

**2010**

# LA RICERCA

## sulla Sclerosi Multipla finanziata dalla FISM

2010

**SCLE**  
**ROSI**  
**MULT**  
**iPLA**  
fondazione  
italiana

un mondo  
libero dalla SM

A cura di  
Roberta Guglielmino  
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Coordinamento editoriale  
Silvia Lombardo, Valentina Questa  
Area Comunicazione e Ufficio stampa AISM

Copyright 2010  
Fondazione Italiana Sclerosi Multipla

Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus  
Via Operai 40  
16149 Genova  
Tel. 010 27 13 226 - Fax 010 27 13 205  
fism@aism.it

Tutti i diritti sono riservati.  
È vietata la riproduzione con qualsiasi mezzo,  
anche se parziale, senza il permesso scritto dell'editore.

Progetto Grafico:  
Ludovica Tormena - Genova

Chiuso in redazione: maggio 2010  
Finito di stampare: maggio 2010  
Presso Grafiche G7 - Genova

Pubblicato e distribuito da:  
Associazione Italiana Sclerosi Multipla - Onlus  
Via Operai 40  
16149 Genova

ISBN 978-88-71-48-045-9

# Indice

Introduzione	7
--------------	---

L'Associazione Italiana Sclerosi Multipla e la sua Fondazione	9
--	---

## COMITATI SCIENTIFICI

Il Comitato Scientifico FISM 2007	18
Il Comitato Scientifico FISM 2008	19
Il Comitato Scientifico FISM 2009	21

## PROGETTI DI RICERCA

Indice dei Progetti finanziati nel 2007	24
Indice dei Progetti finanziati nel 2008	27
Indice dei Progetti finanziati nel 2009	31
Progetti terminati nel 2009	35

## BORSE DI STUDIO

Indice delle Borse di Studio finanziate nel 2007	104
Indice delle Borse di Studio finanziate nel 2008	105
Indice delle Borse di Studio finanziate nel 2009	106
Borse di Studio terminate nel 2009	107

# Introduzione

L'Associazione Italiana Sclerosi Multipla con la sua Fondazione anche nel 2009 si è confermata il principale ente finanziatore della ricerca scientifica italiana sulla SM e si colloca al quarto posto tra le Associazioni SM a livello internazionale che sostengono la ricerca.

Solo nel 2009 sono stati finanziati 33 progetti di ricerca, 8 borse di studio che coprono i vari ambiti della ricerca sulla SM, e progetti speciali che rappresentano ricerche di ampio respiro, triennali, che vedono la compartecipazione e collaborazione di più centri di ricerca e riguardano temi quali: lo studio di fattori eziopatologici della SM e l'utilizzo delle cellule staminali come futuro trattamento della SM. Inoltre anche nel 2009 AISM e FISM hanno promosso lo sviluppo di tecnologie e strumenti per migliorare la diagnostica e il monitoraggio terapeutico nella SM.

FISM contribuisce anche alle ricerche internazionali promosse dalla Federazione Internazionale di Sclerosi Multipla (MSIF), di cui è parte, e dalle principali associazioni nazionali di Stati Uniti, Canada e Regno Unito.

Nel 2009 ha partecipato alla seconda fase del progetto della MSIF per la creazione di un database internazionale sulla ricerca nella SM e ha promosso l'incontro che ha riunito i maggiori esperti mondiali nel campo della SM pediatrica, per mettere a punto i futuri progetti multicentrici internazionali.

Questo volume raccoglie i risultati dei progetti di ricerca e delle borse di studio dei ricercatori italiani impegnati nel campo della sclerosi multipla che AISM con la sua Fondazione ha finanziato attraverso i Bandi FISM dal 2005 al 2008 e che si sono conclusi nel 2009.

I risultati ottenuti ricoprono diversi ambiti di studio afferenti alla SM, testimoniando il contributo della ricerca finanziata FISM, per affrontare i diversi aspetti della complessità della malattia dall'eziopatogenesi alle terapie.

AISM con la sua Fondazione affronta la sfida di un mondo libero dalla sclerosi multipla attraverso l'impegno di tanti ricercatori da una parte, e di tanti donatori e sostenitori dall'altra, che hanno in AISM e nella sua Fondazione il loro punto di incontro e il catalizzatore dei rispettivi sforzi.

*Mario A. Battaglia*  
Presidente FISM



**L'ASSOCIAZIONE  
ITALIANA  
SCLEROSI  
MULTIPLA  
E LA SUA  
FONDAZIONE**

# AIISM e la sua Fondazione per un mondo libero dalla sclerosi multipla

L'Associazione Italiana Sclerosi Multipla è l'unica organizzazione in Italia che interviene a 360 gradi sulla sclerosi multipla. La sua missione è:

- **Promuovere e finanziare la ricerca scientifica**

AIISM, attraverso la sua Fondazione, indirizza, promuove e finanzia la ricerca scientifica di eccellenza per comprendere le cause della malattia, aumentare la qualità della vita delle persone colpite da SM e individuare la cura definitiva.

- **Promuovere ed erogare servizi a livello nazionale e locale**

AIISM opera in primo luogo per il miglioramento continuo della qualità dei servizi sanitari e sociali erogati dagli enti pubblici e, solo dove non è disponibile un servizio di qualità, interviene direttamente, o attraverso il coinvolgimento di terzi soggetti, nell'erogazione di servizi sanitari e sociali.

- **Rappresentare e affermare i diritti delle persone con sclerosi multipla**

AIISM e la sua Fondazione si confrontano con enti e istituzioni per proporre azioni per il cambiamento, affermare i diritti, tutelare e sostenere tutte le persone con SM.

**Affinché le persone con sclerosi multipla e le loro famiglie abbiano una buona qualità di vita e la piena integrazione sociale.**

L'Associazione Italiana Sclerosi Multipla (AIISM) nasce nel 1968. Riunisce persone con SM, loro familiari e medici e ricercatori, operatori sanitari e sociali e altre persone coinvolte nella causa, **tutti per un mondo libero dalla SM**. Nel 1998 AIISM ha istituito la Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM), che si dedica in modo specifico alla ricerca scientifica sulla SM. AIISM e FISM costituiscono una struttura unitaria che svolge le proprie attività in modo coordinato<sup>1</sup>.

Fin dall'anno della sua costituzione, **aderisce all'Associazione il Premio Nobel Rita Levi Montalcini**, che ha ricoperto la carica di Presidente Nazionale negli anni 1983 - 1986 e che oggi è **Presidente Onorario AIISM e FISM**. Alla professoressa Rita Levi Montalcini è stato intitolato un Premio che ogni anno viene conferito a un giovane ricercatore si è particolarmente distinto nella ricerca sulla SM.

(1) AIISM è Associazione con riconoscimento di personalità giuridica ai sensi del Decreto del Presidente della Repubblica n. 897 del 22.9.1981; è Organizzazione non Lucrativa di Utilità Sociale iscritta nell'anagrafe dell'Agenzia delle Entrate dal 1998; è Associazione di Promozione Sociale iscritta nel relativo Registro Nazionale dal 2001; dagli anni '90, inoltre, è iscritta attraverso le sue articolazioni territoriali nei registri regionali del volontariato di 15 Regioni.

FISM è Fondazione con riconoscimento di personalità giuridica ai sensi del Decreto del Ministero della Sanità pubblicato sulla G.U. n. 42 del 21.02.2000; è Organizzazione non Lucrativa di Utilità Sociale iscritta dal 1998 nell'anagrafe dell'Agenzia delle Entrate.

### **I numeri dell'Associazione**

- **166** realtà locali tra Sezioni e Gruppi operativi;
- **7** Centri sociali e Servizi di riabilitazione AISM, modello per un approccio di tipo interdisciplinare alla SM;
- **1** Centro per la promozione dell'autonomia e di turismo sociale: la Casa Vacanze "I Girasoli" di Lucignano, Arezzo;
- oltre **10.000** volontari;
- oltre **13.000** soci;
- oltre **216.000** donatori.

*Fonte: Bilancio sociale AISM 2009*

Oggi AISM e la sua Fondazione svolgono la propria attività con la stessa passione delle origini, sempre mettendo al centro del proprio agire la persona con SM, puntando al loro pieno coinvolgimento nella definizione delle priorità associative.

Nel 2003, nasce **"Insieme per il Nostro Futuro"**, programma di incontri territoriali fra le persone con SM e i vertici associativi, a partire dai quali si stabiliscono le priorità di intervento e sulla cui base AISM anche pianifica le proprie attività per piani strategici.

Elemento coagulante di tutte le attività è l'**affermazione dei diritti delle persone con SM**, presupposto attraverso il quale interpretare la missione: "un mondo libero dalla sclerosi multipla". Rappresentare e affermare i diritti delle persone con SM è quindi la sintesi dell'impegno di AISM e della sua Fondazione nell'affrontare la sclerosi multipla a 360 gradi. Idee, azioni, progetti e iniziative in ambito di ricerca scientifica, servizi di informazione, raccolta fondi, comunicazione sociale tendono sinergicamente verso un obiettivo comune: riconoscere alle persone con SM i diritti civili universali, quali il diritto alla salute e alle cure mediche, il diritto al lavoro, il diritto all'accessibilità senza barriere e il diritto alla qualità di vita.

Perché ciò avvenga AISM e FISM si confrontano e operano costantemente con le istituzioni e le reti di riferimento, affinché siano affermati i diritti, con due priorità: "lavoro e disabilità" e "piani sanitari e sociali". È nel 2008 che AISM ottiene il riconoscimento giuridico quale ente legittimato ad agire in giudizio per la rappresentanza e l'affermazione dei diritti delle persone con SM oggetto di discriminazione.

AISM opera anche all'interno di una rete di organismi istituzionali per gestire le relazioni con le realtà della SM e agire per affermare i diritti delle persone con SM presso le istituzioni internazionali, nazionali e locali.

A livello internazionale, dal 1967 è parte integrante di Multiple Sclerosis International Federation (MSIF) e di European Multiple Sclerosis Platform (**EMSP**), creata nel 1989 per agire come interfaccia tra le associazioni nazionali e le istituzioni politiche europee.

Nel 1992 AISM ha fondato, insieme al Centro SM di Melsbroek (Belgio), Rehabilitation in MS (**RIMS**), un'organizzazione europea di coordinamento tra i centri di riabilitazione.

AISM aderisce anche a **IOMSN** - International Organisation of MS Nurses, nata nel 1997 per promuovere il ruolo e la formazione degli infermieri specializzati nella sclerosi multipla

all'interno del team interdisciplinare.

In Italia, nel 1994 ha partecipato alla fondazione della Federazione Italiana Superamento Handicap (**FISH**), che ha l'obiettivo di promuovere politiche di superamento dell'handicap che garantiscano i principi di tutela dei diritti umani e civili delle persone con disabilità e rappresentare diritti e istanze verso le istituzioni in Italia.

Altri organismi di cui AISM fa parte sono il Consiglio Nazionale sulla Disabilità (**CND**), la Consulta Nazionale Enti per il Servizio Civile (**CNESC**) e la Federazione Italiana Associazioni Neurologiche (**FIAN**).

Nel 2003 ha costituito in Italia la **SISM** - Società Infermieri Sclerosi Multipla.

**Sul territorio AISM si è sviluppata in modo capillare per essere vicina alle persone con SM "ovunque esse siano"**. Attraverso una rete associativa composta da Coordinamenti regionali, Sezioni e Gruppi operativi, è in grado di attuare localmente la propria missione: offrire servizi mirati alle persone con sclerosi multipla e ai loro familiari, rappresentarne e affermarne i diritti presso le istituzioni locali, sensibilizzare le comunità di riferimento, raccogliere sul territorio i fondi.

I **Centri AISM** completano l'articolazione dell'Associazione, costituiti per garantire alle persone con SM sia **l'inclusione sociale**, sia il **recupero e mantenimento delle funzionalità e dell'autonomia**. Per perseguire questo duplice obiettivo, i Centri si concentrano sull'**innovazione**, testando metodi all'avanguardia nella presa in carico della SM, diffondendo i modelli di riferimento sul territorio e promuovendo la ricerca scientifica nella riabilitazione e nella gestione della SM.

Insieme ai servizi sul territorio, da sempre AISM è impegnata nella diffusione di una corretta informazione sulla sclerosi multipla, attraverso il **Servizio di informazione alle persone con SM e loro familiari**.

Il **Numero Verde AISM 800 803028** è lo storico punto di riferimento per le persone con SM e loro familiari per ricevere informazioni dirette e personalizzate sulla SM e temi attinenti. Il servizio si avvale del neurologo, dell'assistente sociale e del consulente legale e del lavoro.

Con il sito **www.aism.it**, AISM offre aggiornamenti e informazioni sulla ricerca scientifica e sulle attività associative. Forniscono un'informazione costante alle persone con sclerosi multipla anche le **riviste associative, libri bianchi, collane editoriali e pubblicazioni** su aspetti e problematiche connesse alla malattia. A questi si aggiunge il sito **www.giovanioltreasm.it** interamente dedicato al mondo giovanile.

I prodotti editoriali AISM sono tutti messi a disposizione gratuitamente sia online, sia sul territorio presso le Sezioni provinciali.

Un servizio di accoglienza, orientamento e informazione sulla malattia alle persone con sclerosi multipla viene reso da AISM presso le postazioni **Infopoint**, realizzate in collaborazione con i Centri clinici, in cui operano giovani del servizio civile volontario formati dall'Associazione.

Per rispondere alle esigenze dei giovani e delle donne, i più colpiti dalla malattia, AISM in-

traprende percorsi specifici attraverso **i progetti innovativi**: il Gruppo Giovani Nazionale, il Programma Donne e il Progetto Famiglia. Per approfondimenti vedere il Bilancio Sociale AISM 2009.

### **FISM ponte tra la ricerca e le persone con SM**

La ricerca scientifica è fondamentale per sconfiggere la sclerosi multipla. Dal 1986, nel corso degli anni, FISM ha acquisito sempre maggiore consapevolezza del suo ruolo determinante nella ricerca sulla SM e l'obiettivo **“Indirizzare, promuovere e finanziare la ricerca scientifica sulla sclerosi multipla”** è uno dei tre principi strategici sui quali AISM e la sua Fondazione basano la loro missione.

In uno scenario di conoscenza della sclerosi multipla che si sta sempre più delineando, FISM agisce perseguendo strategie specifiche:

- **Indirizzare, promuovere e finanziare la ricerca d'eccellenza, fondamentale e applicata** consentendo costanti progressi verso l'obiettivo di scoprire le cause della SM e trovarne la cura risolutiva.
- **Migliorare la qualità di vita delle persone con SM**: rallentando la progressione della disabilità, migliorando il trattamento dei sintomi e l'approccio globale alla gestione della malattia.
- Promuovere un'**organizzazione della ricerca interdisciplinare e multicentrica** volta a valorizzare le sinergie avvalendosi degli apporti di competenze diverse e di gruppi e centri di ricerca con diversa specificità di indirizzo.
- Promuovere politiche **improntate alla moltiplicazione delle risorse**, all'efficienza e all'efficacia del loro utilizzo, alla piena collaborazione tra ricercatori e alla collaborazione internazionale.

Attualmente FISM segue 9 aree di intervento prioritarie:

- **neurobiologia**: comprendere le varie fasi del processo infiammatorio e del danno agli assoni per sviluppare strategie di protezione e/o di riparazione (ri-mielinizzazione) e prevenire l'insorgenza di disabilità irreversibili;
- **genetica**: ricercare i geni di suscettibilità alla malattia e i geni coinvolti nell'evoluzione clinica e nella risposta ai farmaci;
- **neuro-immunologia**: definire la successione di eventi che porta il sistema immunitario alla distruzione della mielina e al danno assonale: l'identificazione degli antigeni bersaglio dell'attacco autoimmune, dei meccanismi di reclutamento e del ruolo delle varie popolazioni cellulari coinvolte;
- **neuro-immagini**: sviluppare la tecnologia e le applicazioni di neuro-immagini, per caratterizzare il livello cellulare e molecolare, il processo patologico, le correlazioni con la clinica e la risposta alla terapia;
- **marcatori biologici**: identificare i marcatori biologici di diagnosi e di prognosi attraverso nuove metodologie di ricerca;
- **modelli sperimentali**: sviluppare nuovi modelli sperimentali che riproducano più fedelmente di quelli esistenti la patogenesi della malattia e permettano di sperimentare nuove proposte che prevengano e curino le lesioni nelle persone con SM;
- **terapia**: sviluppare strategie per favorire i processi protettivi e riparativi e sviluppare nuove efficaci terapie antinfiammatorie contro la “cascata autoimmune”; perfezionare

le terapie esistenti, sviluppando anche vettori in grado di trasportare le sostanze terapeutiche;

- **terapia sintomatica:** migliorare il trattamento dei sintomi per la qualità di vita della persona con SM, definendo appropriate scale di valutazione dei sintomi stessi e misurando l'efficacia dei farmaci;
- **terapia riabilitativa:** individuare e valutare approcci riabilitativi più efficaci, definire nuovi e innovativi interventi riabilitativi nei diversi ambiti utilizzando nuovi strumenti ad alta tecnologia, neuro-immagini e bioingegneria.

Anche nel 2009 FISM si è confermato il **principale ente finanziatore** della ricerca scientifica italiana sulla SM e si colloca al quarto posto tra le Associazioni SM a livello internazionale, che sostengono la ricerca scientifica. Nel 2009 FISM attraverso il bando di finanziamento per progetti di ricerca e borse di studio ha messo a disposizione dei ricercatori oltre **2,4 milioni di euro**. Ulteriori risorse sono dedicate a progetti strategici.

**Complessivamente, come si evince dal bilancio, FISM ha stanziato per la ricerca nel 2009 circa 4 milioni di euro.**

**Un forte impulso alla ricerca è arrivato negli ultimi anni dal 5 per mille**, potente leva di raccolta fondi i cui ricavi AISM e la sua Fondazione destinano interamente alla ricerca sulla sclerosi multipla.

## I PROGETTI DI RICERCA FISM

Finanziare i migliori ricercatori e la ricerca di eccellenza è l'aspetto fondamentale per perseguire l'obiettivo strategico. I meccanismi della malattia, la riabilitazione e le terapie innovative sono le aree su cui la ricerca si sta focalizzando.

**FISM** finanzia **la ricerca di eccellenza extramurale** attraverso il suo **bando annuale** nell'ambito delle nove aree di intervento prioritario della ricerca sulla SM.

