determinata da ricadute cliniche nell'ultimo anno e/o attività alla RM (lesioni che assumono contrasto, nuove lesioni o aumentate di dimensioni). La progressione è misurata dalla valutazione clinica, effettuata annualmente. Se non sono effettuati i controlli richiesti, l'attività e la progressione sono "indeterminate".

Presentazione clinica	Elementi ulteriori necessari per la diagnosi di sclerosi multipla
≥2 attacchi; evidenze cliniche oggettive di ≥2 lesioni o evidenze cliniche oggettive di una lesione con evidenze anamnestiche attendibili di un precedente attacco	Nessuno
≥2 attacchi; evidenze cliniche oggettive di 1 lesione	Disseminazione spaziale, dimostrata da: ≥1 lesioni T ₂ in almeno 2 di 4 regioni tipiche del sistema nervoso centrale (periventricolare, iuxtacorticale, infratentoriale, midollo osseo); oppure Attendere un ulteriore attacco clinico a carico di un sito differente del sistema nervoso centrale
1 attacco; evidenze cliniche oggettive di ≥2 lesioni	Disseminazione temporale, dimostrata da: Presenza simultanea lesioni asintomatiche captanti e non captanti gadolinio in qualunque momento; oppure Una nuova lesione T ₂ e/o una o più lesioni gadolinio-positivo in una RM successiva, confrontata con una scansione di riferimento, a prescindere dal momento di acquisizione della scansione di riferimento; oppure Attendere un secondo attacco clinico
1 attacco, evidenze cliniche oggettive di 1 lesione (sindrome clinicamente isolata)	Disseminazione spaziale e temporale, dimostrata da: Per la disseminazione spaziale: ≥1 lesioni T ₂ in almeno 2 di 4 regioni tipiche del sistema nervoso centrale (periventricolare, iuxtacorticale, infratentoriale, midollo osseo); oppure Attendere un ulteriore attacco clinico a carico di un sito differente del sistema nervoso centrale; e Per la disseminazione temporale: Presenza simultanea lesioni asintomatiche captanti e non captanti gadolinio in qualunque momento; oppure Una nuova lesione T ₂ e/o una o più lesioni gadolinio-positivo in una RM successiva, confrontata con una scansione di riferimento, a prescindere dal momento di acquisizione della scansione di riferimento; oppure Attendere un secondo attacco clinico
Progressione neurologica insidiosa suggestiva di sclerosi multipla (PP-SM)	1 anno di progressione di malattia (determinato retrospettivamente o prospetticamente) più 2 o 3 dei seguenti criteri: Evidenza di disseminazione spaziale nell'encefalo basata su ≥1 lesione T ₂ nelle regioni tipiche (periventricolare, iuxtacorticale o infratentoriale) Evidenza di disseminazione spaziale nel midollo spinale basata su ≥2 lesioni T ₂ del midollo Positività del liquor (evidenze di bande oligoclonali e/o elevato indice IgG)

Tabella 1.2. Criteri diagnostici per la diagnosi di Sclerosi Multipla (McDonald 2010)⁹⁷

Proposed 2015 MAGNIMS DIS criteria

DIS can be demonstrated by the involvement [*] of at least 2 out of 5 areas of the CNS as follows:
≥ 3 periventricular lesions
≥ 1 infratentorial lesion
≥ 1 spinal cord lesion
≥ 1 optic nerve lesion
≥ 1 cortical/juxtacortical lesion [^]

^{*} If a subject has a brainstem or spinal cord syndrome, or optic neuritis, the symptomatic lesion(s) are not excluded from the criteria and contribute to lesion count.

[^] This combined terminology indicates the involvement of the white matter next to the cortex and/or the involvement of the cortex, thereby expanding the term "juxtacortical" lesion.

Figura 1.3. MAGNIMS consensus Guidelines, 2016¹⁰⁷. Raccomandazioni d'uso della Risonanza Magnetica nella diagnosi e nella gestione dei pazienti con Sclerosi Multipla.