**I progetti speciali pluriennali** rappresentano un'altra importante parte di attività della **ricerca extramurale FISM**. Questi **progetti** rappresentano ricerche **di ampio respiro**, che vedono la **partecipazione e collaborazione di più centri di eccellenza**, rispondono a criteri di emergente necessità sulla base delle evidenze scientifiche recenti e sono dedicati a temi quali:

- lo studio di fattori eziopatogenetici della SM
- dalla ricerca alla cura
- promuovere lo sviluppo di tecnologie e strumenti per migliorare la diagnostica e il monitoraggio terapeutico nella SM

La FISM inoltre svolge **ricerca intramurale** principalmente nell'area della **riabilitazione e della sanità pubblica**.

**FISM promuove e partecipa ad attività di coordinamento internazionale della ricerca e contribuisce a studi internazionali** promossi dalla MSIF e dalle principali associazioni nazionali consorelle: statunitense, canadese, inglese:

- dal 2008 partecipa al progetto MSIF per la creazione di un database internazionale sulla ricerca scientifica nella SM;
- dal 2009, insieme alle associazioni americana, canadese e danese e alla MSIF è sostenitrice di studi sulla SM pediatrica

Nel 2009 FISM ha anche attivato iniziative per valorizzare la **proprietà intellettuale** scaturita dalla **ricerca FISM**. A tale scopo ha introdotto una nuova regolamentazione a partire dal bando 2010 per i progetti di ricerca. La valorizzazione della **proprietà intellettuale** scaturita dalla **ricerca FISM si pone come obiettivo strategico** anche di facilitare il trasferimento dei risultati della ricerca scientifica a quegli attori che possono favorire così lo sviluppo di strumenti diagnostici e terapie per la cura definitiva della sclerosi multipla.



**COMITATI  
SCIENTIFICI  
FISM**

**2007 - 2009**

# Il Comitato Scientifico FISM

## 2007

- Dott. **Antonio Bertolotto**
    - Centro Sclerosi Multipla, Divisione di Neurologia, Azienda Ospedaliera S. Luigi, Orbassano, Torino
  - Prof. **Nicola De Stefano**
    - Dipartimento di Scienze Neurologiche e del Comportamento, Università di Siena
  - Dott. **Gianvito Martino**
    - Unità di Neuroimmunologia, IRCCS, Ospedale San Raffaele, DIBIT, Milano
  - Prof.ssa **Patricia Momigliano Richiardi**
    - Dipartimento Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Novara
  - Dott. **Vito Pistoia**
    - Laboratorio di Oncologia, IRCCS, G. Gaslini, Genova
  - Prof. **Carlo Pozzilli**
    - CENTERS, Centro Neurologico Terapie Sperimentali, Università La Sapienza, Ospedale Sant'Andrea, Roma
  - Prof. **Valter Santilli**
    - Dipartimento di Scienze Apparato Locomotore, Università La Sapienza, Roma
  - Prof. **Giovanni Savettieri**
    - Istituto di Neuropsichiatria, Università degli Studi di Palermo
  - Dott. **Antonio Uccelli**
    - Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Università di Genova
  - Dott. **Bernard Zalc**
    - Biologie des Interactions Neurones/Glie UMR, Hopital de la Salpetriere, Parigi, Francia
- Coordinatore della Ricerca FISM
- Prof. **Giulio Levi**
    - Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio Fisiopatologia di Organo e Sistema, Roma

# Il Comitato Scientifico FISM

## 2008

- Dott. ssa **Francesca Bagnato**
  - Neuroimmunology Branch, NINDS, Waaren G. Magnuson Clinical Center, NIH, Bethesda, USA
- Prof. **Diego Centonze**
  - Fondazione Santa Lucia, IRCCS e Università di Tor Vergata  
Clinica Neurologica  
Dipartimento di Neuroscienze  
Roma
- Prof. **Umberto Dianzani**
  - Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"  
Dipartimento di Scienze Mediche, IRCAD  
Novara
- Dott. **Roberto Furlan**
  - IRCCS Ospedale San Raffaele  
Unità di Neuroimmunologia, DIBIT, Milano
- Prof. **Paolo Girlanda**
  - A.O.U. Policlinico "G. Martino"  
Dipartimento di Neuroscienze, Psichiatria e Anestesiologia  
Servizio di Neurofisiopatologia, Messina
- Prof. **Enrico Granieri**
  - Università di Ferrara  
Ist. di Clinica Neurologica  
Arcispedale Sant'Anna, Ferrara
- Prof. **Jurg Kesselring**
  - Rehabilitationszentrum  
Chefarzt Neurologie  
Valens, Suisse
- Dott. **Gianvito Martino**
  - IRCCS Ospedale San Raffaele  
Unità di Neuroimmunologia, DIBIT, Milano
- Prof. ssa **Patricia Momigliano Richiardi**
  - Università Piemonte Orientale  
"Amedeo Avogadro"  
Dipartimento Scienze Mediche, Novara
- Prof. **Xavier Montalban**
  - Hospital General  
Clinical Neuroimmunology Unit  
Barcelona, Spain
- Dott. **Paolo Muraro**
  - Faculty of Medicine, Imperial College, Charing Cross Campus  
Department of Cellular and Molecular Neuroscience  
Division of Neuroscience and Mental Health  
London, UK
- Dott. **Vito Pistoia**
  - IRCCS G. Gaslini  
Laboratorio di Oncologia, Genova
- Prof. **Marco Salvetti**
  - Università "La Sapienza"  
Dipartimento di Scienze Neurologiche  
Ospedale S. Andrea, Roma
- Dott. **Nicola Smania**
  - Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Verona
- Dott. ssa **Alessandra Solari**
  - Istituto Nazionale Neurologico Carlo Besta  
Laboratorio di Epidemiologia, Milano

# Il Comitato Scientifico FISM 2008

- Prof. **Gioacchino Tedeschi**
  - Seconda Università di Napoli,  
Istituto di Scienze Neurologiche,  
II Clinica Neurologica, Napoli
- Dott. **Lawrence Wrabetz**
  - IRCCS Ospedale "S. Raffaele"  
Dip. di Biotecnologie Avanzate (DIBIT)  
Laboratorio Biologia della Mielina, Milano
- Dott. **Bernard Zalc**
  - Biologie des Interactions Neurones/Glie  
Unite Mixte de Recherche INSERM U-711  
UPMC  
Hopital de la Salpetriere  
Paris, France

Coordinatore della Ricerca FISM

- Prof. **Giulio Levi**
  - Istituto Superiore di Sanità,  
Laboratorio Fisiopatologia di Organo  
e Sistema, Roma

# Il Comitato Scientifico FISM

## 2009

- Dott. ssa **Francesca Bagnato**
  - Neuroimmunology Branch, NINDS, Waaren G. Magnuson Clinical Center, NIH, Bethesda, USA
- Prof. **Umberto Dianzani**
  - Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”  
Dipartimento di Scienze Mediche, IRCAD Novara
- Dott. **Roberto Furlan**
  - IRCCS Ospedale San Raffaele  
Unità di Neuroimmunologia, DIBIT, Milano
- Prof. **Paolo Girlanda**
  - A.O.U. Policlinico “G. Martino”  
Dipartimento di Neuroscienze, Psichiatria e Anestesiologia  
Servizio di Neurofisiopatologia, Messina
- Prof. **Enrico Granieri**
  - Università di Ferrara  
Ist. di Clinica Neurologica  
Arcispedale Sant'Anna, Ferrara
- Dott. ssa **Maria Grazia Grasso**
  - Fondazione Santa Lucia  
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico  
Unità Operativa “E” Sezione Sclerosi Multipla, Roma
- Prof. **Jurg Kesselring**
  - Rehabilitationszentrum  
Chefarzt Neurologie  
Valens, Suisse
- Dott. **Gianvito Martino**
  - IRCCS Ospedale San Raffaele  
Unità di Neuroimmunologia, DIBIT, Milano
- Prof. **Xavier Montalban**
  - Hospital General  
Clinical Neuroimmunology Unit  
Barcelona, Spain
- Dott. **Paolo Muraro**
  - Faculty of Medicine, Imperial College, Charing Cross Campus  
Department of Cellular and Molecular Neuroscience  
Division of Neuroscience and Mental Health  
London, UK
- Dott. **Vito Pistoia**
  - IRCCS G. Gaslini  
Laboratorio di Oncologia, Genova
- Prof. **Marco Salvetti**
  - Università “La Sapienza”  
Dipartimento di Scienze Neurologiche  
Ospedale S. Andrea, Roma
- Dott. ssa **Alessandra Solari**
  - Istituto Nazionale Neurologico Carlo Besta  
Laboratorio di Epidemiologia, Milano
- Prof. **Gioacchino Tedeschi**
  - Seconda Università di Napoli,  
Istituto di Scienze Neurologiche,  
Il Clinica Neurologica, Napoli
- Dott. **Lawrence Wrabetz**
  - IRCCS Ospedale “S. Raffaele”  
Dip. di Biotecnologie Avanzate (DIBIT)  
Laboratorio Biologia della Mielina, Milano

# Il Comitato Scientifico FISM 2009

- Dott. **Bernard Zalc**
- Biologie des Interactions Neurones/Glie  
Unite Mixte de Recherche INSERM U-711  
UPMC  
Hopital de la Salpetriere  
Paris, France

Coordinatore della Ricerca FISM

- Prof. **Giulio Levi**
- Istituto Superiore di Sanità,  
Laboratorio Fisiopatologia di Organo  
e Sistema, Roma

**I PROGETTI  
DI RICERCA  
FINANZIATI  
DALLA FISM**

**2007 - 2009**

**Bertolotto Antonio**

• 2 anni

• € 80.000

Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla e Neurobiologia Clinica, Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano (Torino)

- *Approccio Proteo-Peptidomico per l'identificazione di biomarcatori di malattia in campioni di liquido cerebrospinale*

**Borsellino Giovanna**

• 2 anni

• € 120.000

Unità di Neuroimmunologia e Citofluorimetria, Fondazione Santa Lucia, Roma

- *Ruolo dei Linfociti T regolatori CD39+ nella Sclerosi Multipla*

**Cocco Eleonora**

• 1 anno

• € 39.000

Centro Sclerosi Multipla, Ospedale Binaghi, Università degli Studi di Cagliari

- *Ruolo del genoma mitocondriale nella sclerosi multipla primaria progressiva in Sardegna*

**Cosentino Marco**

• 1 anno

• € 12.500

Sezione di Farmacologia Sperimentale e Clinica, Dipartimento di Medicina Clinica, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

- *Uso di piante medicinali e rimedi erboristici da parte di persone affette da sclerosi multipla*

**Farina Cinthia**

• 2 anni

• € 80.000

Laboratorio di Immunobiologia delle Malattie Demyelinizzanti del Sistema Nervoso Centrale, U.O. Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Nazionale Carlo Besta, Milano

- *Funzione di TrkB sugli astrociti reattivi nelle placche di sclerosi multipla*

**Gilli Francesca**

• 2 anni

• € 80.000

Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla e Neurobiologia Clinica, Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano (Torino)

- *Espressione, shedding, regolazione trascrizionale e funzione del recettore dell'IFN $\alpha$ /b in cellule linfomonocitarie di pazienti con sclerosi multipla in terapia con IFNbeta*

**Granieri Enrico**

• 1 anno

• € 25.000

Sezione di Clinica Neurologica, Dipartimento di Discipline Medico Chirurgiche della Comunicazione e del Comportamento, Università degli Studi di Ferrara

- *Ruolo dei microRNA nel funzionamento delle cellule T immunoregatorie CD4 CD25 nell'ambito della Sclerosi Multipla*

**Leocani Letizia**

• 1 anno

• € 24.000

Laboratorio di Psicofisiologia e Neurofisiologia Sperimentale, Dipartimento di Neurofisiologia Clinica, IRCCS Istituto Scientifico Universitario Ospedale San Raffaele, Milano

- *Mappaggio della plasticity della corteccia sensorimotoria nella Sclerosi Multipla*

# Progetti finanziati nel

# 2007

---

**Marzola Pasquina**

• 1 anno

• € 25.000

Sezione di Istologia e Anatomia, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona

- *Imaging funzionale nello studio della plasticità neuronale in un modello sperimentale di sclerosi multipla*

---

**Novelli Francesco**

• 1 anno

• € 50.000

Centro Ricerche Medicina Sperimentale (CERMS), Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale, Ospedale San Giovanni Battista, Università degli Studi di Torino

- *Analisi della differenziazione e della regolazione negativa di linfociti umani T helper (Th)17 nella Sclerosi Multipla*

---

**Pantano Patrizia**

• 2 anni

• € 55.000

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi La Sapienza, Roma

- *Ruolo fisiopatologico e prognostico dell'aumentata attività corticale nella SM recidivante-remittente: uno studio con FMRI E TMS*

---

**Pozzilli Carlo**

• 1 anno

• € 30.000

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi La Sapienza, Roma

- *Livello degli ormoni sessuali, deficit cognitivo e atrofia cerebrale in donne affette da sclerosi multipla recidivante-remittente con o senza assunzione di terapia estroprogestinica*

---

**Priori Alberto**

• 1 anno

• € 25.000

Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano, e Laboratorio di Neurofisiopatologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano

- *La stimolazione transcranica con correnti dirette (tDCS) della corteccia motoria primaria per il trattamento della fatica nella sclerosi multipla*

---

**Pugliatti Maura**

• 1 anno

• € 50.000

Istituto Clinica Neurologica, Università degli Studi di Sassari

- *Fattori di rischio nella sclerosi multipla: uno studio internazionale caso-controllo*

---

**Riccio Paolo**

• 2 anni

• € 50.000

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-forestali, Università della Basilicata, Potenza

- *Alimenti sani e funzionali per i pazienti con SM*

---

**Roccatagliata Luca**

• 2 anni

• € 45.000

Dipartimento di Neuroscienze Oftalmologia e Genetica, Università degli Studi di Genova

- *Ruolo del corpo calloso nella coordinazione motoria bimanuale in pazienti affetti da Sclerosi Multipla*

---

**Salveti Marco**

• 3 anni

• € 450.000

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi La Sapienza, Roma

- *Coinvolgimento del virus di Epstein Barr nella eziopatogenesi della SM: da "se" a "come"*

# Progetti finanziati nel

# 2007

---

**Sette Claudio****• 1 anno****• € 25.000**

Laboratorio di Neuroembriologia, Fondazione Santa Lucia, Roma

- *Ruolo dei recettori Toll-like (TLRs) e di MyD88 nella sclerosi multipla*

---

**Solari Alessandra****• 2 anni****• € 110.000**

Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

- *Efficacia di un supplemento informativo strutturato per le persone con sclerosi multipla di nuova diagnosi (SIMS-Trial)*

---

**Verderio Claudia****• 2 anni****• € 45.000**

Dipartimento di Farmacologia e Tossicologia Mediche, Istituto di Neuroscienze del CNR, Milano

- *Imipramina come nuovo trattamento per inibire il rilascio di IL1 beta nella sclerosi multipla*

**Asselta Rosanna**

• 1 anno

• € 40.000

Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano

- *Nuovi attori nella genetica della sclerosi multipla: PRKCA e microRNA*

**Battaglia Giuseppe**

• 2 anni

• € 130.000

Istituto Neurologico Mediterraneo, Neuromed, Neuroscienze e Neurofarmacologia, Pozzilli, Isernia

- *Ruolo dei recettori metabotropici del glutammato in modelli sperimentali di sclerosi multipla*

**Bernardinelli Luisa**

• 1 anno

• € 30.000

Dipartimento di Scienze Sanitarie Applicate e Psicomportamentali, Laboratorio di Epidemiologia e Statistica Genetica, Università degli Studi di Pavia

- *Geni ACCN1 e PRKCA e sclerosi multipla: uno studio di associazione in due popolazioni diverse geneticamente, sarda (Nuoro) e britannica*

**Bonetti Bruno**

• 2 anni

• € 70.000

Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Neurologia, Ospedale Policlinico, Università degli Studi di Verona

- *Approccio proteomico per la identificazione di autoantigeni riconosciuti da IgG del liquor cerebro-spinale nella sclerosi multipla*

**Cara Andrea**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

- *Sviluppo di vettori lentivirali nonintegranti per la terapia genica contro il virus di Epstein-Barr e sue potenziali applicazioni nella terapia della sclerosi multipla*

**Coccia Eliana Marina**

• 1 anno

• € 30.000

Dipartimento Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

- *Cellule dendritiche plasmacitoidi: ruolo nel controllo della risposta immunitaria in pazienti trattati con IFN- $\beta$*

**Costantin Gabriela**

• 1 anno

• € 50.000

Dipartimento di Patologia, Sezione di Patologia Generale, Università degli Studi di Verona

- *Utilizzo terapeutico della pantetina nell'encefalomielite sperimentale autoimmune*

**Cucca Francesco**

• 3 anni

• € 400.000

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari

- *Uno studio di associazione su tutto il genoma in Sardegna per svelare i fattori genetici predisponenti nei confronti della sclerosi multipla*

**Del Carro Ubaldo**

• 1 anno

• € 20.000

Dipartimento di Neurologia, Istituto Scientifico Ospedale San Raffaele, Milano

- *Efficacia analgesica e sicurezza della stimolazione magnetica transcranica ripetitiva nei pazienti con sclerosi multipla e dolore centrale neuropatico*

---

**Deriu Franca**

• 2 anni

• € 60.000

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia e Bioingegneria dell'Uomo, Università degli Studi di Sassari

- *Studio neurofisiologico e neuroradiologico dei circuiti del tronco dell'encefalo in pazienti con sclerosi multipla*

---

**Di Luca Dario**

• 1 anno

• € 45.000

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Ferrara

- *Studio delle alterazioni nelle risposte antivirali dell'immunità innata in pazienti con SM*

---

**Dianziani Umberto**

• 2 anni

• € 120.000

Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Novara

- *Ricerca di marcatori coinvolti nello sviluppo della sclerosi multipla: correlazione di alterazioni genetiche e funzionali dell'immunità cellulo-mediata con marcatori dell'infezione da EBV*

---

**Fainardi Enrico**

• 1 anno

• € 45.000

U.O. di Neuroradiologia, Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Arcispedale S. Anna di Ferrara

- *Caratterizzazione molecolare ed anticorpale della persistenza cerebrale del virus Epstein-Barr e dei suoi meccanismi regolatori periferici T-mediati nella sclerosi multipla*

---

**Filippi Massimo**

• 2 anni

• € 130.000

Divisione di Neurologia, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano

- *Correlati funzionali e strutturali dell'attività del network cognitivo in pazienti con SM e diversi fenotipi di malattia*