Medication	Route/Frequency	Efficacy v. PBO	Impact on relapses v. active Tx	Adverse Events
Interferon beta-1b	SC/QOD	34% reduction in ARR at ~2 years	Comparable to GA	Flu-like symptoms, transaminase elevation, skin site reactions, frequent NABs
Interferon beta-1a	SC/QW	18% reduction in ARR at ~2 years	Inferior to interferon beta-1a SC TIW, GA, FNG, DAC-HYP in reducing relapses	Flu-like symptoms, transaminase elevation
Interferon beta-1a	SC/TIW	30% reduction in ARR at ~2 years	Comparable to GA, superior to interferon beta-1 IM	Flu-like symptoms, transaminase elevation, skin site reactions, frequent NABs
Pegylated Interferon beta-1a	SC/QOW	39% reduction in ARR at ~1 year		Flu-like symptoms, transaminase elevation, skin site reactions
Glatiramer Acetate	SC/QD SC/TIW	29% reduction in ARR at ~2 years	Comparable to interferon beta-1b and interferon beta-1a TIW Superior to interferon beta-1a IM in ARR reduction	Skin site reaction, post-injection systemic reaction
Dimethyl Fumarate	PO/BID	34%, 53% reduction in ARR at ~2 years		Flushing, GI symptoms, PML
Fingolimod	PO/QD	55% reduction in ARR at 2 years	Superior to interferon beta-1a QW in ARR reduction	Transaminase elevation, bradyarrhythmia, Macular edema, PRESS, PML, Cryptococcosis, Kaposi sarcoma, Primary CNS lymphoma
Teriflunomide	PO/QD	31, 36% reduction in ARR at ~2 years	Similar to interferon beta-1a SC	Transaminase elevation, Teratogenicity, TEN(toxic epidermal necrolysis)
Mitoxantrone	IV/Q 3months	38% reduction in ARR at ~2 years		Cardiotoxicity, Promyelocytic leukemia, transaminase elevation
Natalizumab	IV/Q 4 weeks	67% reduction in ARR at ~2 years		PML, HSV encephalitis, hepatotoxicity
Alemtuzumab	IV/annual		Superior to interferon beta-1a SC in reducing relapses	De novo autoimmunity, Herpes reactivation, Burkitt's lymphoma, Listeria meningitis
Daclizumab*	SC/month		Superior to interferon beta-1a IM in reducing relapses	Transaminase elevation, cutaneous reactions
Ocrelizumab*	IV/6 months		Superior to interferon beta-1a SC in reducing relapses	Herpes reactivation

Tabella 1.3. Farmaci approvati per il trattamento della SM³³². Sigle (in inglese): PBO- placebo, ARR- annualized relapse rate, BID-twice daily, CNS-central nervous system, DAC-HYP- daclizumab-high yield process, HSV- herpes simplex virus, IM- intramuscular, IV- intravenous, NAB neutralizing antibody, PO- by mouth, PML- progressive multifocal leukoencephalopathy, PRES- posterior reversible encephalopathy syndrome, QOD- every other day, QOW- every other week, SC- subcutaneous, TEN- toxic epidermal necrolysis, TIW- three times weekly

Type of TCR	Invariant V α 24-J α 18 TCR α -chain (preferentially paired with a V β 11-containing TCR β -chain)
Non-classical MHC class I-related restriction molecule	CD1d
Antigens that are recognized	Glycolipid antigens, including α -galactosylceramide and a variety of self, microbial and synthetic lipid-based antigens
Frequency in peripheral blood	0.01-0.1% of lymphocytes (highly variable among individuals)
Frequency in other tissues	0.01-0.1% of lymphocytes in spleen and bone marrow, ~1% of liver lymphocytes and 10% of omentum lymphocytes, but low in thymus
Cell surface markers	NK cell antigens (such as CD161), CD25, CD69 and CD122
Phenotype	Effector memory
Subsets	CD4+, CD8+ and CD4-CD8-
Cytokine secretion upon activation	A mixture of Th1 (IFN- γ , TNF- α) and Th2 cytokines (IL-4, IL-12, IL-13), and under certain conditions IL-10 and Th17 cytokines (IL-17 and IL-22)
Cytotoxic activity	Yes
Physiological function	Protective and regulatory immune functions, including inhibition of autoimmune disease development, tumor surveillance and protection against infections

Tabella 1.4.: caratteristiche delle cellule NKT invariante umane, tratta da Bianchini e al, 2017, e modificata³³³.

	Pz SM (tot)	RR di nuova diagnosi. (ARR)	RR "non attive" (NARR)	RR in tp con IFN β	RR in tp con GA	RR in tp con NAT	SP	PP
N° pazienti	165	17	19	31	29	25	24	20
Maschi. n (%)	43 (26)	6 (35)	4 (21)	8 (25)	6 (21)	4 (16)	6 (25)	9 (45)
Femmine. n (%)	122 (74)	11 (65)	15 (79)	23 (75)	23 (79)	21 (84)	18 (75)	11 (55)
Età, anni * Range (min; max)	45.1 $\pm$ 11.6 (19; 66)	35.5 $\pm$ 8.7 (21; 52)	51.1 $\pm$ 7.7 (40; 64)	42.9 $\pm$ 8.4 (24; 58)	40.7 $\pm$ 8.2 (29; 56)	35.5 $\pm$ 9.7 (19; 51)	55.7 $\pm$ 7.9 (38; 66)	57.2 $\pm$ 7.4 (47; 65)
Età all'esordio. anni*	33.8 $\pm$ 10.1	33.7 $\pm$ 9	31.4 $\pm$ 9.5	34 $\pm$ 8.4	34 $\pm$ 9.3	27.9 $\pm$ 7.9	34 $\pm$ 10.2	43.1 $\pm$ 11.7
Durata di malattia (mesi)*	135.7 $\pm$ 107.7	24.5 $\pm$ 23.5	237.4 $\pm$ 98.5	105.8 $\pm$ 78.1	79.4 $\pm$ 58.2	90.3 $\pm$ 52.7	259.1 $\pm$ 104.4	166.7 $\pm$ 94.1
delta-ARR (riferito ai 12 mesi di follow up)	0.2 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 1.2	0	0
MS Severity score*	3.2 $\pm$ 2.9	2.8 $\pm$ 2.7	0.6 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 1.6	2 $\pm$ 2.1	3.4 $\pm$ 2.5	6.4 $\pm$ 2.2	6.2 $\pm$ 2.6
EDSS*	2.6 $\pm$ 2.4	1.3 $\pm$ 1.1	1. $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 1.4	1.1 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 1.3	6.4 $\pm$ 1.2	5.2 $\pm$ 2
delta – EDSS (riferito ai 12 mesi di follow up)	0.1 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 1.3	-0.1 $\pm$ 0.3	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.1	-0.1 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.4