---

**Fiorillo Maria Teresa**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma

- *La transaldolasi come bersaglio di risposte linfocitarie T CD8+ in pazienti con sclerosi multipla: uno studio funzionale e strutturale*

---

**Margutti Paola**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore da Sanità, Roma

- *Identificazione di nuovi autoantigeni neuronali ed endoteliali e valutazione del potenziale ruolo patogenetico degli autoanticorpi verso di essi specifici*

---

**Martinelli Boneschi Filippo**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Neurologia & INSPE, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

- *Analisi genetica e trascrittomica di DPP6: un nuovo gene candidato nella sclerosi multipla primariamente progressiva*

---

**Muraro Paolo**

• 2 anni

• € 60.000

Department of Cellular and Molecular Neuroscience, Division of Neuroscience and Mental Health, Imperial College, London (UK)

- *Identificazione di fattori prognostici condizionanti l'esito a lungo termine della sclerosi multipla: estesa analisi del database di London Ontario*

---

**Pesole Graziano**

• 1 anno

• € 25.000

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Tecnologie Biomediche, Sede di Bari

- *Analisi su larga scala di agenti infettivi associati alla sclerosi multipla mediante sequenziamento random e massivo di cDNA*

---

**Pinton Paolo**

• 2 anni

• € 60.000

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università degli Studi di Ferrara

- *Omeostasi intracellulare del Ca<sup>2+</sup> e mitocondri in oligodendrociti durante stress ossidativo e loro ruolo nella morte per apoptosi*

---

**Pugliatti Maura**

• 2 anni

• € 129.500

Clinica Neurologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli studi di Sassari

- *Fattori di rischio nella sclerosi multipla: uno studio internazionale caso-controllo*

---

**Quartarone Angelo**

• 1 anno

• € 50.000

Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Psichiatriche ed Anestesiologiche, Università degli Studi di Messina

- *Studio della fatica centrale nella sclerosi multipla: dalla preparazione all'esecuzione del movimento*

---

**Raiteri Maurizio** sostituito da **Fedele Ernesto**

• 2 anni

• € 100.000

Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedicale, Università degli Studi di Genova

- *Studio sul ruolo funzionale di RANTES sulla trasmissione glutamatergica nel cervello umano ed in topi EAE*

---

**Ria Francesco**

• 1 anno

• € 25.000

Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica, Roma

- *Meccanismi molecolari del trasferimento delle informazioni ambientali alle cellule T nella patogenesi della EAE*

---

**Santilli Valter**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Scienze dell'Apparato Locomotore, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

- *Valutazione clinica e biomeccanica dell'efficacia di energia vibratoria e tossina botulinica sulla spasticità nel paziente con sclerosi multipla. Studio clinico multicentrico randomizzato e controllato*

---

**Solaro Claudio**

• 2 anni

• € 60.000

Dipartimento di Neurologia, ASL 3 Genovese, Genova

- *Valutazione e terapia mediante robot nel trattamento del deficit dell'arto superiore nella sclerosi multipla: uno studio multi-centro, randomizzato e controllato*

---

**Urbani Andrea**

• 1 anno

• € 25.000

Centro Europeo Ricerca sul Cervello, Dept. Experimental Neurosciences, IRCCS S. Lucia, Roma

- *Indagini di proteomica e metabolomica per l'identificazione di marcatori molecolari di sclerosi multipla*

## Batocchi Anna Paola

• 1 anno

• € 70.000

Dipartimento di Neuroscienze, Università Cattolica Istituto di Neurologia, Roma

- *Sottopopolazioni di linfociti T CD8 effettrici e della memoria e decorso clinico nella sclerosi multipla*

## Bernardinelli Luisa

• 2 anni

• € 140.000

Dipartimento di Scienze Sanitarie Applicate e Psicocomportamentali, Università degli Studi di Pavia

- *Il ruolo del gene ACCN1 nella suscettibilità e patogenesi della sclerosi multipla*

## Bifulco Maurizio

• 2 anni

• € 140.000

Scienze Farmaceutiche Fisciano, Università degli Studi di Salerno

- *Progettazione, sintesi e studio dell'efficacia terapeutica di nuovi modulatori del sistema endocannabinoide nella sclerosi multipla*

## Borreani Claudia

• 1 anno

• € 40.000

Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Unità di Psicologia, Milano

- *Valutazione qualitativa di un ausilio informativo (CD e booklet "Sapere Migliora") per le persone con sclerosi multipla (SIMS-Qual)*

## Cecconi Francesco

• 2 anni

• € 70.000

Dipartimento di Neuroscienze Sperimentali, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

- *Ruolo dell'autofagia nella regolazione delle cellule T associata alla sclerosi multipla*

## Chiarugi Alberto

• 2 anni

• € 70.000

Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università di Firenze

- *Inibizione del fenomeno dell'epitope spreading con farmaci inibitori della PARP-1 e relative implicazioni terapeutiche in modelli di R-EAE*

## Coccia Eliana Marina

• 2 anni

• € 105.000

Dipartimento di Malattie infettive, parassitarie ed immuno-mediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

- *Cellule dendritiche plasmacitoidi: ruolo nel controllo della risposta immunitaria in pazienti trattati con IFN- $\beta$*

## Cosentino Marco

• 1 anno

• € 50.000

Dipartimento di Clinica Medica Sezione di Farmacologia Sperimentale e Clinica, Università dell'Insubria, Varese

- *Vie adrenergiche/dopaminergiche nei linfociti circolanti come marcatori precoci nelle sindromi clinicamente isolate che progrediscono in sclerosi multipla*

## Edomi Paolo

• 1 anno

• € 45.000

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste

- *Validazione di nuovi marcatori biologici della sclerosi multipla e loro utilizzo per la produzione di un chip proteico diagnostico*

## Foti Maria

• 1 anno

• € 50.000

Dipartimento di Bicocca Biotecnologie e Bioscienze, Laboratorio di medicina molecolare e immunologia, Università degli Studi di Milano

- *Identificazione di biomarcatori e nuovi bersagli terapeutici nella sclerosi multipla mediante l'utilizzo di approcci di biologia dei sistemi complessi*

## Furlan Pier Maria

• 3 anni

• € 52.000

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche S.C.D.U. Psichiatria Orbassano, Università degli Studi di Torino

- *L'efficacia dell'Eye Movement Desensitization and Reprocessing (EMDR) in pazienti con Disturbo Post Traumatico da Stress con diagnosi di sclerosi multipla. Uno studio randomizzato controllato*

## Gauzzi Maria Cristina

• 2 anni

• € 55.000

Istituto Superiore di Sanità Biologia Cellulare e Neuroscienze, Roma

- *1,25(OH)2D3 come modulatore della SM: metabolismo, attività immunoregolatoria e relazione con l'IFN di tipo I in cellule dendritiche*

## Giardino Luciana

• 2 anni

• € 70.000

Dip. Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali (Dimorfipa), Università di Bologna

- *Insuccesso della rimielinizzazione in sclerosi multipla: un caso di ipotiroidismo tissutale indotto dall'infiammazione?*

## Gilli Francesca

• 2 anni

• € 90.000

AOU S. Luigi Gonzaga Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla Orbassano, Torino

- *I meccanismi immuno-biologici della gravidanza: come possono indurre una spontanea remissione nella sclerosi multipla*

## Grasso Maria Grazia

• 2 anni

• € 80.000

IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma

- *La disfagia nella sclerosi multipla: correlazioni cliniche di risonanza e di fibroscopia seguita da riabilitazione*

## Liuzzi Grazia Maria

• 2 anni

• € 50.000

Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare "Ernesto Quagliariello", Università degli Studi di Bari

- *Analisi del network proteolitico nella sclerosi multipla: una breccia significativa verso la comprensione dei meccanismi patogenetici e la valutazione laboratoristica dell'efficacia della terapia*

## Malucchi Simona

• 3 anni

• € 100.000

Azienda Ospedaliera Universitaria San Luigi Gonzaga Centro di Riferimento Regionale Sclerosi Multipla & Neurobiologia Clinica Orbassano, Torino

- *Studio longitudinale sul funzionamento neuropsicologico in pazienti con sclerosi multipla in confronto con la popolazione generale*

**Mori Lucia**

• 1 anno

• € 30.157

University Hospital Basel, Department of Biomedicine Basel, Switzerland

- *Topi CD1-transgenici come nuovo modello sperimentale per lo studio della SM*

**Muzio Luca**

• 2 anni

• € 100.000

Dip. Neuroscienze, Institute of Experimental Neurology (INSpe), Laboratorio di Neuroimmunologia, HSR Fondazione San Raffaele del monte Tabor, Milano

- *Studio dei meccanismi molecolari del danno neuronale nelle malattie neuro-infiammatorie*

**Novelli Francesco**

• 2 anni

• € 80.000

Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale Centro Ricerche Medicina Sperimentale (CERMS) Ospedale San Giovanni Battista, Università di Torino

- *Caratterizzazione funzionale dei linfociti T helper (Th)17 nella sclerosi multipla ed analisi dei meccanismi della loro inattivazione*

**Pedotti Rosetta**

• 2 anni

• € 50.000

Unità di Patologia Muscolare e Immunologia, Istituto Nazionale Neurologico Carlo Besta, Milano

- *Demielinizzazione anticorpale nella sclerosi multipla: uno studio translazionale dall'uomo al topo con anticorpi purificati da pazienti con SM in relapse clinica*

**Piccio Laura**

• 2 anni

• € 120.000

Washington University in St Louis School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA

- *Ruolo di TREM-2 nella sclerosi multipla e nel suo modello animale*

**Priori Alberto**

• 1 anno

• € 40.000

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Università degli Studi di Milano

- *La stimolazione transcranica con correnti dirette (tDCS) delle aree corticali motorie per il trattamento della fatica nella sclerosi multipla*

**Rigolio Roberta**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche, Università di Milano-Bicocca, Monza

- *Studio pilota per determinare il contributo dei neutrofili nello sviluppo di malattia in due modelli animali per la sclerosi multipla che mimano la forma acuta e recidivante-remittente di malattia*

**Rossini Paolo Maria**

• 1 anno

• € 60.000

Dipartimento di Neuroscienze Cliniche, Università Campus Bio-Medico Ospedale S. Giovanni, Roma

- *Fatica nella Sclerosi Multipla: Identificazione di un profilo neuroanatomico e funzionale [FaMuS]*

**Rovaris Marco**

• 2 anni

• € 55.000

Fondazione Don Carlo Gnocchi, IRCCS Santa Maria Nascente Unità Operativa Sclerosi Multipla, Milano

- *Fisiopatologia del danno tissutale nella sclerosi multipla progressiva: studio comparativo immunologico e di RM rispetto a pazienti con malattia del motoneurone*

**Sechi Leonardo Antonio**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

- *Associazione fra geni e ambiente nella sclerosi multipla*

**Sette Claudio**

• 2 anni

• € 70.000

Fondazione Santa Lucia, Laboratorio di Neuroembriologia, Roma

- *MyD88: un nuovo bersaglio molecolare per la terapia della sclerosi multipla*

**Smania Nicola**

• 2 anni

• € 70.000

Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Università degli Studi di Verona

- *Effetti di un training dell'abilità di integrazione sensori-motoria sui disturbi dell'equilibrio in pazienti affetti da sclerosi multipla*

**Solari Alessandra**

• 1 anno

• € 40.000

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Unità di Neuroepidemiologia, Milano

- *Indagine postale di auto-valutazione del benessere fisico e psicologico negli adulti con SM e nelle persone a loro vicine: follow-up a lungo termine (Studio POSMOS)*

**Tata Ada Maria**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma La Sapienza, Roma

- *Acetilcolina di derivazione non neuronale nella sclerosi multipla: possibile duplice ruolo come modulatore della risposta immunitaria e nel reclutamento di progenitori oligodendrocitari*

**Venturi Giulietta**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento del Farmaco Reparto Farmaci Antitumorali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

- *Exosomi, virus di Epstein-Barr e sclerosi multipla: ruolo potenziale nella patogenesi e come biomarcatori per il monitoraggio clinico della malattia*

**Vercellino Marco**

• 1 anno

• € 25.000

Dipartimento di Neuroscienze, Università of Torino

- *Ruolo delle progranulina nella sclerosi multipla*

# **PROGETTI DI RICERCA TERMINATI NEL 2009**

## Meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto rimielinizzante del TNF: espressione e attività funzionale del recettore 2 del TNF in oligodendrociti, astrociti e microglia

### ► **Cristina Agresti**

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Collaboratori:*

- ▷ **Caterina Veroni**
- ▷ **Lucia Gabriele**
- ▷ **Francesca Aloisi**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Klaus Pfizenmaier**, Institute of Cell Biology and Immunology, University of Stuttgart
- ▷ **Eliana Coccia**, Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immuno-mediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### Premesse

A livello neuropatologico, la sclerosi multipla (SM) è caratterizzata da aree focali di demielinizzazione nel sistema nervoso centrale (SNC). Nonostante il processo riparativo sia incompleto, la rimielinizzazione è una caratteristica costante nelle lesioni della SM, particolarmente durante le fasi infiammatorie iniziali della malattia. Studi recenti hanno fornito nuove evidenze sul ruolo dell'infiammazione nei processi di rimielinizzazione, suggerendo un effetto neuroprotettivo/riparativo delle risposte attivate dal recettore del TNF di tipo 2 (TNFR2). Il principale obiettivo di questo progetto è comprendere i meccanismi molecolari e cellulari che sono alla base dell'effetto rimielinizzante indotto dalla stimolazione del TNFR2, utilizzando nuovi strumenti, come anticorpi specifici per il TNFR2 con attività agonistica e la tecnica dei *gene microarrays*, per studiare la risposta al TNF della microglia, la popolazione del SNC che esprime i più alti livelli di questo recettore in condizioni infiammatorie. L'identificazione e la distinzione dei processi benefici mediati dal TNF rispetto a quelli dannosi è importante per disegnare terapie più efficaci per la cura delle malattie infiammatorie demielinizzanti del SNC.

### Obiettivi

Il sistema TNF/TNFR rappresenta un meccanismo strettamente controllato ed estremamente raffinato che può prendere parte a differenti fenomeni biologici in funzione dei *pathways* coinvolti.

Per poter chiarire in che modo il TNF, agendo attraverso l'attivazione specifica di TNFR2, possa partecipare a meccanismi anti-infiammatori e neuroprotettivi, in questo progetto ci siamo posti l'obiettivo di investigare il ruolo del sistema TNF/TNFR2 nella regolazione della risposta infiammatoria mediata dalla microglia.

In particolare ci siamo proposti di:

- a) studiare l'espressione e la funzionalità di TNFR1 e TNFR2 in colture primarie di microglia di topo;
- b) analizzare l'espressione e lo shedding di TNFR1 e TNFR2 in risposta a diversi stimoli infiammatori;
- c) identificare, attraverso uno studio di microarray, nuove molecole con attività anti-infiammatoria regolate dall'attivazione specifica del TNFR2.

## Risultati

In questo studio abbiamo dimostrato che la microglia di topo, in coltura, esprime elevati livelli di TNFR2 e rilascia TNFR2 in forma solubile in risposta a differenti stimoli infiammatori, che coinvolgono l'attivazione del TNFR2 stesso. Nel nostro sistema *in vitro*, il TNFR2 è l'unico recettore del TNF a essere espresso in maniera funzionale in condizioni basali. Trattando le cellule con LPS e CpG, si osserva una up-regolazione dell'mRNA del TNFR2 ed il rapido rilascio dello stesso TNFR2 in forma solubile, in accordo con studi precedenti condotti su monociti umani (Joyce and Steer, 1996; Dickensheets et al., 1997). Queste osservazioni suggeriscono che l'attivazione dei *Toll-like receptors* (TLR4 e TLR9 per LPS e CpG, rispettivamente) induce l'espressione del TNFR2 da parte della microglia. Inoltre abbiamo dimostrato che l'attivazione del TNFR2 con un anticorpo agonista, è in grado di stimolare l'espressione e il rilascio sia del TNF, che del TNFR2 stesso; questo sta a indicare che, nella microglia, esiste un *loop* autocrino in grado di sostenere la produzione di TNFR2 solubile. Quest'ultimo potrebbe rappresentare un meccanismo volto a controllare e limitare gli effetti pro-infiammatori, dannosi, del TNF. Infatti, la forma solubile del TNFR2, sequestrando il TNF in circolazione, limita la disponibilità di TNF che lega il TNFR1, noto per essere il recettore che media la classica attività pro-infiammatoria della citochina (Van Zee et al., 1992). L'ipotesi che possa stabilirsi un meccanismo di questo tipo, è supportata da uno studio recente nel quale è stato dimostrato che l'attività anti-infiammatoria delle cellule T regolatorie è mediata dal rilascio di TNFR2 solubile e dalla sua capacità di inibire l'attività del TNF (van Mierlo et al., 2007). Nel nostro sistema *in vitro*, il TNFR1 non viene regolato, né a livello dell'RNA messaggero, né della proteina in seguito a trattamento con LPS, CpG o dopo attivazione di entrambi i recettori del TNF con gli anticorpi agonisti. L'espressione e la funzionalità del TNFR1 sono invece indotte dall'IFN- $\gamma$ , che al contrario inibisce sia l'espressione dell'mRNA che il rilascio di TNFR2. Questi risultati sottolineano come citochine presenti nel microambiente circostante possano regolare l'espressione dei recettori del TNF nella microglia. Riassumendo quindi l'IFN- $\gamma$  ha un duplice effetto sulla microglia: da una parte inibisce i livelli di TNFR2 solubile, che rappresenta il maggior antagonista endogeno del TNF, e dall'altra sostiene la cascata infiammatoria mediata dal TNFR1.

Per determinare se nella microglia l'attivazione del *signalling* del TNFR2 possa mediare la produzione di altri fattori anti-infiammatori o neuroprotettivi noti, oltre al TNFR2 solubile stesso, abbiamo analizzato come l'attivazione selettiva di questo recettore nella microglia possa regolare l'espressione di 13.443 trascritti del genoma murino, mediante la tecnica del microarray. Da

questo studio è emerso che, nella microglia, l'attivazione del TNFR2 determina un'evidente modificazione del profilo di espressione dei geni coinvolti nella risposta immunitaria. Tra questi abbiamo identificato geni ben caratterizzati per le loro proprietà anti-infiammatorie e neuroprotettive, come il fattore di crescita G-CSF, il neuropeptide Adrenomedullina, la citochina IL-10 e il suo recettore IL-10r1, e il fattore di trascrizione TTP che lega e destabilizza l'mRNA del TNF regolandone l'attività biologica. Abbiamo inoltre dimostrato che l'IFN- $\gamma$  abolisce completamente l'espressione di IL-10, Adrenomedullina e G-CSF indotta dall'attivazione del TNFR2. Considerando che in presenza di IFN- $\gamma$  l'espressione di TNFR2 da parte della microglia viene completamente inibita, si può concludere che i *pathways* neuroprotettivi e anti-infiammatori descritti sono sotto il diretto controllo del TNFR2. Inoltre, il fatto che, in seguito alla stimolazione del TNFR2, le cellule microgliali producano un'elevata quantità di G-CSF solubile, ma non di IL-10 nei supernatanti analizzati, suggerisce che l'attivazione del TNFR2 non è uno stimolo sufficiente, per indurre la produzione di IL-10 da parte delle cellule microgliali.

Alla luce di questi risultati si può suggerire il seguente scenario per descrivere la capacità del TNFR2 di controllare la risposta delle cellule microgliali: la microglia partecipa alla risposta infiammatoria attraverso la produzione di TNF solubile, che agisce in maniera sinergica con l'IFN- $\gamma$  prodotto dalle cellule Natural Killer e T citotossiche. Tuttavia quando il patogeno viene eliminato e la risposta infiammatoria deve essere spenta, la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule del sistema immunitario viene ridotta, la microglia in queste condizioni esprime il TNFR2, e il TNF, principalmente nella sua forma di membrana, può attivare una risposta anti-infiammatoria e neuroprotettiva. Alterazioni di questo *loop* immunosoppressivo, che possono generarsi ad esempio in conseguenza all'esposizione prolungata a diversi tipi di insulto o a infiammazione cronica, possono portare a una progressione del danno cerebrale.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

II NeuroproMiSe general meeting. Bonn, 12-13 novembre 2007. Poster WP.V3.

III NeuroproMiSe general meeting. Tolosa, 3-5 novembre 2008. Poster WP.V3.

IV NeuroproMiSe general meeting. Atene, 9-10 novembre 2009. Poster WP.V3.

Veroni C, Gabriele L, Canini I, et al. Molecular mechanisms underlying the remyelinating effect of TNF: expression and functional activity of TNF receptor 2 in Microglia. IN: Viral triggers of autoimmunity: focus on Epstein-Barr virus and Multiple Sclerosis. Roma, 19-21 maggio 2008.

Veroni C, Gabriele L, Canini I, et al. Microglia involvement in the negative regulation of the inflammatory response via TNFR2 signalling. XVIII congresso AINI. Napoli, 8-11 ottobre 2008.

### **Presentati per la pubblicazione**

Veroni C, Gabriele L, Canini I, et al. Expression and immunomodulatory function of TNF receptor 2 in microglia.

**Progetto finanziato col bando 2005, per un periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 50.000 €. Studio iniziato nel 2006.**

## Nuovi attori nella genetica della sclerosi multipla: PRKCA e microRNA

### ► Rosanna Asselta

Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche,  
Università degli Studi di Milano

*Collaboratori:*

- ▷ Elvezia Maria Paraboschi
- ▷ Claudia Dall'Osso
- ▷ Giulia Soldà
- ▷ Stefano Duga

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Sandra D'Alfonso**, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara

### Premesse

Nonostante i numerosi studi condotti, gli eventi molecolari coinvolti nelle fasi iniziali e nella progressione della sclerosi multipla (SM) sono ancora poco noti. Tuttavia, studi su gemelli e adozioni indicano la presenza di una forte componente genetica, ed è quindi ipotizzabile che numerose varianti alleliche, identificabili solo mediante l'utilizzo di ampie casistiche di pazienti ben selezionati, possano predisporre alla SM.

In passato, studi di *linkage* hanno evidenziato molti *loci* di suscettibilità alla malattia, ma l'unico ripetutamente replicato è risultato quello corrispondente al complesso maggiore di istocompatibilità (in corrispondenza del cromosoma 6p21). Sono stati effettuati anche molti studi di associazione per valutare il ruolo di geni candidati, ma sempre con risultati contrastanti. Il gene per la Proteina Chinasi C alfa (PRKCA) è uno dei pochi descritti come associati con la SM in più di due popolazioni. PRKCA è un eccellente candidato per spiegare la predisposizione alla SM, in quanto la proteina chinasi C gioca un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale che controlla l'attivazione linfocitaria: in particolare, essa regola l'espressione del recettore dell'IL2, citochina in grado di indurre la progressione del ciclo cellulare durante l'attivazione delle cellule T.

Ad oggi, gli studi genetici sulla SM si sono incentrati quasi esclusivamente su geni candidati codificanti per proteine. Tuttavia, molteplici evidenze sperimentali sottolineano un ruolo fondamentale dei microRNA (miRNA) in molti processi biologici e quindi, potenzialmente, anche in processi patogenetici. I miRNA costituiscono una classe di piccoli (19-25 nucleotidi) RNA a sin-

golo filamento che agiscono come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica mediante repressione traduzionale o degradazione degli miRNA *target*. Polimorfismi di singolo nucleotide (SNP) localizzati in *loci* codificanti per miRNA, in siti di legame di miRNA, o a carico di geni codificanti per il macchinario di silenziamento mediato dai miRNA, sembrano contribuire significativamente alla suscettibilità a malattie genetiche complesse, quali cancro, sindrome di Tourette e ipertensione.

## Obiettivi

Lo scopo di questo progetto è stato quindi quello di identificare nuove varianti di predisposizione alla SM in un campione esteso di pazienti italiani, considerando non solo geni codificanti per proteine (i.e.: PRKCA), ma anche *loci* per RNA non codificanti (i.e.: miRNA).

In particolare, durante il corso di questo progetto, il nostro gruppo di ricerca si è occupato di:

- a) replicare lo studio di associazione tra la SM e il gene PRKCA, allo scopo di identificare l'allele/i associato/i con la SM nella popolazione italiana;
- b) verificare il coinvolgimento del miRNA hsa-mir-634, localizzato in PRKCA, nella patogenesi della SM;
- c) monitorare l'espressione differenziale di 22 miRNA candidati in cellule mononucleate di sangue periferico di pazienti SM e controlli mediante l'utilizzo di una tecnica quantitativa basata su ibridazione molecolare su microsfera.

## Risultati

- Lo studio di associazione tra la SM e il gene PRKCA è stato condotto su una coorte di 360 pazienti SM e 662 controlli di origine italiana, genotipizzando tre marcatori microsatellite e 27 SNP. Questa analisi ha evidenziato una associazione significativa con due marcatori microsatellite, mappanti rispettivamente nella regione del promotore ( $P=0.033$ ;  $OR=0.12$ , 95%  $CI=0.015-0.94$ ) e nell'introne 2 ( $P=0.013$ ;  $OR=0.63$ , 95%  $CI=0.40-0.98$ ) del gene. Oltre a questi due alleli "protettivi", è stato possibile identificare anche un aplotipo di rischio ( $P=0.00074$ ;  $OR=1.57$ , 95%  $CI=1.24-1.99$ ), costituito da sette SNP e corrispondente a una regione genomica di 43 kb dell'introne 3 del gene. Questo aplotipo, che si sovrappone parzialmente agli aplotipi di rischio identificati nelle popolazioni canadese e finlandese, mappa in corrispondenza di un esone addizionale (esone 3b) di un trascritto alternativo, finora non caratterizzato, di PRKCA. Questa isoforma alternativa presenta in realtà un codone di stop prematuro (PTC) che potrebbe rendere il trascritto suscettibile alla degradazione tramite il meccanismo del *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD).

I possibili meccanismi patogenetici alla base di questa associazione sono stati successivamente indagati utilizzando molteplici approcci.

In primo luogo, per verificare se la lunghezza variabile del microsatellite mappante nel promotore fosse in grado di modularne l'attività trascrizionale, sono stati clonati otto frammenti corrispondenti ad altrettante regioni del promotore di PRKCA, ciascuna caratterizzata da un numero diverso di ripetizioni del microsatellite. I frammenti sono stati clonati a monte del gene *reporter* luciferasi, e sono attualmente in corso esperimenti di trasfezione in cellule eucariotiche per valutare l'attività trascrizionale dei diversi promotori mediante saggi dell'attività luciferasica.

In parallelo, poiché è stato proposto che gli *splicing* alternativi che introducono PTC e causano quindi la degradazione dei trascritti tramite NMD siano un modo per regolare post-trascrizionalmente i livelli del corrispondente mRNA, l'espressione differenziale di entrambe le isoforme di PRKCA è stata valutata mediante qPCR utilizzando RNA totale estratto da cellule mononucleate di sangue periferico di pazienti SM e controlli sani. Una differenza significativa nei livelli di espressione tra pazienti e controlli è stata osservata per entrambi i trascritti, suggerendo che livelli alterati di PRKCA possano essere un meccanismo rilevante nella patogenesi della SM.

- Nell'introne 15 del gene PRKCA è predetta la presenza di un miRNA, hsa-mir-634, segnalato nella banca dati UCSC in posizione 62.213.652-62.213.748. Questo miRNA, essendo localizzato in un *locus* associato a SM, è esso stesso un possibile candidato. Si è quindi deciso di valutarne il potenziale coinvolgimento nella patogenesi della SM mediante il sequenziamento diretto, nell'intera casistica a nostra disposizione, di una regione genomica di 601 bp contenente il miRNA e le regioni ad esso adiacenti (che potrebbero essere implicate nella regolazione dell'espressione del miRNA). Il sequenziamento ha consentito di individuare solo una transizione C>T nella popolazione di controllo in prossimità del sito donatore di *splicing* dell'introne 15 (IVS15+29C>T), mentre nessuna variazione nucleotidica è stata rilevata nei pazienti SM.

Un dato estremamente interessante è invece emerso dal confronto dei profili di espressione di PRKCA e del miRNA hsa-mir-634 in un pannello di 20 tessuti umani: in alcuni tessuti il trascritto di PRKCA risultava, infatti, essere estremamente abbondante, mentre il miRNA mostrava livelli di espressione ridotti; in altri tessuti, viceversa, i livelli del miRNA risultavano essere elevati mentre si registravano livelli significativamente ridotti di PRKCA. Questi risultati suggerivano una possibile regolazione indipendente dell'espressione del miRNA hsa-mir-634 e del gene PRKCA (plausibilmente a opera di un promotore specifico per il miRNA), e/o un meccanismo di bilanciamento reciproco dei due trascritti. Il clonaggio del putativo promotore di hsa-mir-634 in un vettore *reporter*, e i successivi esperimenti di trasfezione in cellule eucariotiche, hanno dimostrato l'esistenza di un promotore indipendente che regola l'espressione del miRNA hsa-mir-634. Sarà interessante in futuro andare a caratterizzare questo promotore per meglio comprendere il meccanismo di regolazione dell'espressione del miRNA, nonché, alla luce della possibile esistenza di un bilanciamento reciproco dei due trascritti, esplorare la possibilità che PRKCA sia esso stesso *target* di hsa-mir-634. L'esistenza di un tale meccanismo di bilanciamento reciproco, associato alla *down*-regolazione del gene PRKCA osservata nei pazienti SM, dovrebbe infatti corrispondere a una *up*-regolazione del miRNA hsa-mir-634 nei pazienti stessi, e, di conseguenza, a un aumento dell'attività di repressione sui geni *target* (che rimangono da caratterizzare).

- È noto che alterazioni nell'espressione genica determinate dai miRNA nelle cellule ematopoietiche risultano critiche per avere una risposta immunitaria efficace. In quest'ambito, il nostro gruppo di ricerca si è occupato di esplorare il possibile coinvolgimento dei miRNA nella patogenesi della SM andando a monitorare l'espressione differenziale di 22 miRNA candidati (*i.e.* espressi a livello del sistema immunitario, o trascritti a partire da *loci* del genoma precedentemente associati alla malattia) in cellule mononucleate di sangue periferico di pazienti SM e controlli sani. Quattro miRNA sono risultati significativamente (>3 volte) *up*-regolati e uno solo *down*-regolato (<2 volte) nei pazienti SM rispetto ai controlli.

È interessante sottolineare che i livelli di espressione di due dei miRNA *up*-regolati (hsa-mir-155 e hsa-mir-146a) risultano essere alterati anche in pazienti con artrite reumatoide e da lupus eritematoso sistemico, suggerendo l'esistenza di meccanismi patogenetici comuni con la SM.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Asselta R, Paraboschi EM, Soldà G, et al. The Protein Kinase C Alpha (PRKCA) gene is associated with multiple sclerosis in the Italian population. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG). Honolulu, 20-24 October 2009. Abstract n. 948.

Soldà G, Paraboschi EM, Gemmati D, et al. Differential expression of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of Multiple Sclerosis patients. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG). Honolulu, 20-24 October 2009. Abstract n. 858.

Paraboschi EM, Soldà G, Gemmati D, et al. Differential expression of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of Multiple Sclerosis patients. XII Congresso della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU). Torino, 8-11 novembre 2009.

*Progetto finanziato col bando 2008, per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 40.000 €.  
Studio iniziato nel 2009.*

## Geni ACCN1 e Sclerosi Multipla: uno studio di associazione in due popolazioni diverse geneticamente - sarda (Nuoro) e britannica

### ▶ **Luisa Bernardinelli**

Dipartimento di Scienze Sanitarie Applicate e Psicocomportamentali, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Pavia

*Collaboratori:*

- ▷ **Carlo Berzuini**
- ▷ **Luisa Foco**
- ▷ **Roberta Pastorino**
- ▷ **Silvia Lombardi**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Salvatore Bruno Murgia, Anna Ticca, Maria Luisa Piras, Maria Valeria Saddi, Caterina Boe**, Divisione di Neurologia, Ospedale San Francesco, ASL3 Nuoro
- ▷ **Pierpaolo Bitti, Monserrata Barca, Giovanna Gazzaniga, Giovanna Cualbu**, Centro di Tipizzazione Tessutale, Ospedale San Francesco, ASL3 Nuoro
- ▷ **Stephen Sawcer, Maria Ban**, Department of Clinical Neurosciences, Addenbrooke's Hospital, Cambridge
- ▷ **Catherine Rice, Pelin Akan, Rhian Gwilliam**, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton (UK)
- ▷ **Tamas Dalmay, Francisco Nicolas Molina**, University of East Anglia, Norwich (UK)
- ▷ **Stijn van Dongen**, European Bioinformatics Institute, Hinxton (UK)

### Premesse

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente individuato un'associazione tra il polimorfismo di singolo nucleotide (SNP) rs28936 del gene *Amiloride Sensitive Cation Channel Neuronal 1* (ACCN1), nella regione 17q11.2, e la sclerosi multipla nella popolazione isolata della provincia di Nuoro, Sardegna. ACCN1 appartiene alla famiglia dei geni ASIC (*Acid Sensing Ion Channel*), canali ionici attivati da protoni e pertanto sensibili alla diminuzione del pH (acidificazione). Gli ASICs formano complessi di quattro-nove subunità, sono principalmente permeabili allo ione Na<sup>+</sup> e sono coinvolti in diversi processi fisiologici e patologici. L'infiammazione e la modulazione del dolore sono, tra questi ultimi, particolarmente rilevanti nell'ambito della patogenesi della SM. ACCN1 rappresenta pertanto un ottimo gene candidato di suscettibilità alla SM.

## Obiettivi

Obiettivi del progetto di ricerca sono stati:

- a) la replicazione dell'associazione osservata tra rs28936 e SM nella popolazione inglese;
- b) la realizzazione di esperimenti in vitro per chiarire la natura dell'eventuale ruolo biologico-funzionale di rs28936;
- c) l'approfondimento dello studio della regione genomica attorno a rs28936.

## Risultati

### 1. Replicazione dell'associazione di rs28936 nella popolazione inglese.

Le analisi di replicazione nella popolazione inglese sono state condotte su un gruppo di 1158 trio (gruppi costituiti da un paziente con SM e dai suoi genitori sani) e su un gruppo di 1076 casi e 2568 controlli non imparentati tra loro. L'analisi di associazione è stata realizzata mediante il pacchetto GADA, descritto in Bernardinelli et al. (PLoS ONE 2007; 2(5): e480) e applicando un modello di regressione logistica pesata. Nel gruppo dei 1158 trio inglesi esiste un'associazione significativa tra SM e rs28936, mentre nel gruppo di casi e controlli, sebbene l'effetto osservato sia nella stessa direzione del gruppo dei trio, l'associazione non è confermata. Questa differenza potrebbe essere dovuta a variabilità all'interno della popolazione inglese, a una diversa età all'esordio o a un diverso decorso della SM nei pazienti appartenenti al gruppo dei trio. Nello stesso gruppo di trio si osserva uno scostamento dal modello moltiplicativo dell'effetto ( $p=e^{-12}$ ) verso un modello recessivo di trasmissione dell'allele a rischio (A). Questo scostamento non è stato osservato nella popolazione nuorese probabilmente a causa della minore numerosità campionaria, anche se il modello recessivo è quello che meglio si adatta alla struttura dei dati subito dopo il modello moltiplicativo. In entrambe le popolazioni si osserva un effetto protettivo dell'allele G di rs28936; nella popolazione inglese l'*odds ratio* (OR) dell'omozigote GG è pari a 0.59, con un intervallo di confidenza al 95% (95% CI) di 0.49 - 0.72,  $p=2e^{-7}$ , assumendo un modello recessivo dell'effetto. Nella popolazione nuorese l'effetto protettivo stimato è più forte rispetto alla popolazione inglese, con un OR=0.23, 95% CI=0.10 - 0.52,  $p=0.0004$ , assumendo un modello moltiplicativo dell'effetto. Combinando gli effetti stimati (OR) e l'evidenza statistica, possiamo confermare che esiste un'associazione significativa tra rs28936 e SM. La combinazione dei *p-value* è stata effettuata usando il metodo di Fisher e il metodo di Fang; i *p-value* combinati sono rispettivamente pari a  $2.44e^{-8}$  e  $7.52e^{-5}$ . La combinazione sulla base dell'effetto (OR) ha dato un *p-value* di 0.0005 (metodo di Mantel Haenzel). L'aderenza dei dati a un modello recessivo nel gruppo inglese è stata studiata attraverso un metodo che non richiede l'assunzione di uno specifico modello genetico per l'analisi dei dati, ma che considera la correlazione tra la stima dell'OR dell'eterozigote ( $OR_{GA}$ ) e la stima dell'OR dell'omozigote GG ( $OR_{GG}$ ) (Minelli et al. Int J Epidemiol. 2005;34(6):1319-28).