Tabella 4.1.: caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati nello studio, con varie forme di SM e trattati con diversi farmaci immunomodulanti. RR, relapsing-remitting; SP: forma secondaria progressiva; PP: forma primaria progressiva; IFN: β -interferone α ; GA: glatiramer acetato; NAT: natalizumab; * Media $\pm$ SD; ARR: annualized relapse rate; EDSS: Expanded Disability Status Scale.

	Baseline	6 mesi	12 mesi
N° pazienti con SM- RR	17	17	17
EDSS*	1.1±1.2	1.4±1.1	1.5±1.2
delta – EDSS * a 12 mesi	/	/	0±0.8
numero di ricadute nell'anno precedente *	1±0.6	/	0.2±0.4
delta - ARR anno precedente *		/	-0.83±0.6
Terapie effettuate per la SM			
IFN Beta	0	8	8
Glatiramer Acetato	0	6	6
“Responder” (no/si)	/	/	3/17
Disability progression	/	/	3/17

Tabella 4.2.: dati clinici a 6 e a 12 mesi nei pazienti con SM recidivante remittente seguiti in modo longitudinale. RR: relapsing-remitting; ARR: annualized relapse rate; EDSS: Expanded Disability Status Scale. * Valori espressi come media ± DS; Responder = Si: mRIO score 0-1. No: mRIO score>1 dopo 12 mesi; Disability progression = aumento ≥ 1 punto all' EDSS (0.5 se l'EDSS al basale era ≥ 6)