Questo approccio utilizza  $OR_{GG}$ , cioè l'OR tra gli omozigoti dei genotipi AA e GG, per catturare la grandezza dell'effetto genetico, e  $\lambda$ , definito come il rapporto tra il logaritmo di  $OR_{GA}$  e il logaritmo di  $OR_{GG}$  ( $\lambda = \log OR_{GA} / \log OR_{GG}$ , da cui deriva  $OR_{GA} = [OR_{GG}]^\lambda$ ) per catturare il modello genetico dell'effetto. Questa analisi assume che lo stesso modello genetico sconosciuto  $\lambda$  sia valido per entrambe le popolazioni. Valori di  $\lambda$  pari a 0, 0.5 e 1 corrispondono rispettivamente al modello recessivo, codominante e dominante; il range dei valori di

$\lambda$  consentiti dal modello è compreso tra 0 e 1. È stato pertanto applicato ai dati un modello bayesiano gerarchico, utilizzando un approccio di Markov-Chain Monte Carlo (MCMC) per la computazione; il modello è stato implementato con il software WINBugs. La stima di  $\lambda$  ottenuta, pari a 0.047, con un intervallo di credibilità al 95% di  $5.611e^{-5} - 0.02434$ , indica con forte evidenza la presenza di un modello recessivo dell'effetto, in linea con i risultati ottenuti in precedenza. La stima dell' $OR_{GG}$  è pari a 0.58, con un intervallo di credibilità al 95% di 0.42 - 0.78. Questo intervallo è più ampio rispetto all'intervallo di confidenza ottenuto applicando il modello logistico, ma ciò è atteso poiché il modello bayesiano incorpora anche l'incertezza relativa alla determinazione del modello genetico sottostante.

## 2. Realizzazione di esperimenti in vitro.

Rs28936 è localizzato nella regione 3'UTR di ACCN1, pertanto abbiamo ipotizzato un suo possibile ruolo funzionale nell'ambito della regolazione dell'espressione genica. L'analisi bioinformatica della sequenza ha rivelato che il 3'UTR di ACCN1 è ricco di molti motivi conservati, che si sovrappongono spesso tra di loro: tra questi anche diversi siti di legame di microRNA. Questo primo approccio, che ha sfruttato strumenti disponibili in rete, è stato affiancato da un'indagine più mirata condotta allineando tutte le sequenze di microRNA finora note (tratte dalla banca [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) con una serie di sequenze del 3'UTR di ACCN1 di due gruppi di organismi (gorilla, scimpanzè, macaco, uomo e topo, ratto, uomo).

I risultati di questa indagine evidenziano che rs28936 ricade in sequenze consenso di sei o sette basi specifiche per il legame di alcuni microRNA, note come *seeds*, corroborando quindi l'ipotesi funzionale iniziale. Sono stati anche identificati tre microRNA leganti l'allele G di rs28936 a un microRNA legante l'allele A.

Per verificare sperimentalmente i risultati ottenuti con l'approccio *in silico*, sono stati progettati alcuni esperimenti aventi l'obiettivo di (a) verificare se rs28936 controlla l'espressione genica di ACCN1 (b) chiarire se l'effetto osservato è mediato o meno dall'azione dei microRNA (c) validare i risultati ottenuti *in silico* circa il legame dei microRNA, verificando se tale legame è influenzato da rs28936.

Come esperimento preliminare è stato messo a punto un saggio con il gene reporter della luciferasi. Un frammento di 206 paia di basi della regione 3'UTR di ACCN1, contenente rs28936 nelle varianti A o G, è stato amplificato, clonato nel vettore reporter pMIR-report e i costrutti sono stati trasfettati in cellule HeLa S3. Come controllo dell'efficienza di trasfezione è stato co-trasfettato il vettore pMIR-report beta galattosidasi. A 48 ore dalla trasfezione sono state determinate l'attività della luciferasi e della beta-galattosidasi, lisando le cellule e misurando la fluorescenza emessa con un luminometro. La dipendenza del rapporto attività luciferasi/attività beta-galattosidasi dal genotipo è stata analizzata attraverso un modello lineare generalizzato che include l'effetto piastra e il numero di cellule lisate come fattori. Il *p-value* dell'ipotesi nulla di non differenza di attività tra i due genotipi AA e GG è risultato pari a  $2.7e^{-6}$ , indicando che esiste una differenza significativa di espressione del gene reporter tra i due genotipi. In particolare, la differenza di espressione del gene reporter passando dal genotipo GG al genotipo AA è pari a -0.29, 95% CI (-0.4, -0.7): ciò indica che l'allele G di rs28936 induce una diminuzione dell'espressione della luciferasi. Possiamo pertanto ipotizzare che lo stesso allele controlli negativamente l'espressione genica di ACCN1. Gli esperimenti sono ancora in corso e al momento non è possibile fornire ulteriori dettagli.

### 3. *Approfondimento dello studio della regione genomica attorno a rs28936*

Le analisi statistiche dello studio originario di associazione sulla popolazione nuorese non hanno escluso che altre varianti genetiche, comprese nella zona tra i geni *Myosin 1D* (MYO1D) e ACCN1, siano associate alla SM. Abbiamo pertanto selezionato in questo intervallo 123 nuovi SNPs, dando la priorità a varianti comprese tra il microsatellite D17S798 e ACCN1, zona risultata maggiormente associata alla SM. Gli SNPs sono stati scelti in base alla loro localizzazione (all'interno di motivi funzionali, di esoni, in sequenze fiancheggiando gli esoni, nel promotore e nel 3'UTR di geni) e alla loro qualità (frequenza dell'allele minore). Attualmente è in corso il disegno del saggio Sequenom per la loro genotipizzazione.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Bernardinelli L. Hunting for multiple sclerosis (MS) susceptibility genes in the isolated population of Nuoro. V Congresso Nazionale SISMEC. Pavia, 16-19 settembre 2009.

Bernardinelli L, Foco L, Pastorino R, et al. Ion channel dysregulation: a possible mechanism of susceptibility to multiple sclerosis. In: The Genomics of Common Diseases. Hinxton-Cambridge, 23-26 September 2009.

Ticca A, Foco L, Pastorino R, et al. Association between ACCN1 gene and multiple sclerosis in Nuoro and British population. XL Congresso Società Italiana di Neurologia. Padova, 21-25 novembre 2009.

***Progetto finanziato col bando 2008, per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €. Studio iniziato nel 2009.***

# Ruolo dei Linfociti T regolatori CD39+ nella sclerosi multipla

<p>► <b>Giovanna Borsellino</b></p> <p><i>Collaboratori:</i></p> <p>▷ <b>Roberto Furlan</b></p> <p>▷ <b>Diego Centonze</b></p>	Unità di Neuroimmunologia, Fondazione Santa Lucia, Roma
--	---

## Premesse

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune del Sistema Nervoso Centrale (SNC) in cui linfociti specifici per antigeni della mielina sfuggono ai meccanismi di controllo normalmente deputati al contenimento e all'inibizione dell'espansione delle cellule autoreattive. I linfociti T regolatori (Treg) sono una componente fondamentale di tali meccanismi, e rappresentano una popolazione di cellule con funzione soppressoria che circoscrivono e "spengono" la risposta immunitaria minimizzando il danno non specifico ai tessuti. Benché negli ultimi anni sia stato dedicato uno sforzo enorme allo studio delle cellule regolatorie, i meccanismi attraverso i quali queste cellule esercitano la funzione soppressoria non sono stati chiariti.

Questo progetto è nato dall'osservazione che sia le cellule regolatorie umane che quelle murine esprimono selettivamente il CD39, il principale ectoenzima coinvolto nella regolazione della concentrazione extracellulare dell'ATP. Nel SNC è noto da tempo che l'ATP extracellulare è un importante neurotrasmettitore, mentre nel sistema immunitario funge da "adiuvante naturale" con spiccate proprietà proinfiammatorie: viene infatti rilasciato dalle cellule quale segnale di "pericolo" in seguito a trauma o morte cellulare, e la sua presenza è rilevata dai recettori purinergici, espressi da tutte le cellule dell'organismo. L'ATP rilasciato viene poi idrolizzato e trasformato in ADP e AMP dal CD39, che dunque arresta lo sprone proinfiammatorio. Il CD39 può agire di concerto con un altro ectoenzima espresso sulla superficie di alcuni linfociti, il CD73, che metabolizza l'AMP ad adenosina, i cui effetti inibitori e anti-proliferativi sui linfociti sono ben noti. In sostanza, il CD39 ha un duplice effetto immunosoppressivo, attraverso l'eliminazione dell'ATP e la contemporanea generazione di adenosina.

Un aspetto intrigante del CD39 è che le cellule regolatorie dei pazienti con la forma *relapsing/remitting* di SM esprimono sulla superficie livelli molto ridotti di questo ectoenzima, in confronto ai soggetti sani. Dunque il CD39 potrebbe rappresentare un nuovo marker delle cellule regolatorie coinvolte nel controllo di questa malattia autoimmune.

## Obiettivi

In questo progetto sono stati caratterizzati gli ectoenzimi e i recettori purinergici espressi dalle cellule del sangue periferico ottenute da pazienti SM e da donatori sani, e parallelamente sono state studiate queste stesse molecole nel modello sperimentale di EAE. Oltre allo studio prettamente immunologico, dato che è ormai chiaro che i processi degenerativi del compartimento neuronale del SNC rappresentano una componente fondamentale nella fisiopatologia della SM, e dato che le purine sono state originariamente descritte come neurotrasmettitori (e l'ATP è contenuto nelle vescicole sinaptiche insieme ai neurotrasmettitori classici), è stato studiato l'impatto dell'infiammazione sulle disfunzioni neuronali e sinaptiche osservate in corso di SM.

## Risultati

### *Espressione di ectoenzimi*

Abbiamo confermato che l'espressione dell'ectoenzima CD39 caratterizza le cellule con funzione regolatoria, sia nella SM che in altre patologie infiammatorie. L'espressione del CD39 è stata quindi validata come marker di attività di malattia nel sangue periferico dei pazienti con SM. Infatti, i pazienti in fase stabile della malattia presentano livelli di espressione del CD39 significativamente più bassi rispetto ai soggetti sani; durante le riacutizzazioni della SM, l'espressione del CD39 aumenta significativamente e correla con l'aumento delle popolazioni cellulari pro-infiammatorie (Th1 e Th17). Questi risultati, ottenuti mediante analisi fenotipica al citofluorimetro, sono stati confermati anche mediante real time-PCR.

### *Effetto delle purine sui linfociti*

L'ATP non ha effetti sulla proliferazione, sulla vitalità, e sulla produzione di citochine da parte dei linfociti umani. I nostri dati suggeriscono piuttosto che l'ATP agisca sulle cellule dendritiche e sui monociti. L'adenosina, al contrario, blocca completamente, anche a bassi dosaggi, le funzioni dei linfociti T. Questo effetto è misurabile sia nelle popolazioni cellulari isolate *ex vivo*, che nei cloni Th1, Th0, e Th17. L'effetto immunosoppressorio dell'adenosina sembra essere meno evidente sulle cellule Th17 isolate dai pazienti con SM, suggerendo una maggior resistenza alla immunomodulazione di tale sottopopolazione.

### *Espressione dei recettori purinergici*

L'espressione di recettori purinergici è stata misurata mediante PCR. I linfociti T esprimono i recettori A2A, A2B, e A3A. Gli effetti inibitori dell'adenosina (sulla proliferazione e sulla produzione di citochine proinfiammatorie) sono mediati dai recettori A2A; la caffeina, antagonista specifico di tali recettori, reverte completamente l'inibizione.

### *Plasticità sinaptica*

In corso di EAE i linfociti T alterano la trasmissione sinaptica mediante l'attivazione della microglia. In particolare, è stata studiata la trasmissione glutamatergica a livello del corpo striato nei topi immunizzati con MOG. La microglia attivata è responsabile dell'alterazione della trasmissione glutamatergica mediante il rilascio di TNF- $\alpha$ . Sono in corso esperimenti mirati a stabilire il ruolo dei linfociti T regolatori CD39 positivi nella regolazione della risposta microgliale/macrofagica in topi in cui è stata indotta l'EAE.

### *Effetto immunosoppressorio degli endocannabinoidi*

Nel corso del progetto, abbiamo individuato gli endocannabinoidi e in particolare l'anandamide come potenti immunosoppressori, con un'azione adenosino-simile. Questi effetti sono stati misurati sia *in vitro* sui linfociti T umani, che *in vivo* nel modello sperimentale dell'EAE. I risultati

preliminari suggeriscono che il rilascio di anandamide nel corso della risposta immunitaria è associato alla presenza di cellule regolatorie CD39+.

In conclusione, i linfociti T regolatori, il CD39, e l'adenosina generata dal catabolismo dell'ATP rappresentano un importante meccanismo di regolazione nella risposta autoimmune caratteristica della SM. Ulteriori studi saranno volti a spiegare se sia carente l'attività immunosoppressoria dei linfociti T regolatori o se, piuttosto, alcune popolazioni proinfiammatorie siano più resistenti ai meccanismi di controllo della risposta immunitaria.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Pluchino S, Gritti A, Blezer E, et al. Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann Neurol* 2009 Sept; 66(3):343-54.

Pluchino S, Zanotti L, Brambilla E, et al. Immune regulatory neural stem/precursor cells protect from central nervous system autoimmunity by restraining dendritic cell function. *PLoS One* 2009 Jun;4(6):e5959.

Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, et al. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 2009 Jan;113(4):827-36.

Centonze D, Muzio L, Rossi S, et al. The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cell Death Differ* 2009 Nov 20. (Epub ahead of print).

Centonze D, Muzio L, Rossi S, et al. Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2009 Mar;29(11):3442-52.

**Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 120.000 €.  
Studio iniziato nel 2008.**

## Sviluppo di vettori lentivirali non-integranti per la terapia genica contro il virus di Epstein-Barr e sue potenziali applicazioni nella terapia della sclerosi multipla

▶ **Andrea Cara**

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Collaboratori:*

▶ **Maria Blasi**

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

▶ **Pasqualina Leone**

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Collaborazioni con altri gruppi:*

▶ **Francesca Aloisi**, Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

▶ **Alberto Faggioni**, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Laboratorio di Oncologia Virale,  
Università di Roma "La Sapienza"

### Premesse

La sclerosi multipla (SM) è una patologia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), nella cui insorgenza sono coinvolti sia fattori ereditari che ambientali. Il virus Epstein-Barr (EBV), un herpesvirus a DNA B-linfotrofico, è l'agente ambientale che è stato maggiormente associato all'insorgenza di SM mediante studi epidemiologici, sierologici e immunologici. Studi recenti hanno rafforzato l'ipotesi del coinvolgimento di EBV in questa patologia, dimostrando che le cellule B e le plasmacellule infettate da EBV si accumulano preferenzialmente nelle lesioni caratteristiche della SM e nelle meningi dei pazienti, diventando bersaglio di risposte immuni citotossiche. Attualmente i farmaci anti-herpesvirus disponibili non sono specifici per EBV. La mancata efficacia di questo tipo di farmaci nel trattamento della SM, spinge a sviluppare nuove terapie in grado di contrastare l'EBV. In uno studio precedente abbiamo dimostrato che l'aggiunta di un'origine di replicazione del DNA all'interno di un vettore lentivirale integrasi difettivo (VL-ID), è in grado di stabilizzare le forme episomiali del DNA del vettore, permettendone una trascrizione stabile in presenza del corrispondente fattore *trans*-attivante. Lo scopo di questo progetto è quindi quello di inserire l'origine di replicazione latente *oriP* di EBV in vettori lentivirali integrasi difettivi (VL-ID) basati su HIV-1. L'inserimento della *oriP* di EBV all'interno di un VL-ID ha lo scopo di permettere la replicazione selettiva del DNA episomale esclusivamente in presenza del corrispondente fattore *trans*-attivante EBNA1 (una delle 9 proteine latenti di EBV). La successiva espressione di un

gene suicida, come la timidina chinasi (TK), risulterà nell'eliminazione selettiva delle cellule che esprimono EBNA1. Questo approccio fornirebbe una nuova e specifica strategia per eliminare le cellule infettate da EBV.

## Obiettivi

### 1. *Costruzione e produzione di vettori lentivirali episomali integrasi difettivi*

La costruzione dei VL-ID episomali è basata sul vettore lentivirale pTY2CMV-GFP. Questo vettore trasduce stabilmente le cellule bersaglio quando il plasmide di impacchettamento fornito in *trans* durante la preparazione del vettore contiene il gene dell'integrasi (IN) di HIV-1. L'eliminazione dell'IN produce un plasmide di impacchettamento incapace di mediare la trasduzione stabile e l'integrazione nelle cellule bersaglio. Il plasmide pTY2CMV-GFP verrà modificato introducendo al suo interno l'origine di replicazione *oriP* di EBV (un elemento agente in cis necessario per la replicazione episomale) a monte o a valle del promotore CMV, in modo da creare i vettori a potenziale replicazione episomale pTY2oriPCMV-GFP e pTY2CMV-GFPoriP.

### 2. *Valutazione del potenziale trascrizionale dei vettori lentivirali episomali IN-difettivi*

I VL-ID ricombinanti verranno valutati in termini di efficienza di trasduzione a lungo termine e di produzione di GFP sulla linea cellulare di controllo 293T mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) utilizzando metodologie standard.

### 3. *Valutazione della replicazione episomale dei vettori lentivirali IN-difettivi*

Per verificare se il DNA episomale derivato dai VL è in grado di persistere nel tempo e per comprendere le cinetiche di replicazione episomale del vettore nelle cellule trasdotte, la valutazione dello stato episomale dei VL verrà effettuata mediante PCR semiquantitativa.

### 4. *Costruzione e utilizzo di un vettore lentivirale episomale IN-difettivo per la terapia genica suicida*

Per costruire il VL-ID episomale esprime un gene suicida, il gene TK di *Herpes Simplex Virus* (HSV) e l'elemento IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) verranno clonati a valle del promotore CMV nel vettore pTY2oriPCMVGFP, in modo da produrre il vettore pTY2oriPCMV-TK-I2-GFP. Come controllo, la sequenza codificante la luciferasi verrà introdotta al posto del gene TK. I vettori verranno quindi testati per la sensibilità al Ganciclovir in cellule EBV-infette e in cellule parentali di controllo EBV-negative.

## Risultati

### 1. *Costruzione dei plasmidi dei vettori lentivirali di trasferimento contenenti l'oriP di EBV*

Il plasmide pTY2GFPI2Neo esprime il gene reporter GFP e il gene per la resistenza alla neomicina, necessari per la valutazione dell'espressione e per la selezione in seguito a trasfezione o trasduzione delle cellule bersaglio. Abbiamo quindi clonato la *oriP wild type* e una *oriP* mutata (rispettivamente *oriPwt* e *oriPmut*) a monte o a valle dell'unità trascrizionale (rispettivamente prima del promotore CMV o dopo il gene per la resistenza alla neomicina). Ciò è stato fatto in modo da poter valutare eventuali effetti di posizione che potrebbero influenzare la replicazione dei plasmidi. L'inserimento della *oriPwt* e della *oriPmut* è stato effettuato uti-

lizzando tecniche standard di biologia molecolare, come digestione con enzimi di restrizione, purificazione del DNA, ligazione, trasformazione batterica e amplificazione del DNA plasmidico. I plasmidi prodotti includono: (i) pTY2*ori*Pwt-GFP-I2Neo; (ii) pTY2*ori*Pmut-GFP-I2Neo; (iii) pTY2GFP-I2Neo-*ori*Pwt e (iv) pTY2GFP-I2Neo-*ori*Pmut. I profili ottenuti in seguito a digestione con enzimi di restrizione corrispondevano a quanto atteso, indicando che i plasmidi contenenti le *ori*P sono stati costruiti con successo.

2. *Costruzione del plasmide esprimente EBNA1 e il gene per la resistenza alla Puromicina*  
La proteina EBNA1 espressa da EBV è necessaria per la replicazione del genoma virale, agendo in *trans* su elementi di DNA contenenti la *ori*P. Abbiamo quindi generato linee cellulari in grado di esprimere EBNA1, sulle quali testare i nostri vettori. Il gene codificante EBNA1 è stato introdotto a monte della sequenza IRES nel plasmide pTY2-I2Puro, utilizzando i siti di restrizione appropriati, in modo da produrre il plasmide pTY2EBNA1-I2Puro. L'inserimento di EBNA1 nel plasmide è stato confermato mediante digestione enzimatica. Abbiamo scelto di clonare EBNA1 nel plasmide pTY2-I2Puro perché questo ci consente di selezionare le cellule trasdotte utilizzando la puromicina e perché il gene per la resistenza alla puromicina si trova a valle della sequenza IRES, facendo sì che tutte le cellule selezionate per la puromicina esprimano anche la proteina EBNA1.
3. *Produzione di linee cellulari esprimenti stabilmente la proteina EBNA1 di EBV*  
Le linee cellulari Hela e 293 sono state trasfettate con il plasmide pTY2EBNA1-I2Puro o con il plasmide di controllo pTY2-I2Puro. Le cellule sono state quindi selezionate con la puromicina e i cloni stabili sono stati cresciuti per un mese. L'espressione di EBNA1 è stata effettuata mediante western blot utilizzando un anticorpo anti-EBNA1 fornitoci dalla Dr.ssa Aloisi. L'analisi mediante western blot ha confermato l'espressione della proteina EBNA1 da parte delle cellule 293-EBNA1 e Hela-EBNA1, ma non nelle cellule trasfettate stabilmente con il vettore di controllo (cellule 293-Puro e Hela-Puro).
4. *Trasfezione delle cellule esprimenti EBNA1 con i plasmidi contenenti la *ori*Pwt e la *ori*Pmut ed esprimenti la GFP*  
Per valutare se l'espressione di EBNA1 da parte delle linee cellulari selezionate permette la ritenzione episomale dei plasmidi contenenti le *ori*P, le linee cellulari EBNA1-positive e EBNA1-negative sono state trasfettate con i plasmidi contenenti le *ori*P e con il plasmide di controllo pTY2GFP-I2Neo. Le cellule sono state quindi selezionate con la geneticina e cresciute per un mese. L'espressione della GFP nelle cellule selezionate con la geneticina è stata valutata per un periodo di 2 mesi. Gli esperimenti hanno dimostrato che tutti i plasmidi contenenti le *ori*P, ma non il plasmide di controllo senza *ori*P, sono stati in grado di mantenere l'espressione della GFP nel tempo nelle cellule EBNA1-positive ma non nelle cellule di controllo EBNA1-negative. Sono in corso ulteriori esperimenti per valutare se anche i vettori lentivirali integrasi difettivi contenenti le *ori*P *wild type* o mutata vengono mantenuti nel tempo in cellule EBNA1-positive.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Blasi M, Aloisi F, Cara A. Conditionally replicating lentiviral-hybrid episomal vectors in Epstein-Barr virus positive cells: potential for application in Multiple Sclerosis. Convegno Nazionale FISM. Roma, 26-27 maggio 2009.

Blasi M, Aloisi F, Cara A. Conditionally replicating lentiviral-hybrid episomal vectors in Epstein-Barr virus positive cells: potential for application in Multiple Sclerosis. XIX Congresso AINI. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

*Progetto finanziato col bando 2008, per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 25.000 €.  
Studio iniziato nel 2008.*

## Cellule dendritiche plasmacitoidi: ruolo nel controllo della risposta immunitaria in pazienti trattati con IFN- $\beta$

### ► **Eliana Marina Coccia**

Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Collaboratori:*

- ▷ **Elena Giacomini**
- ▷ **Valerie Gafa**
- ▷ **Maria Elena Remoli**
- ▷ **Fabiana Rizzo**
- ▷ **Martina Severa**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Marco Salvetti**, Dipartimento di Scienze Neurologiche Centro Neurologico e Terapie Sperimentali (CENTERS) Ospedale S. Andrea, Università “La Sapienza”, Roma
- ▷ **Luca Battistini**, Fondazione Santa Lucia, Roma

### Premesse

Il nostro progetto si basa su precedenti risultati che hanno evidenziato la presenza di cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC), una sotto-popolazione di DC implicate in diverse malattie autoimmuni, nel tessuto cerebrale di pazienti con sclerosi multipla. Abbiamo inoltre osservato che la maturazione delle pDC è influenzata dal trattamento con interferone (IFN)- $\beta$  sia *in vivo* che *in vitro*. In particolare, l'IFN- $\beta$  interferisce con la maturazione delle pDC, con la loro capacità di rilasciare gli IFN di tipo I e altre citochine proinfiammatorie, di stimolare le cellule T. Perciò si può immaginare che le pDC, dopo essere venute a contatto con IFN- $\beta$  nel sangue periferico, diventino “iporesponsive” verso gli stimoli maturativi che possono incontrare nel tessuto cerebrale infiammato. A sua volta l'induzione nelle pDC trattate con l'IFN- $\beta$  di uno stato di refrattarietà agli stimoli maturativi si concretizza in una ridotta capacità di presentazione dell'antigene e di attivazione dei linfociti T *helper*.

## Obiettivi

Basandoci su queste premesse, gli obiettivi principali del nostro progetto sono stati:

- a) *identificare i meccanismi mediante i quali l'IFN- $\beta$  agisce sulla capacità immunoregolatoria delle pDC;*
- b) *caratterizzare gli effetti indotti da queste pDC iporesponsive sulla risposta immunitaria.*

Il raggiungimento di questi obiettivi è strumentale per una migliore comprensione degli effetti indotti dall'IFN- $\beta$  nelle pDC e per individuare nuove prospettive di studio e applicazione per questo trattamento terapeutico.

## Risultati

Il primo obiettivo è stato affrontato attraverso lo studio del trascrittoma delle pDC indotto dal trattamento con IFN- $\beta$ . Dovendo identificare i geni inducibili dall'IFN- $\beta$  in una popolazione di pDC purificate, abbiamo dovuto isolare queste cellule dal sangue periferico di donatori di controllo sottoposti a leucoferesi in modo da ottenere un numero sufficiente di cellule per gli studi programmati.

Dopo aver identificato le condizioni ottimali per analizzare gli effetti indotti dall'IFN- $\beta$ , sono stati effettuati studi di espressione genica attraverso *microarrays*. Tra i geni stimolati dal trattamento con IFN- $\beta$  con funzione nota (antivirale, anti-proliferativa, immunomodulatrice, anti-tumorale), ci siamo concentrati sul recettore toll (TLR)7, un recettore espresso a livello degli endosomi, che riconosce molecole di RNA a singola catena caratteristiche degli intermedi replicativi di virus a RNA. Studi di *real time PCR* mirati a validare l'induzione di questo gene hanno consentito di confermare il risultato e di estendere l'analisi anche a RNA estratto da cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti con sclerosi multipla in cui è stata osservata l'induzione del trascritto per TLR7 successivamente alla terapia con IFN- $\beta$ . In attesa di poter validare questo risultato su pDC di pazienti con sclerosi multipla abbiamo iniziato ad analizzare un'altra popolazione leucocitaria che esprime questo TLR ovvero i linfociti B. Pertanto per definire se l'induzione del trascritto per il TLR7 correlasse con un'aumentata sensibilità alla stimolazione con agonisti specifici, abbiamo studiato la risposta dei linfociti B prima e dopo l'inizio della terapia con IFN- $\beta$ . Abbiamo osservato che la stimolazione *in vivo* con IFN- $\beta$  rende i linfociti B più sensibili alla stimolazione con agonisti del TLR7 evidenziata da una più spiccata attivazione e capacità di produrre immunoglobuline. Tale effetto è specifico in quanto il trattamento con IFN- $\beta$  non modifica la capacità di linfociti B di rispondere alla stimolazione con i ligandi del TLR9, altro recettore espresso in questa popolazione linfocitaria.

Il secondo obiettivo prevedeva la caratterizzazione delle modificazioni indotte dall'IFN- $\beta$  sul fenotipo e sulle capacità immunoregatorie delle pDC presenti nel sangue periferico di pazienti con sclerosi multipla. L'analisi *ex-vivo*, condotta fino ad oggi su un numero limitato di pazienti, suggerisce che l'espressione di alcune molecole, identificate per la loro capacità di regolare la risposta delle pDC agli agonisti dei TLR (ILT7, Fc $\gamma$ RIIa e Fc $\epsilon$ RI), non è modulata dalla terapia con IFN- $\beta$ . Analogamente l'analisi dell'espressione della molecola ICOS-L, che svolge un ruolo chiave nell'induzione dei linfociti T regolatori (T reg), ha confermato dati ottenuti precedentemente *in vitro* su pDC isolate da donatori di controllo, in quanto la sua espressione costitutiva rimane

inalterata dopo il trattamento *in vivo* con IFN- $\beta$ . Sono in corso studi mirati ad analizzare gli effetti dell'IFN- $\beta$  sull'espressione di queste molecole durante la maturazione indotta dalla stimolazione con gli agonisti dei TLR. Questi risultati sono importanti per comprendere meglio alcune osservazioni ottenute in collaborazione con Luca Battistini che indicano la capacità del trattamento con IFN- $\beta$  di ripristinare la percentuale di Treg, ovvero di cellule esprimenti i marcatori CD25 e CD39, ai valori osservati nei donatori di controllo. Sulla base di questi risultati è pertanto importante stabilire se questo fenomeno è mediato dall'induzione delle funzioni tollerogeniche nelle pDC.

I risultati conseguiti in questo periodo suggeriscono che il trattamento con IFN- $\beta$  può modulare la risposta alla stimolazione con TLR7 sia delle pDC che dei linfociti B. Questi risultati costituiscono una base importante per il proseguimento dei nostri studi che prevedono un'analisi più completa dell'impatto di questa terapia immunomodulatrice sulle funzioni di queste popolazioni leucocitarie di cui si va sempre più definendo il ruolo nella patogenesi della sclerosi multipla.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Giacomini E, Severa M, Rizzo F, et al. B cell response to IFN- $\beta$  therapy in MS patients: differential responsiveness to TLR and induction of an antiviral state. XIX Congresso AINI. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

*Progetto finanziato col bando 2008, per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 30.000 €.  
Studio iniziato nel 2009.*

# Screening del genoma mitocondriale nella sclerosi multipla primaria progressiva

## ► Eleonora Cocco

Dipartimento di scienze Cardiovascolari e Neurologiche,  
Università di Cagliari

*Collaboratori:*

- ▷ Maria Giovanna Marrosu
- ▷ Jessica Frau
- ▷ Lorena Lorefice
- ▷ Elisabetta Fadda
- ▷ Raffaele Murru
- ▷ Anna Mateddu
- ▷ Elisabetta Solla

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ Salvatore DiMauro, Jorida Kocku, Orhan Akman, Merritt Center of the Columbia University (NY)
- ▷ Claudia Sardu, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Cagliari

## Premesse

La sclerosi multipla (SM) è una malattia cronica del sistema nervoso centrale causa di importante disabilità nel giovane adulto. Negli ultimi anni è emerso il ruolo della perdita assonale e quindi del processo neurodegenerativo come determinante della progressiva disabilità permanente neuronale (Trapp BD et al 1998). Tale fenomeno può avvenire dopo una prima fase infiammatoria caratterizzata da ricadute e remissioni dalla durata variabile (decorso recidivante remittente/secondariamente progressivo) oppure sin dall'esordio configurando il decorso primariamente progressivo (PP) (Lublin 2006). Questa seconda forma è considerata puramente degenerativa.

Recenti lavori hanno ipotizzato un ruolo di disfunzione mitocondriale (mt) come causa della progressiva degenerazione assonale nella SM (Mahad D, et al 2008). Una riduzione dell'espressione di geni codificanti per i Complessi I e III della catena respiratoria mt è stata recentemente evidenziata negli assoni di neuroni motori provenienti da reperti autoptici di pazienti con SM (Dutta R et al 2006) e una riduzione dell'attività del complesso IV è stata recentemente documentata nel sistema nervoso di soggetti con SM (Mahad D 2009). Inoltre una riduzione dell'attività del Complesso I è stata osservata anche nel muscolo prelevato da pazienti con SM persiani (Kumleh HH et al 2006).

La malattia è considerata una malattia complessa determinata dall'interazione di fattori genetici e ambientali. I fattori genetici sono stati estesamente studiati in diverse popolazioni mediante varie metodologie. Diversi *screens* dell'intero genoma nucleare sono stati completati, una decina di *loci* sono stati identificati in associazione con la malattia ma ognuno di essi singolarmente svolge un ruolo limitato (Fugger et al 2009). Nonostante questi importanti passi in avanti numerosi sono i fattori genetici ancora sconosciuti. Alcune delle difficoltà che si incontrano nello studio della genetica della SM sono da ricondurre all'eterogeneità patogenetica e genetica della SM, oltre che al fatto che le popolazioni studiate sono etnicamente non omogenee (Sawcer et al 2008). Inoltre il genoma mt è stato escluso dagli *screen* genomici e il suo ruolo è stato solo parzialmente studiato in popolazioni non etnicamente e fenotipicamente omogenee.

## Obiettivi

Progetto pilota con l'obiettivo di saggiare il ruolo del genoma mt in un gruppo accuratamente selezionato (decorso primariamente progressivo) di pazienti con SM provenienti dalla Sardegna, isola del Mediterraneo caratterizzata da una prevalenza di SM molto elevata e da un background genetico omogeneo e diverso da quello delle popolazioni vicine e di ottenere i risultati preliminari per pianificare l'estensione dell'analisi di mt DNA ad un campione più ampio.

## Risultati

Il mtDNA è stato estratto da diversi tessuti (mucosa del cavo orale, urine, bulbo pilifero e sangue) da 5 controlli sani. Il mt DNA migliore, riguardo concentrazione e qualità, è stato ottenuto estraendo il DNA dal sangue e nessun vantaggio sul livello di eteroplasmia è emerso dall'utilizzo di altri tessuti.

Il mtDNA è stato quindi estratto dal sangue di 50 pazienti con SM (diagnosi in accordo a Criteri di McDonald et al 2001; rev2005), in forma PP e 50 controlli sani etnicamente e demograficamente sovrapponibili (C). Tutti i soggetti considerati erano sardi da almeno tre generazioni. Il mt DNA è stato inizialmente amplificato in tre ampliconi tramite long PCR e questo ha permesso di escludere la presenza di macrodelezioni, delezioni singole o multiple del mt DNA nei pazienti e nei C. Successivamente i prodotti della long PCR sono stati sequenziati con *GeneChip® Human Mitochondrial Resequencing Array 2.0* (MitoChip) e analizzati con l'*Affymetrix GeneChip DNA Analysis Software* (GDAS) version 3.0.1.3 beta.

Il *call rate* medio è stato di 96.4 (DS  $\pm$  0.7). Sono state riscontrate un totale di 1254 varianti nel genoma mt. Nessuna mutazione patogenetica nota è stata evidenziata in SM o in C.

Nessuna differenza significativa ( $p$  value= 0.4) nei livelli di eteroplasmia globale è stata riscontrata tra i due gruppi. Sebbene il carico mutazionale globale tra i due gruppi non fosse differente, l'analisi dei valori di segnale grezzo in due modelli differenti ha rilevato 247 cambi significativi tra gli SM e C ( $p < 0.05$ ). Il 30.2% delle variazioni era associata ai geni del Complesso I (NADH-CoQ Reductase), il 3.0% del Complesso III (CoQ-cytochrome c reductase), il 33.2% Complesso IV (cytochrome c), il 9.1% Complesso V (ATP Synthase) mentre il 10.6% si evidenziava nei geni per i tRNAs, e nel 14.0% rRNAs. Nonostante la significatività statistica, la natura dei cambiamenti osservati rende difficile determinare se rappresentino delle vere varianti funzionali coinvolte nella eziologia della SM o semplicemente differenze che si verificano in natura.

Partendo dalle sequenze è stato possibile costruire gli mt aplogruppi in pazienti e controlli. L'analisi ha permesso di assegnare 82 dei 100 soggetti in studio in uno (H, J, T, U) dei nove aplo-

gruppi più frequenti in Europa (H, I, J, K, T, U, V, W, X) sulla base della sequenza del mtDNA mentre i restanti soggetti non si sono potuti ascrivere a nessun aplogruppo. L'analisi di regressione degli aplotipi non ha permesso di evidenziare alcuna differenza statisticamente significativa nella distribuzione degli aplogruppi tra pazienti e controlli, ma un trend verso la maggior rappresentazione del super aplogruppo U è stato evidenziato nei pazienti ( $p=0.08$ ). È da notare che recentemente lo stesso aplogruppo è stato osservato in associazione con la SM in un ampio studio effettuato in UK (Ban M et al 2008).