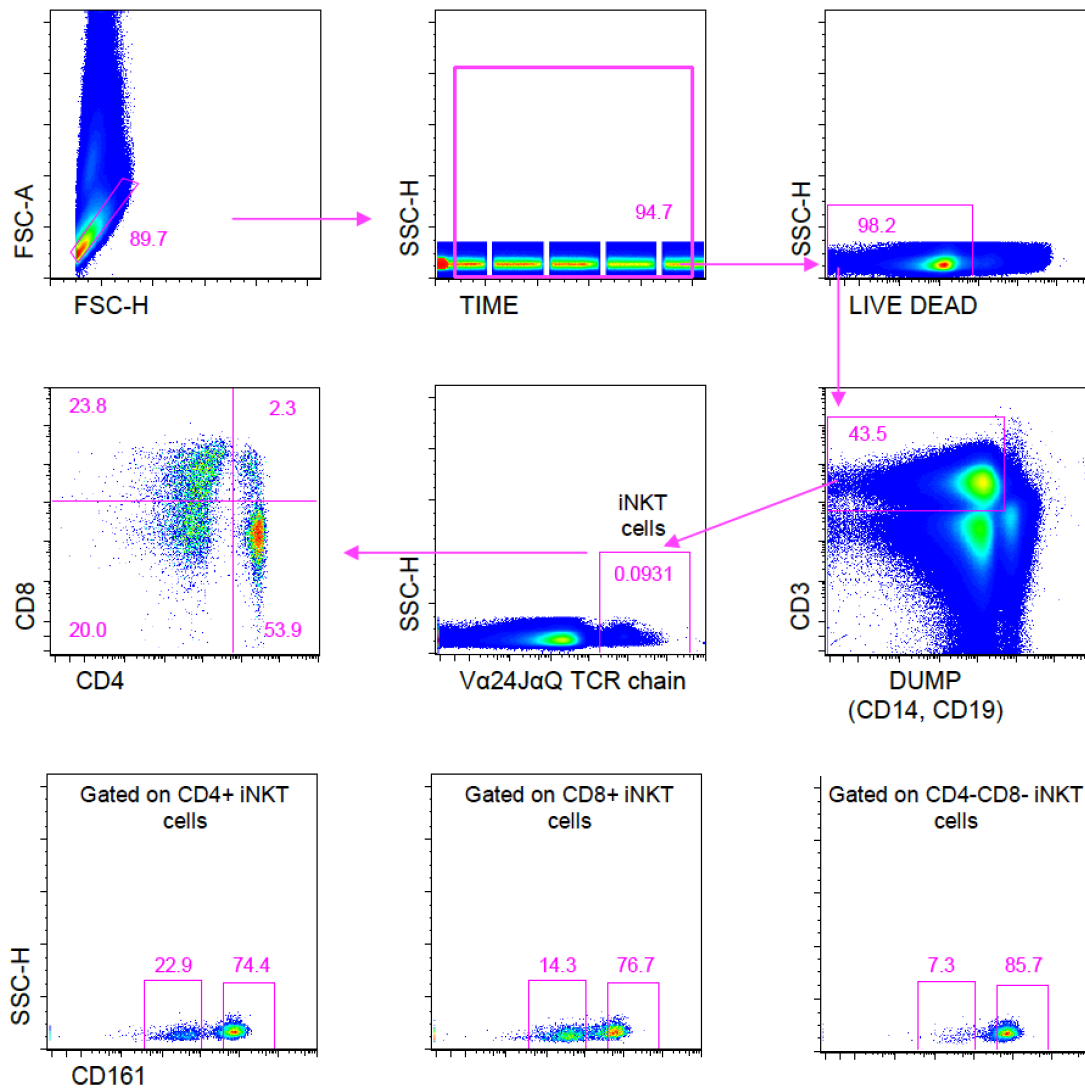


Figura 4.3.: strategia di gating per l'identificazione delle cellule iNKT circolanti e per i vari sottotipi cellulari. Un primo "gate" è stato impostato sulla dispersione laterale in avanti (FSC)-H *versus* FSC-A per eliminare doppioni e aggregati, poi altri due gate sono stati effettuati sul "tempo di acquisizione" e per le cellule viventi, secondo la negatività per la colorazione Live Dead. I linfociti CD3 + T sono stati identificati per la positività al CD3, dopo la rimozione dei monociti (CD14 +) e delle cellule B (CD19 +), riconosciuti nel canale DUMP. Quindi, le cellule iNKT sono state definite in base alla positività per la catena Va24JaQ del TCR. Infine, sono state identificate le cellule iNKT CD4+, CD8+ e CD4-CD8- e in tutti questi sottotipi cellulari è stata valutata l'espressione di CD161.

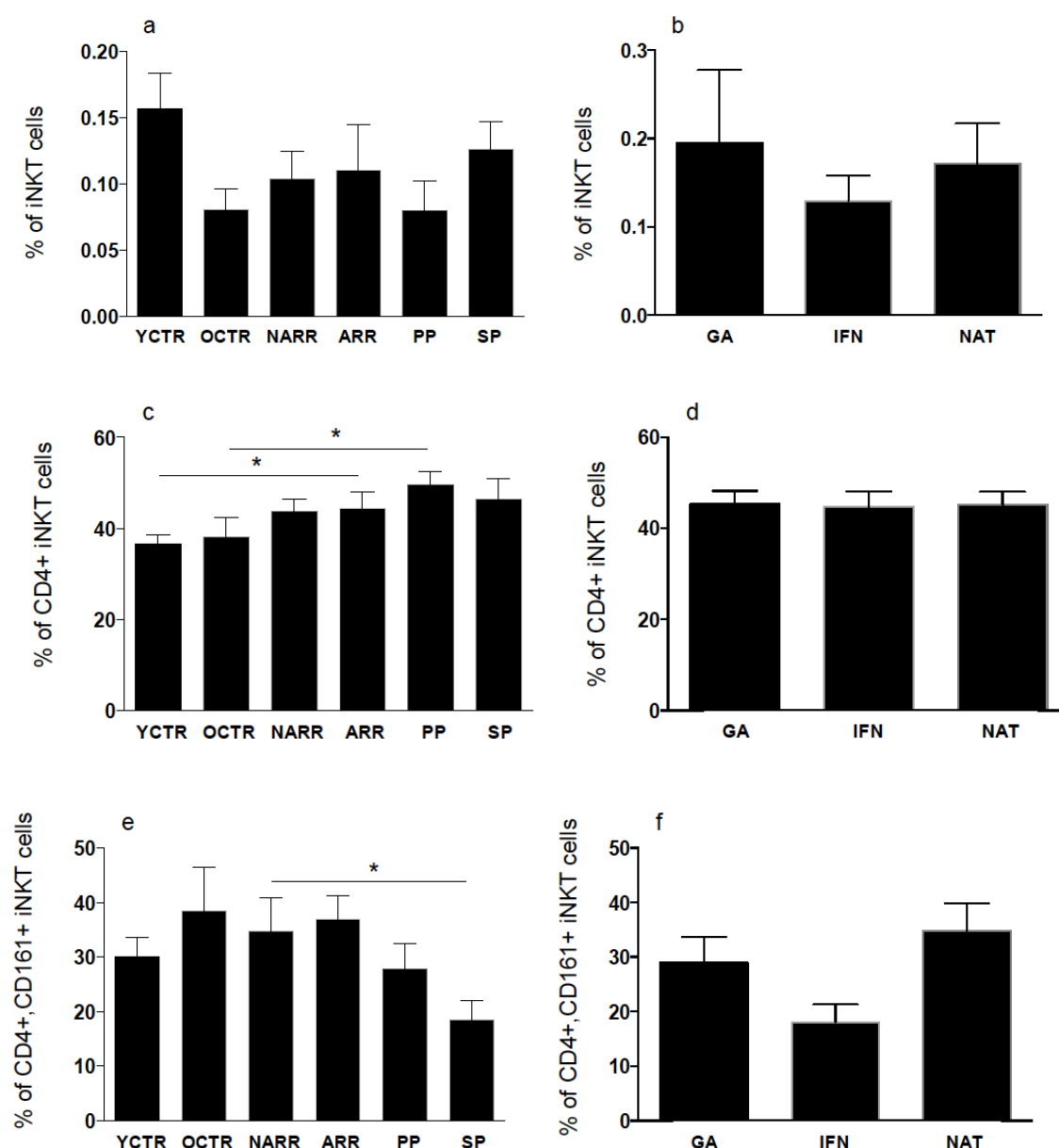


Figura 4.4. Frequenza e fenotipo delle cellule iNKT nei differenti gruppi di SM. (a) Percentuale delle iNKT nei pazienti con diverse forme di SM; (b) Percentuale delle iNKT nei pazienti RR trattati con diversi farmaci; (c) Percentuale delle iNKT CD4+ nei pazienti con diverse forme di SM; (d) Percentuale delle iNKT CD4+ negli RR trattati con diversi farmaci; (e) Percentuale delle iNKT CD4+ che esprimono il CD161 nei pazienti con diverse forme di SM; (f) Percentuale delle iNKT CD4+ che esprimono il CD161 negli RR trattati con diversi farmaci. YCTR, controlli giovani (<46 anni); OCTR, controlli più vecchi (>46 anni); NARR, relapsing-remitting non attivo; ARR, relapsing-remitting attivo; PP, primariamente progressiva; SP, secondariamente progressiva; GA, glatiramer acetate; IFN, β -interferon 1a; NAT, natalizumab. * $p < 0.05$.