In conclusione questo progetto dimostra il grande valore di mitochip nello studio del mtDNA e mostra come l'utilizzo di questo strumento permetta di evitare l'amplificazione erronea di pseudogeni nucleari e faciliti la stima quantitativa globale dell'eteroplasmia globale. I risultati ottenuti nello studio della SM PP, come atteso, sono assolutamente preliminari e aprono la strada per l'ampliamento della casistica e lo studio globale del ruolo del mtDNA nella SM.

*Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 1 anno (prorogato di 6 mesi) e l'ammontare di 39.000 €. Studio iniziato nel 2007.*

# Utilizzo terapeutico della pantetina nell'encefalomielite sperimentale autoimmune

► **Gabriela Constantin**

Dipartimento di Patologia, Università degli Studi di Verona

## Premesse

La pantetina è un tiolo a basso peso molecolare, caratterizzato da gruppi funzionali contenenti atomi di zolfo e di idrogeno. È composta da due molecole di acido pantotenico legate assieme dal disolfide cistamina; questa struttura rappresenta la forma stabile detta panteteina, il substrato metabolico che costituisce la parte attiva delle molecole del coenzima A e delle *acyl carrier proteins*.

È stato precedentemente dimostrato che la somministrazione di pantetina in pazienti con disturbi metabolici causa tipicamente una diminuzione progressiva di colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo con lipoproteine a bassa densità (LDL) e apolipoproteina B (Apo-B), e un aumento di lipoproteine ad alta densità (HDL) e apolipoproteina A (Apo-A) (Maggi et al., 1982; Gaddi et al., 1984; Murray et al., 1985; Bertolini et al., 1986; Binaghi et al., 1990). Da notare che il trattamento con pantetina è a basso costo, e nell'uomo non è stato precedentemente associato ad effetti collaterali nocivi.

Dati recenti mostrano che la somministrazione di pantetina in topi infettati con *Plasmodium Benghei* previene lo sviluppo della malaria cerebrale (Penet et al., 2008). Questa protezione è stata associata con la down-regolazione di risposte cellulari chiave per la sindrome infiammatoria cerebrale, come l'iper-adesione piastrinica, l'attivazione endoteliale e la distruzione della barriera ematoencefalica (BEE).

## Obiettivi

Il progetto ha perseguito i seguenti due obiettivi:

1. studio dell'effetto clinico e neuropatologico della pantetina in modelli sperimentali di EAE (Encefalomielite Sperimentale Autoimmune);
2. studio dei meccanismi immunomodulatori che controllano l'effetto della pantetina sull'EAE.

## Risultati

### 1. Studio dell'effetto clinico e neuropatologico della pantetina in modelli sperimentali di EAE

Topi femmine C57BL/6J e SJL di 8-10 settimane sono stati immunizzati con peptide MOG (myelin-oligodendrocyte glycoprotein)35-55 o con peptide PLP (proteolipid protein)139-151 rispettivamente, e lo score clinico di malattia è stato giornalmente valutato come descritto precedentemente (Constantin et al., J. Immunol., 1999). L'effetto della pantetina è stato valutato trattando gli animali con 30 e 15 mg/giorno di pantetina per un periodo minimo di 15 giorni in protocolli di terapia "preventivo" o "terapeutico" (dopo la stabilizzazione della malattia). Per entrambi i modelli di EAE (cronica e a ricadute e remissioni) il trattamento preventivo con pantetina ha causato un blocco significativo della severità della malattia. Inoltre, l'esordio di malattia è stato ritardato negli animali trattati e lo score medio di malattia, così come lo score cumulativo, è stato significativamente più basso negli animali trattati, rispetto agli animali di controllo. Inoltre, topi con EAE trattati con pantetina dopo la stabilizzazione della malattia (giorno 25 post-immunizzazione) hanno mostrato una riduzione dello score clinico medio giornaliero e una riduzione dello score clinico cumulativo. Questi risultati dimostrano che la pantetina ha effetti clinici sia di prevenzione dell'EAE che terapeutico in animali con malattia stabilizzata.

In accordo con i risultati ottenuti nel modello di EAE, gli studi neuro-patologici hanno mostrato che il trattamento con pantetina diminuisce gli infiltrati di cellule infiammatorie rispetto agli animali di controllo. Inoltre, mediante colorazione Spielmeyer, si è osservato che la demielinizzazione dei midolli spinali degli animali trattati è significativamente minore rispetto agli animali di controllo.

Successivamente è stato effettuato uno studio sull'effetto della pantetina sulla permeabilizzazione della BEE in topi con EAE. È stato precedentemente dimostrato che la pantetina protegge la BEE in un modello di malaria cerebrale (Penet et al., 2008). La permeabilizzazione della BEE è considerato un evento critico nei modelli sperimentali di EAE, così come nei pazienti con sclerosi multipla (Wuerfel et al., 2004; Schellenberg et al., 2007; Zlokovic 2008). Nel nostro modello, la permeabilizzazione della BEE è stata determinata nel protocollo preventivo di trattamento, e misurata nella fase pre-clinica di malattia (giorno 7 post-immunizzazione).

Le differenze di integrità della BBB sono state valutate con esperimenti di *optical imaging*, con il sistema IVIS 200 (Xenogen/Caliper Life Sciences, Seattle, Stati Uniti) utilizzando albumina marcata con un colorante fluorescente. I risultati ottenuti hanno mostrato una minore positività all'albumina dei cervelli e midolli spinali degli animali trattati con pantetina rispetto agli animali di controllo, suggerendo che la pantetina riduce il danno alla BEE nella fase pre-clinica di malattia.

### 2. Studio dei meccanismi immunomodulatori che controllano l'effetto della pantetina sull'EAE

Per questo obiettivo abbiamo inizialmente studiato l'effetto della pantetina sull'adesione e la migrazione di cellule T *in vitro* e *in vivo*. L'adesione spontanea *in vitro* di linee cellulari T encefalitogeniche su ligandi integrinici purificati (ICAM-1 e VCAM-1 murini) è stata significativamente ridotta dal pre-trattamento delle cellule con diverse concentrazioni di pantetina e con

tempi diversi di trattamento. Nessun effetto è stato osservato sull'espressione di molecole di adesione in saggi citofluorimetrici, indicando che la pantetina agisce inibendo le vie di trasduzione del segnale necessarie per l'attivazione integrinica e per un'efficiente adesione. L'attivazione integrinica è un pre-requisito fondamentale per l'adesione leucocitaria sotto flusso. Per valutare l'effetto della pantetina sull'adesione leucocitaria, abbiamo utilizzato il citofluorimetro ad imaging multispettrale *ImageStream* (Amnis Corp. Seattle, Stati Uniti). L'*ImageStream* è un sistema di imaging digitale *high throughput* che cattura immagini di microscopia confocale ad alta risoluzione, ma, come in un citofluorimetro, migliaia di cellule possono essere analizzate molto rapidamente, permettendo un'alta significatività statistica dei risultati ottenuti. Grazie a questo sistema di avanguardia, abbiamo caratterizzato l'effetto della pantetina sullo stato di attivazione dell'LFA-1 sulle cellule T encefalitogeniche. Nessuna differenza significativa nella distribuzione integrinica è stata evidenziata tra cellule trattate con pantetina e cellule di controllo, suggerendo che la pantetina potrebbe inibire selettivamente l'affinità integrinica, ma potrebbe non interferire con la regolazione della valenza dell'integrina.

Abbiamo successivamente studiato l'effetto della pantetina sulle interazioni tra cellule T encefalitogeniche e l'endotelio cerebrale in esperimenti di microscopia intravitale nel microcircolo cerebrale infiammato. I nostri dati hanno evidenziato una riduzione significativa delle interazioni tra endotelio cerebrale infiammato e cellule T encefalitogeniche pre-trattate con pantetina, in termini di arresto/adesione stabile sull'endotelio, rispetto alle cellule di controllo.

Per caratterizzare ulteriormente l'effetto della pantetina sulle risposte immunitarie cellulari, abbiamo analizzato l'effetto della pantetina sulla proliferazione cellulare. I nostri risultati hanno mostrato un'inibizione significativa della risposta proliferativa dei linfociti T *in vitro* dopo pre-trattamento con pantetina.

In esperimenti separati, abbiamo valutato se il trattamento *in vivo* con pantetina potesse avere un effetto sulla proliferazione delle cellule T encefalitogeniche. A questo proposito, abbiamo isolato i linfociti CD4 dai linfonodi drenanti degli animali immunizzati trattati o meno con pantetina. Anche in questi esperimenti abbiamo osservato che il trattamento con pantetina *in vivo* riduce la capacità proliferativa delle cellule T rispetto ai linfociti T isolati da animali non trattati.

Infine, abbiamo determinato l'effetto della pantetina sulla produzione di citochine *in vitro* e *in vivo*. I risultati hanno mostrato che cellule T encefalitogeniche trattate *in vitro* con pantetina prima del saggio di proliferazione producono una quantità minore di citochine pro-infiammatorie, come IL-17 e TNF- $\alpha$ . Inoltre, cellule T isolate da animali trattati con pantetina producono meno IL-2, IL-17 e IFN- $\gamma$ , confermando l'ipotesi che il trattamento *in vivo* con la pantetina interferisce con la capacità delle cellule T di rispondere agli stimoli antigenici.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che l'intervento metabolico con pantetina, un precursore del coenzima A, ha effetto immunomodulatorio nel modello animale della sclerosi multipla. Considerando che la pantetina ha bassi costi ed è stata somministrata nell'uomo con successo in contesti diversi con assenza di effetti collaterali, ulteriori studi sono necessari per ottenere indicazioni sul potenziale uso clinico della pantetina nei pazienti con sclerosi multipla.

## Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi

Bolomini-Vittori M, Montresor A, Giagulli C, et al. Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat Immunol* 2009;10(2):185-94.

Constantin G, Marconi S, Rossi B, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 2009;27(10):2624-35.

Bach SD, Angiari S, Martinello M, et al. Effect of low molecular weight thiols in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). XIX Congress AINI. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

Angiari S, Rossi B, Bach SD, et al. Role of T cell immunoglobulin - and mucin-domain-containing molecule (tim)-1 in leukocyte adhesion in inflamed brain venules. XIX Congress AINI. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

Rossi B, Angiari S, Piccio L, et al. Analysis of t cell dynamics in experimental autoimmune encephalomyelitis by two-photon microscopy. XIX Congress AINI. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

Constantin G. Blood brain barrier and leukocyte trafficking. XIX Congress AINI. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

## In corso di pubblicazione

Deban L, Castro Russo R, Sironi M, et al. Binding to P-selectin and regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3, a key component of humoral innate immunity. *Nat. Immunol.*

Constantin G, Laudanna C. A deadly migration. *Immunity.*

## Presentati per la pubblicazione

Lapilla M, Gallo B, Martinello M, et al. Histamine regulates myelin-activated T cell activation and adhesiveness in inflamed brain microcirculation.

## In corso di redazione

Angiari S, Bach SD, Rossi B, et al. Metabolic intervention with pantethine ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.

**Progetto finanziato col bando 2008, per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 50.000 €.  
Studio iniziato nel 2009.**

## Uso di piante medicinali e rimedi erboristici da parte di persone affette da sclerosi multipla

▶ **Marco Cosentino**

Dipartimento di Medicina Clinica,  
Sezione di Farmacologia Sperimentale e Clinica,  
Università degli Studi dell'Insubria, Varese

*Collaboratori:*

- ▷ **Mauro Zaffaroni**
- ▷ **Raffaella Bombelli**
- ▷ **Anna Loraschi**
- ▷ **Franca Marino**
- ▷ **Catherine Klersy**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Claudio Solaro**, Dipartimento Neurologia ASL3 Genovese, DH neurologia, Ospedale P.A. Micone, Genova
- ▷ **Maria Giovanna Marrosu**, Centro Sclerosi Multipla, Cagliari
- ▷ **Francesco Patti**, Centro Sclerosi Multipla, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico "G Rodolico", Catania
- ▷ **Franca Bortolon**, Ospedale "San Bortolo", Vicenza
- ▷ **Gianfranco Costantino**, Centro Sclerosi Multipla - Struttura complessa ospedaliera di Neurologia, Azienda mista Ospedale-Università, Foggia
- ▷ **Maria Rosa Rottoli**, USSD neuroimmunologia per la diagnosi e il trattamento della sclerosi multipla, USC Neurologia, Ospedali Riuniti di Bergamo
- ▷ **Ruggero Capra**, Centro Sclerosi Multipla Spedali Civili, Montichiari (Bs)
- ▷ **Alessandra Lugaresi**, Clinica Neurologica, Ospedale Clinicizzato "Colle dell'Ara", Chieti
- ▷ **Marco Salvetti**, Università La Sapienza, Dipartimento di Scienze Neurologiche Centro Neurologico e Terapie Sperimentali (CENTERS) di Roma Ospedale S. Andrea
- ▷ **Patrizia Sola**, Centro per le Malattie Demielinizzanti, Dipartimento di Neuroscienze, Clinica Neurologica, Nuovo Ospedale Civile S. Agostino Estense (NOCSAE), Modena
- ▷ **Paolo Bellantonio**, IRCCS NEUROMED, Pozzilli (Is)
- ▷ **Paola Cavalla**, Centro SM, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Torino, AOU S.Giovanni Battista
- ▷ **Vittorio Martinelli**, Centro Sclerosi Multipla, DIMER, Milano

## Premesse

Le terapie convenzionali per la Sclerosi Multipla (SM) riducono la frequenza delle esacerbazioni e il progredire della disabilità, tuttavia, il corteo sintomatologico che accompagna la malattia può spingere il paziente a ricorrere a rimedi erboristici e altre terapie complementari/alternative (TCA). Sebbene studi epidemiologici in Europa e USA indichino che l'utilizzo della fitoterapia è piuttosto diffuso tra le persone con SM, le modalità d'impiego sono scarsamente conosciute. Inoltre, i preparati fitoterapici possono avere conseguenze di rilievo sulle condizioni generali del paziente, con potenziali eventi avversi o interferendo talora in maniera imprevista con le terapie convenzionali.

## Obiettivi

Lo studio ha avuto come obiettivi la valutazione della prevalenza e delle caratteristiche clinico/epidemiologiche correlate all'utilizzo di rimedi erboristici in pazienti italiani con SM, indagando anche l'uso di altre TCA.

## Risultati

È stato condotto uno studio multicentrico osservazionale della durata di un anno (giugno '08-giugno '09) che ha coinvolto 14 centri neurologici italiani di riferimento per la SM. Ai pazienti ambulatoriali che accettavano di partecipare sono stati distribuiti dei questionari semistrutturati anonimi predisposti per la raccolta di informazioni socio demografiche, cliniche e sull'impiego e attitudini nei confronti di rimedi erboristici e altre TCA. Il questionario poteva anche essere compilato al domicilio e spedito al centro mediante una busta preaffrancata. I dati sono stati analizzati con un software commerciale (Stata10, Stata Corp, College Station, TX, USA).

Complessivamente sono stati raccolti 2419 questionari. L'età dei partecipanti era (media±deviazione standard) 40,6±10,8 anni, i soggetti di sesso femminile rappresentavano la maggior parte (69,5%). La malattia era esordita in media da 8,4±6,6 anni e il 58,7% dei soggetti presentava solo minimi sintomi correlati alla SM, ma senza limitazioni nel camminare o nelle attività quotidiane.

L'uso corrente/passato di cannabis veniva dichiarato nel 12,2%, quello di prodotti erboristici per la SM o altre patologie nel 15% e 48,2% dei casi. Tra i rimedi erboristici più comunemente impiegati vi erano: ginseng (30,5%), iberico (13,2%), liquirizia (12,2%), echinacea (11,3%), ginkgo biloba (9,2%), enotera (3,2%) e aloe vera (2,4%).

Il ricorso alla fitoterapia avveniva principalmente perché: ritenuta meno tossica delle terapie convenzionali (30,3%), consigliata da amici/conoscenti (17,9%), si desiderava seguire uno stile di vita 'salutare' (16%) o per curiosità (13,8%), mentre il fallimento delle terapie convenzionali rappresentava una causa minoritaria (4,3%).

I rimedi erboristici venivano acquistati soprattutto in erboristeria (49,5%) o in farmacia (39,3%), su consiglio dell'erborista (29%) o di conoscenti (23,4%), più che del medico di base (13,8%) o del neurologo curante (2,5%).

Il ricorso ad altre TCA, dichiarato dal 57,3% dei soggetti, era principalmente rappresentato da vitamine/minerali (35,1%), integratori alimentari (27,9%), omeopatia (11,2%), agopuntura (5,2%). Il medico era informato del ricorso a rimedi erboristici o ad altre TCA rispettivamente nel 52,1% e 51,7% dei casi.

L'analisi multivariata ha identificato che i seguenti fattori socio-demografici risultavano associati in maniera statisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con l'impiego di prodotti erboristici: sesso (maschi: OR: 0.59, 95% CI: 0.45-0.78), titolo di studio (scuola secondaria superiore: OR: 1.61, 95% CI: 1.21-2.14; laurea/master/dottorato: OR: 2.17, 95% CI: 1.54-3.06), macroarea di residenza (isole: OR: 0.67, 95% CI: 0.49-0.91; sud: OR: 0.56, 95% CI: 0.39-0.80), grado di soddisfazione per l'impiego di farmaci per effetti avversi correlati al trattamento della SM (nessuna: OR: 3.21, 95% CI: 1.0-10.31), uso di altre TCA (no: OR: 0.28, 95% CI: 0.21-0.37), percezione di un beneficio nell'impiego di altre TCA (parziale: OR: 0.61, 95% CI: 0.45-0.83; nessuno: OR: 0.16, 95% CI: 0.23-0.73). Viceversa, non risultavano correlati all'impiego di prodotti erboristici: età, stato civile, occupazione, durata e gravità della SM, grado di soddisfazione per la cura della SM con terapie convenzionali, grado di soddisfazione per il trattamento farmacologico di disturbi o eventi avversi non correlati alla SM o alla sua terapia. In sintesi, l'impiego di rimedi erboristici è più probabile in persone di sesso femminile, con titolo di studio di scuola superiore o universitario, residenti al centro-nord della penisola. L'insoddisfazione per l'efficacia dei farmaci convenzionali, la familiarità con le TCA (ma anche la mancanza di benefici da parte di TCA differenti dai rimedi erboristici) giocano un ruolo altrettanto significativo.