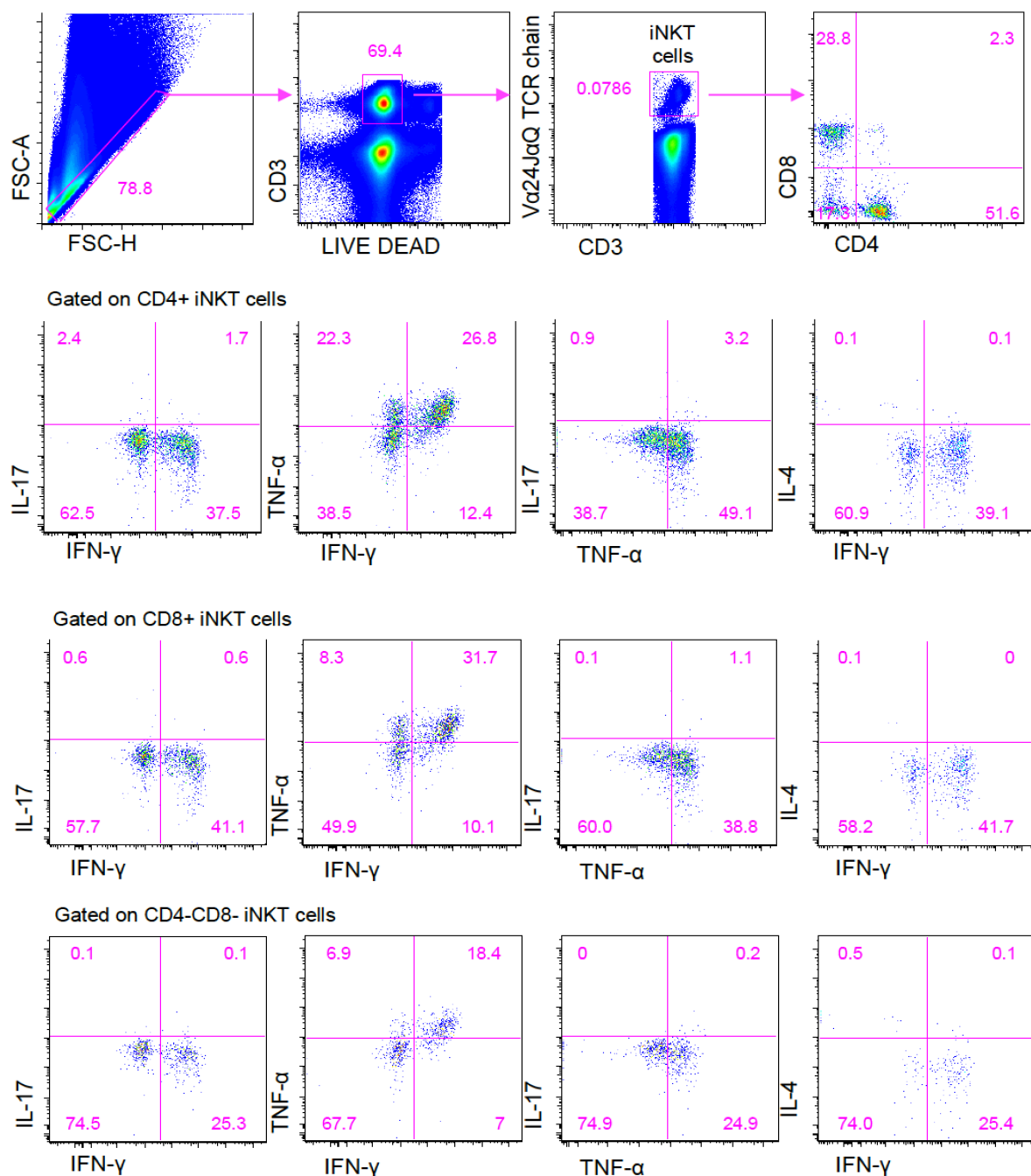


Figura 4.5.: strategia di gating per l'identificazione della produzione di citochine da parte dei sottotipi delle cellule iNKT. Sono stati impostati diversi gate, per escludere i doppioni in base ai parametri fisici (area di dispersione laterale e altezza), quindi per escludere le cellule morte e per identificare i linfociti T CD3⁺ e infine per riconoscere le cellule iNKT e i vari sottotipi sulla base dell'espressione del CD4 e CD8. Tra le cellule iNKT CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ è stata quantificata la produzione di IFN-γ, IL-17, TNF-α e IL-4.

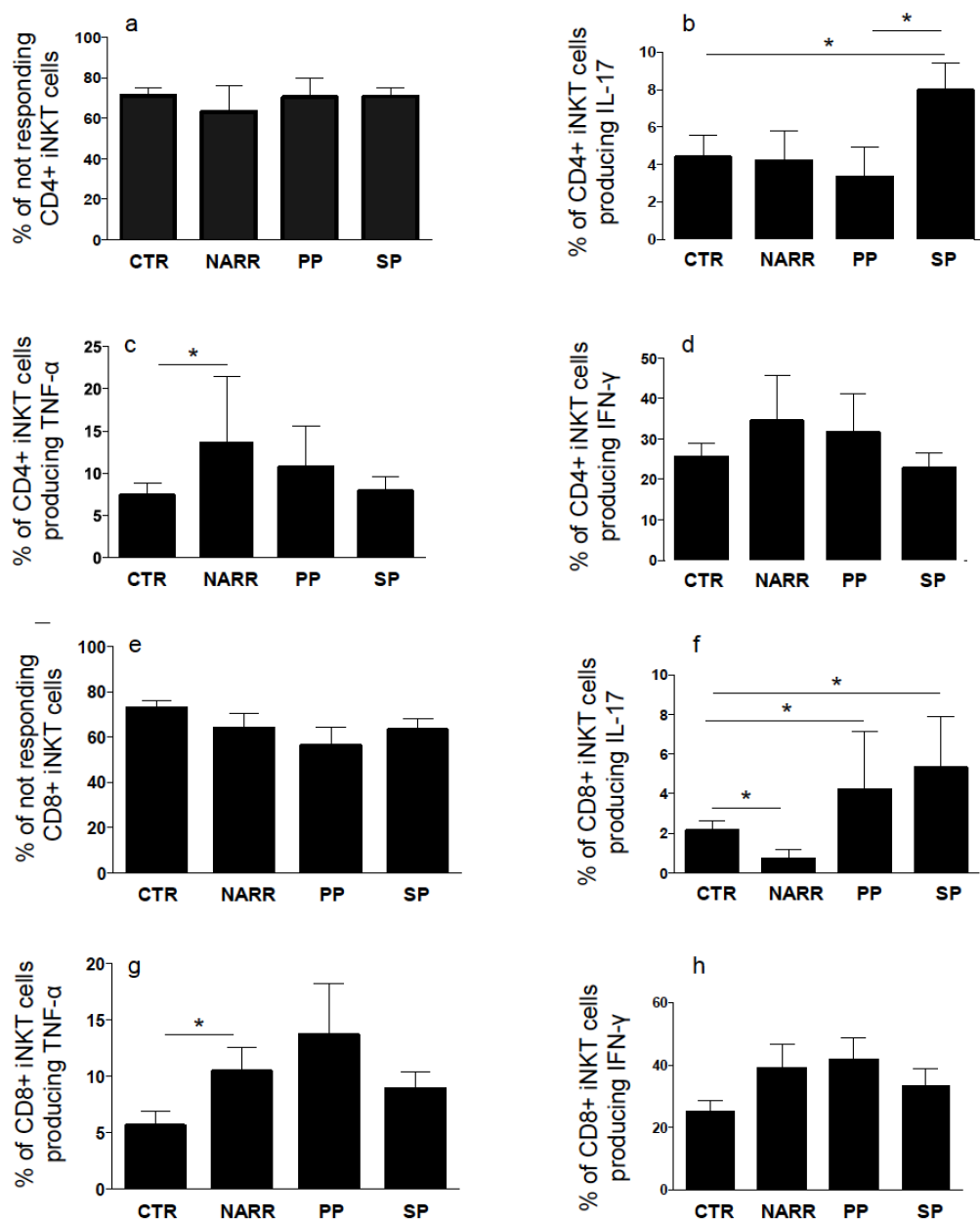


Figura 4.6. Produzione di citochine da parte dei sottotipi di iNKT CD4+ e CD8+ in pazienti con SM non sottoposti a terapie: CTR= controlli (N=26), NARR= pazienti con forma relapsing-remitting non trattati con farmaci (N=5), PP= pazienti con forma primaria (N=4) ed SP= forma secondaria progressiva (N=12). (a) percentuale di iNKT CD4+ che non producono citochine dopo stimolazione *in vitro* (“not responding”); (b) produzione totale di IL-17 dalle iNKT CD4+; (c) produzione totale di TNF- α da parte delle iNKT CD4+; (d) produzione totale di IFN- γ da parte delle iNKT CD4+; (e) percentuale di non responding tra le iNKT CD8+; (f) produzione totale di IL-17 dalle iNKT CD8+; (g) produzione totale di TNF- α da parte delle iNKT CD8+; (h) produzione totale di IFN- γ da parte delle iNKT CD8+. * $p < 0.05$.

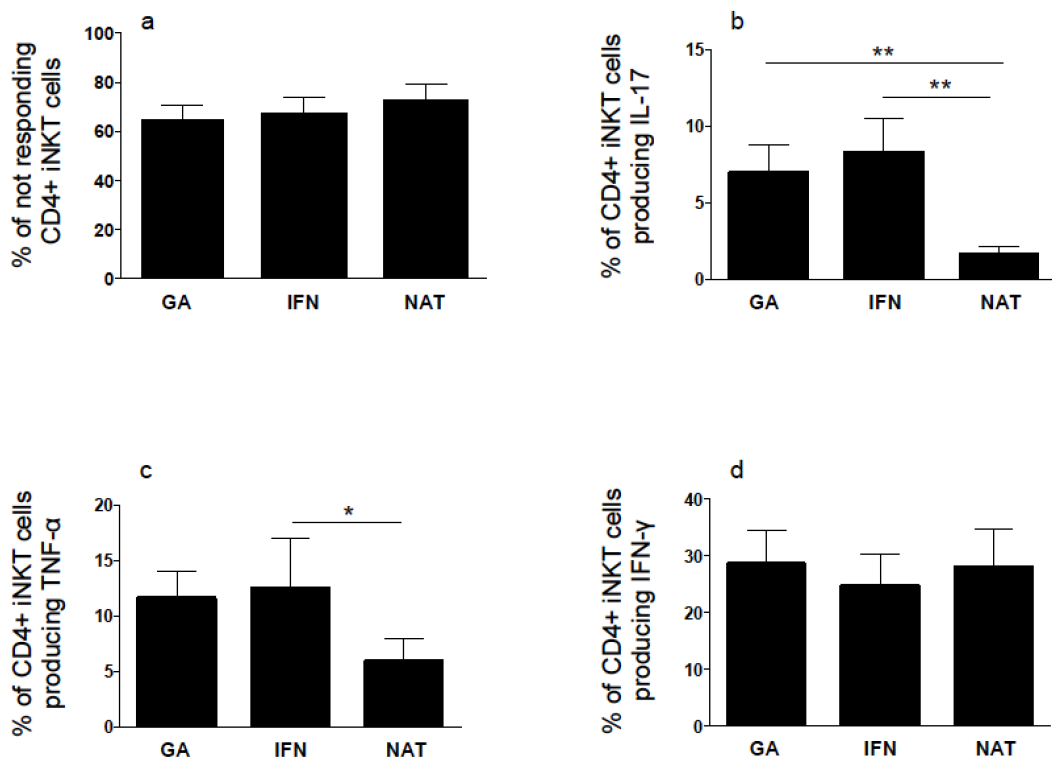


Figura 4.7. Produzione citochinica da parte dei sottotipi di iNKT nei pazienti con RR sottoposti a trattamento con diversi farmaci immunomodulanti. Nei pazienti con forma relapsing remitting di Sm e trattati con glatiramer acetato (N=11), interferone β -1a (N=12) o natalizumab (N=13): (a) percentuale di non responding tra le iNKT CD4+; (b) produzione totale di IL-17 dalle iNKT CD4+; (c) produzione totale di TNF- α da parte delle iNKT CD4+; (d) produzione totale di IFN- γ da parte delle iNKT CD4+; (e) percentuale di non responding tra le iNKT CD8+; (f) produzione totale di IL-17 dalle iNKT CD8+; (g) produzione totale di TNF- α da parte delle iNKT CD8+; (h) produzione totale di IFN- γ da parte delle iNKT CD8+; (i) percentuale di non responding tra le iNKT CD4-CD8-; (j) produzione totale di IL-17 dalle iNKT CD4-CD8-; (k) produzione totale di TNF- α da parte delle iNKT CD4-CD8-; (l) produzione totale di IFN- γ da parte delle iNKT CD4-CD8-; (m) produzione simultanea di IFN- γ e TNF- α da parte delle iNKT CD4-CD8-. GA, glatiramer acetato; IFN, interferon β -1a; NAT, natalizumab. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

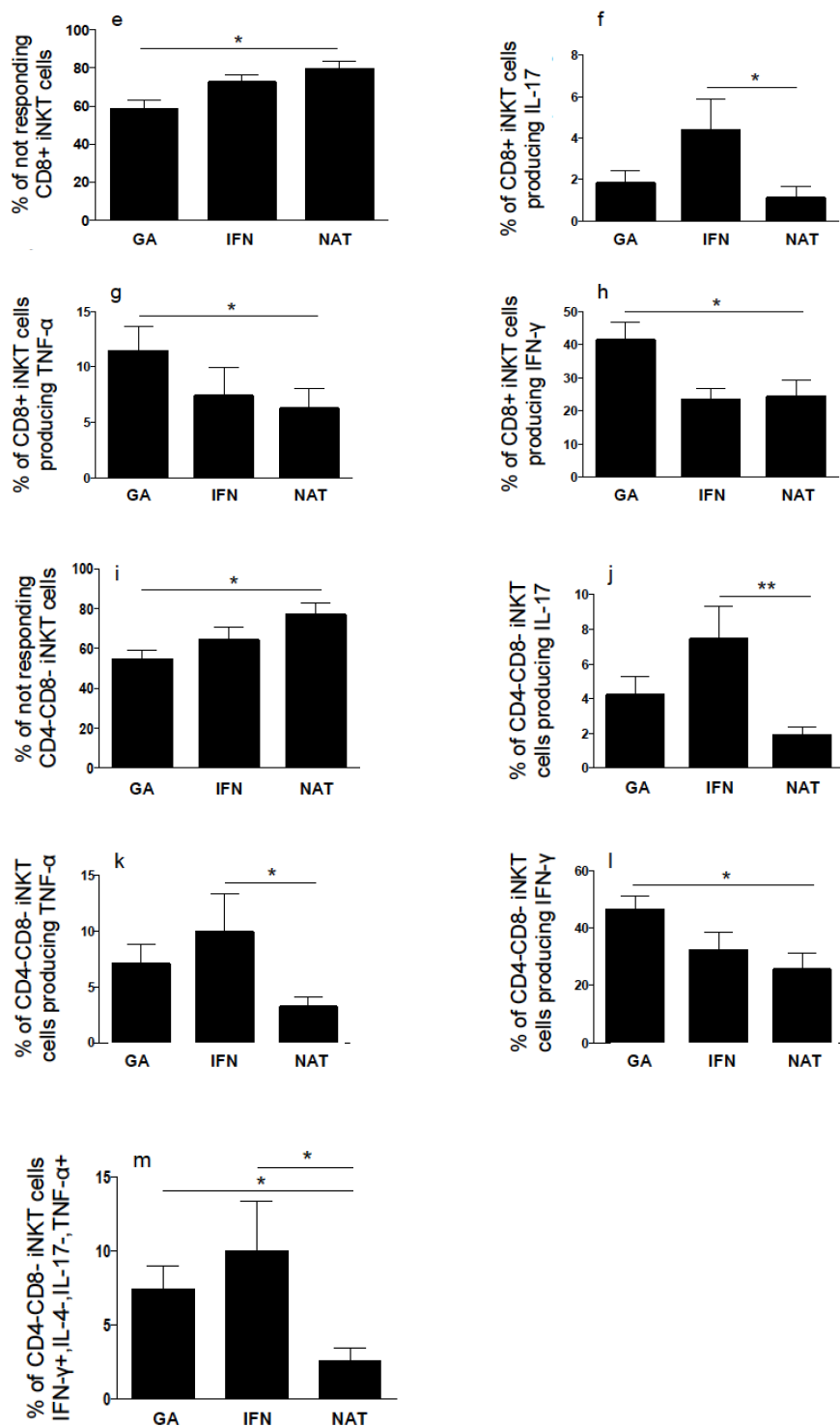


Figura 4.7. (parte seconda) .

9. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine ed hanno permesso e favorito sia i miei studi che la realizzazione di questo lavoro di tesi.

I miei ringraziamenti vanno innanzitutto alla Dr.ssa Patrizia Sola, per gli insegnamenti ed il sostegno che mi ha fornito in questi anni, e per aver sempre creduto in me: senza di lei non sarei arrivata fin qui e non avrei raggiunto questo ulteriore traguardo.

Ringrazio anche il Prof. Paolo Nichelli per la sua disponibilità, per la fiducia che mi ha sempre dimostrato e per la passione che mi ha trasmesso nei confronti della Neurologia e delle Neuroscienze.

Grazie al Prof. Andrea Cossarizza e a tutto il suo gruppo di lavoro per avermi permesso di lavorare con loro a questo progetto di tesi.

Grazie anche a tutto il “gruppo SM”: Diana, Francesca, Roberta, e l’infermiera Francesca, poiché mi hanno sempre sostenuta in questi anni ed hanno contribuito alla mia crescita professionale ed umana.

Un profondo ringraziamento infine va alla mia famiglia che mi accompagna e mi sostiene da sempre: alla mia famiglia “di origine”, punto di riferimento da cui ho ricevuto amore, educazione ed esempio, e alla mia famiglia “nuova”, fonte di grande amore e felicità.

Grazie.