In conclusione, il ricorso a fitoterapia e altre TCA sembra essere diffuso nei pazienti con SM, nonostante siano scarse le evidenze scientifiche di efficacia. L'uso sembra essere influenzato più da fattori socioculturali che dal fallimento di terapie convenzionali. L'erborista, più che il medico, appare il principale punto di riferimento. Inoltre, molto spesso né medico di base né neurologo curante sono al corrente che i loro pazienti fanno uso di fitoterapia, una fonte di potenziali problematiche come l'interferenza con i farmaci o reazioni avverse.

Lo studio, coinvolgendo quasi 2500 pazienti con SM, più del 4% dei malati italiani, ha consentito di ottenere il primo database contenente informazioni dettagliate sull'uso di rimedi erboristici in pazienti italiani. Il database sarà disponibile a tutti i centri partecipanti per ulteriori analisi su specifici aspetti dell'impiego di rimedi erboristici in persone con SM.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Zaffaroni M, Loraschi A, Bombelli R, et al. Herbal remedies in multiple sclerosis patients: a nation-wide survey in Italy. XL Congresso Società Italiana di Neurologia. Padova, 21-25 novembre 2009.

Loraschi A, Bombelli R, Zaffaroni M, et al. Medicinal plants and herbal remedies in patients with multiple sclerosis: a nation-wide survey in Italy. 34° Congresso Nazionale Società Italiana di Farmacologia. Rimini, 14-17 ottobre 2009.

Zaffaroni M, Loraschi A, Bombelli R, et al. Herbal medicine among multiple sclerosis patients in Italy: a nation-wide survey. 25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Düsseldorf, 9-12 September 2009.

Loraschi A, Bombelli R, Zaffaroni M, et al. Use of herbal remedies among patients with multiple sclerosis: a nation-wide survey in Italy. 19th Meeting of the European Neurological Society. Milano, 20-24 giugno 2009.

Loraschi A, Bombelli R, Ghezzi A, et al. Uso di piante medicinali e rimedi erboristici da parte di persone affette da sclerosi multipla. Convegno Nazionale FISM. Roma, 17-18 maggio 2008.

***Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 50.000 €. Studio iniziato nel 2007.***

# Valutazione tramite Risonanza Magnetica del danno tissutale cerebrale nei pazienti con sclerosi multipla benigna

## ► **Nicola De Stefano**

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neurochirurgiche e del Comportamento, Università degli Studi di Siena

*Collaboratori:*

- ▷ **Alberto Balistreri**
- ▷ **Marco Battaglini**
- ▷ **Anita Blandino**
- ▷ **Giacomo Demurtas**
- ▷ **Antonio Federico**
- ▷ **Antonio Giorgio**
- ▷ **Francesca Rossi**
- ▷ **Maria Laura Stromillo**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Maria Pia Amato, Benedetta Goretti, Emilio Portaccio, Gianfranco Siracusa, Sandro Sorbi, Valentina Zipoli**, Dipartimento di Neurologia, Università di Firenze
- ▷ **Maria Letizia Bartolozzi, Leonello Guidi**, Unità di Neurologia, Ospedale di Empoli
- ▷ **Silvia Marino, Silvia Guerrera**, IRCCS Centro Neurolesi "Bonino-Pulejo", Messina

## Premesse

Vi è unanime consenso nel definire come affetti da sclerosi multipla benigna (SM-B) quei pazienti che sono "completamente funzionali" dopo almeno 15 anni dall'esordio clinico della malattia. La disponibilità di terapie immunomodulanti per la SM, che in genere non sarebbero necessarie per questi pazienti, ha sottolineato ancora di più la necessità di una distinzione precoce tra SM-B e altre forme di SM, giustificando il tentativo di identificare marcatori che possono essere indicatori di decorso benigno di malattia.

Negli ultimi anni, l'utilizzo di nuove metodologie di risonanza magnetica (RM) in studi clinici su pazienti con SM, ha contribuito in maniera significativa alla comprensione delle manifestazioni clinico-patologiche della malattia. In tal senso, queste misure di RM quantitativa potrebbero rivelarsi utili per identificare differenze nel danno tissutale cerebrale tra pazienti con decorso benigno (SM-B) e quelli con forme più severe di SM.

Pochi studi recenti di RM hanno cercato una comparazione tra il danno tissutale dei pazienti con

SM-B e quello dei pazienti con forme a ricadute o progressive di malattia. Questi studi, che erano in un certo senso limitati dal piccolo numero di soggetti studiati, hanno fornito risultati discrepanti.

## Obiettivi

Con il presente progetto di ricerca ci proponiamo di studiare un numero relativamente alto di pazienti con decorso clinico benigno di SM (definito da EDSS <3 e durata di malattia >15 anni dall'esordio clinico della malattia).

In questi pazienti e nei soggetti del gruppo/i di controllo (vedi sotto) ci proponiamo di eseguire esami di RM convenzionale e non convenzionale al fine di stimare differenti marcatori RM di: danno tissutale focale e diffuso (volume lesionale [VL] in T2 e T1; atrofia cerebrale); danno strutturale cerebrale focale e diffuso (rapporto del trasferimento di magnetizzazione [MTr] dentro e fuori le lesioni visibili alla RM); disfunzione e danno metabolico (N-AcetilAspartato/Creatina misurato tramite RM spettroscopica [RMs]) nelle lesioni demielinizzanti, nella sostanza bianca (SB) e sostanza grigia (SG) "apparentemente normale"; attivazione cerebrale e riorganizzazione tissutale (misurate tramite RM funzionale [RMf] dopo compito motorio).

## Risultati

Nel primo studio, pubblicato su Brain nel 2006, RM convenzionale ed Imaging del Trasferimento di Magnetizzazione (MTI) sono stati eseguiti in 50 pazienti con SM-B ed in 50 pazienti con SM RR "precoce" con disabilità simile (EDSS <3) e durata breve di malattia (<3 anni). È inoltre stato studiato un gruppo di 32 controlli normali (CN) appaiati per età e sesso. Abbiamo utilizzato una procedura completamente automatica per misurare l'MTr nelle lesioni, nell'area perilesionale, nella SB apparentemente normale (SBAN) e nella corteccia. Dopo aver corretto per età, abbiamo trovato che l'MTr lesionale e perilesionale dei pazienti con SM-B era minore ( $p < 0.0001$ ) rispetto alla SB dei CN, ma più alto ( $p < 0.0001$ ) dei valori corrispondenti dei pazienti RR. Nella SBAN e nella corteccia, i valori dei pazienti con SM-B erano simili a quelli dei CN e più alti di quelli dei pazienti RR ( $p < 0.0001$  e  $p < 0.01$ , rispettivamente). Differenze simili nei valori di MTr tra pazienti con SM-B ed RR sono stati trovati quando è stato selezionato un sottogruppo di pazienti senza disabilità (EDSS  $\leq 2$ ) e con durata di malattia molto lunga (>20 anni) o quando entrambi i gruppi sono stati appaiati per alto VL in T2 (>10cm<sup>3</sup>). Questi risultati dimostrano che i valori di MTr lesionale e non-lesionale possono essere significativamente meno pronunciati nei pazienti con SM-B che in quelli RR nelle fasi più precoci di malattia, suggerendo che il danno tissutale cerebrale sia più lieve nella SM-B che nella SM RR precoce. Questo può essere dovuto ad una migliore risposta alla demielinizzazione nei pazienti con SM-B e può rappresentare l'evidenza che la SM-B è un'entità clinica reale che può essere differenziata dalle altre forme di malattia. Nel secondo studio, pubblicato su Neurology nel 2008, lo scopo era quello di valutare le differenze nelle misure di RM in pazienti con SM-B differenziati in base alle loro capacità cognitive. Un gruppo di 47 pazienti con SM-B ha eseguito una valutazione neuropsicologica attraverso la Batteria Breve Ripetibile di Rao (BBRR) e lo Stroop Test (ST). Sono stati misurati il VL della SB, i volumi cerebrali globali e regionali, e l'MTr nelle lesioni e nel tessuto cerebrale "apparentemente normale" (TCAN). Le misure di RM quantitative sono state comparate in pazienti cognitivamente alterati (SM-CA) e cognitivamente preservati (SM-CP) e in 24 CN appaiati per età e sesso. Il punteggio dei test è stato correlato con le misure di RM in regioni corticali specifiche. Undici pazienti

sono stati classificati come SM-CA e 36 come SM-CP. Sia il VL in T2 che in T1 erano più alti ( $p=0.05$  e  $p=0.001$ ) nei pazienti con SM-CA che in quelli con SM-CP. Inoltre, i pazienti SM-CA erano caratterizzati da una diminuzione più marcata del volume neocorticale ( $p=0.005$ ) e dell'MTr corticale ( $p=0.02$ ) rispetto ai pazienti SM-CP. Infine, i punteggi dei test correlavano significativamente con le modifiche dell'MTr in specifiche regioni corticali. Questi risultati suggeriscono che la valutazione cognitiva e la RM quantitativa possono aiutare a identificare in maniera affidabile i pazienti con SM-B.

Nel terzo studio, pubblicato su *Neurology* nel 2009, lo scopo era quello di valutare se i test neuropsicologici e le misure di RM potevano essere usati per predire l'evoluzione a breve termine della SM-B. Un gruppo di 63 pazienti con SM-B è stato sottoposto a valutazione neuropsicologica tramite BBRR e ST. A quel tempo, sono stati eseguiti RM convenzionale ed MTI. Sono stati misurati VL della SB, volumi corticali regionali, ed MTr nelle lesioni e nel TCAN. Dopo un follow-up medio di cinque anni, i pazienti con un EDSS $\leq$ 3.5 sono stati classificati come "ancora benigni", mentre i pazienti che avevano sviluppato un decorso SP o che avevano un EDSS $\geq$ 4 sono stati definiti come "non più benigni" (NPB). Alla fine del follow-up, il 29% dei pazienti era classificato come NPB. Il sesso maschile (hazard ratio [HR]=2.9; intervallo di confidenza [IC] al 95%: 1.2-7.5;  $p=0.02$ ), il numero dei test neuropsicologici alterati (HR=1.4; CI al 95%=1.1-1.7;  $p=0.003$ ) e le lesioni in T1 (HR=1.3; CI al 95%=1.1-1.5;  $p=0.002$ ) risultavano correlati allo stato di NPB. In un modello che includeva tutte e tre le variabili, lo stato di NPB era predetto con un'accuratezza dell'82%. La conclusione è che la valutazione cognitiva e le misure di RM possono predire l'evoluzione della malattia a breve termine nella SM-B. Questa informazione può essere utile per identificare correttamente i pazienti con SM-B.

Nel quarto studio, che è stato sottoposto a *Multiple Sclerosis* nel 2010, 25 pazienti destrimani con SM-B hanno effettuato una RMf nel corso di un semplice compito motorio (flessione-estensione della mano destra) al fine di valutare l'attivazione cerebrale associata al movimento. Questa è stata comparata con quella di dieci pazienti con SM RR e dieci CN. I pazienti con SM-B hanno effettuato anche una RM convenzionale e una MTI, che è stata comparata con un identico esame ottenuto in media un anno prima. Le misure di RM strutturale quantitativa erano i valori al *baseline* e le modifiche nel tempo del VL in T2, MTr nelle lesioni in T2 e nel TCAN e il volume cerebrale totale. L'attivazione cerebrale associata al movimento era maggiore nei pazienti con SM-B che in quelli RR e nei CN, coinvolgendo in maniera estesa regioni bilaterali del *network* sensitivo-motorio così come i gangli della base, l'insula e il cervelletto. Nei pazienti con SM-B, la maggiore attivazione cerebrale era correlata con valori più bassi di MTr lesionale al *baseline*, e con la diminuzione del volume cerebrale globale e l'aumento del carico lesionale in T2. La conclusione è che nei pazienti con SM-B vengono reclutati, nel corso di un semplice movimento della mano, *network* cerebrali bilaterali, oltre a quelli che normalmente vengono attivati nel corso di compiti motori.

Infine, in un ulteriore studio, il cui articolo è in preparazione, abbiamo acquisito RM convenzionale e RMs del protone (1H-MRSI) in 143 soggetti: 43 con SM-B, 41 con SM RR precoce appaiati con SM-B per EDSS, 18 con SM secondaria progressiva (SP), appaiati con SM-B per durata di malattia, e 41 CN. I valori di NAA/Cr erano minori ( $p<0.0001$ ) in ciascun gruppo di pazienti rispetto ai CN ed erano anche minori ( $p<0.01$ ) nei pazienti SP rispetto a quelli RR precoci. I valori di NAA/Cr dei pazienti con SM-B non erano diversi ( $p>0.2$ ) rispetto a RR ed SP. Tuttavia, quando i pazienti con SM-B venivano raggruppati per alto ( $>10$  cm $^3$ ) o basso ( $<10$  cm $^3$ ) VL in T2, i pazienti con alto VL mostravano valori di NAA/Cr inferiori ( $p<0.0001$ ) rispetto a quelli con basso VL. Inoltre, nei pazienti con SM-B e alto VL in T2 i valori di NAA/Cr erano inferiori

( $p < 0.01$ ) rispetto a quelli degli RR e simili a quelli degli SP, mentre nei pazienti con SM-B e basso VL in T2 i valori di NAA/Cr erano simili a quelli degli RR e più alti ( $p < 0.01$ ) rispetto a quelli degli SP. Concludendo, si può dire che il danno assonale, misurato con la 1H-MRSI, è presente nei pazienti classicamente definiti come SM-B. Tuttavia, questo sembra essere variabile, essendo meno marcato nei pazienti con basso VL in T2 rispetto a quelli con alto VL in T2. Questo suggerisce che la popolazione dei pazienti con SM-B è eterogenea e potrebbe includere pazienti con un *pattern* di danno assonale/tissutale simile a quello dei pazienti sia nelle fasi precoci (RR precoci) che tardive (SP) di malattia. Questi dati suggeriscono che i pazienti con un decorso favorevole di malattia esistono realmente, ma sottolinea anche la necessità di una migliore definizione clinica della SM-B.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

De Stefano N, Battaglini M, Stromillo ML, et al. Brain damage as detected by magnetization transfer imaging is less pronounced in benign than in early relapsing multiple sclerosis. *Brain* 2006 Aug;129(8):2008-16.

De Stefano N, Filippi M. MR Spectroscopy in Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging* 2007 Apr;17 Suppl 1:31S-5S.

Amato MP, Portaccio E, Stromillo ML, et al. Cognitive assessment and quantitative magnetic resonance metrics can help to identify benign multiple sclerosis. *Neurology* 2008 Aug;71(9):632-8.

Battaglini M, Smith SM, Brogi S, De Stefano N. Enhanced brain extraction improves the accuracy of brain atrophy estimation. *Neuroimage* 2008 Apr;40(2):583-9.

Di Perri C, Battaglini M, Stromillo ML, et al. Voxel-based assessment of differences in damage and distribution of white matter lesions between PP and RR MS patients. *Arch Neurol* 2008;65(2):236-43.

Giorgio A, Battaglini M, Smith SM, De Stefano N. Brain atrophy assessment in multiple sclerosis: importance and limitations. *Neuroimaging Clin N Am* 2008;18(4):675-86.

Battaglini M, Giorgio A, Stromillo ML, et al. Voxel-wise assessment of progression of regional brain atrophy in relapsing remitting multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2009;282:55-60.

Portaccio E, Stromillo ML, Goretti B, et al. Neuropsychological and MRI measures predict short-term evolution in benign multiple sclerosis. *Neurology* 2009 Aug;73(7):498-503.

### **Presentati per la pubblicazione**

Giorgio A, Portaccio E, Stromillo ML, et al. Cortical functional reorganisation and its relationship with structural brain damage in patients with benign multiple sclerosis.

**Progetto finanziato col bando 2005, per un periodo di 2 anni (prorogato di 1 anno) e l'ammontare di 60.000 €. Studio iniziato nel 2006.**

## Immunoablazione con ciclofosfamide ad alto dosaggio e siero anti-linfocitario seguito da trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche in casi gravi di sclerosi multipla

### ▶ **Gianluigi Mancardi**

Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica,  
Università degli Studi e Azienda Ospedale - Università  
San Martino, Genova

*Collaboratori:*

- ▷ **Alessandro Leonardi**
- ▷ **Luca Roccatagliata**
- ▷ **Laura Bonzano**
- ▷ **Ivan Bonanni**
- ▷ **Matteo Pardini**
- ▷ **Antonio Uccelli**
- ▷ **Elisabetta Capello**
- ▷ **Luisa Vuolo**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Francesca Gualandi, Andrea Bacigalupo**, Divisione di Ematologia, Azienda Ospedale - Università San Martino, Genova
- ▷ **Paolo Muraro**, Department of Cellular and Molecular Neuroscience, Imperial College, London

### Premesse

Sebbene molti pazienti rispondano in maniera soddisfacente ai trattamenti approvati per la sclerosi multipla, alcuni tendono al contrario a peggiorare con accumulo di deterioramento fisico e cognitivo. Un trattamento efficace per gli stadi refrattari alle terapie proposte non è stato ancora validato. L'intensa immunosoppressione, seguita da trapianto di cellule staminali autologhe (AHSCT), è stata proposta come possibile strategia per il trattamento di gravi patologie autoimmuni.

I primi studi sull'utilizzo dell'AHSCT in pazienti con sclerosi multipla sono iniziati nel 1995 e da allora più di 400 pazienti in tutto il mondo sono stati trattati con questa terapia.

Il razionale di tale procedura risiede nell'eradicazione delle cellule auto-reattive tramite un'intensa immunosoppressione e una nuova ricostituzione del sistema immunitario grazie al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE). Inoltre, tale procedura è associata ad un profondo cambio qualitativo del sistema immunitario che sembra suggerire che, oltre al forte po-

tere immunosoppressivo, l'ASCHT potrebbe avere alcuni effetti benefici attraverso un *resetting* del sistema immunitario, che potrebbe diventare tollerante verso auto-antigeni.

Come regimi di condizionamento sono stati utilizzati vari protocolli. Il più comune è il BEAM (carmustina, etoposide, cytarabina e melphalan), caratterizzato da un'elevata mielosoppressione. Nelle valutazioni retrospettiche dell'"European Bone Marrow Transplantation" (EMBT) su 183 casi, nel periodo tra il 2000 e il dicembre del 2004, 53 erano stati trattati con BEAM seguito da ATG, con una stabilizzazione del quadro clinico nel 70 % dei casi, nessun decesso, e inoltre con una soppressione dell'attività infiammatoria evidenziata in risonanza magnetica (RM) per almeno 3 anni. Tuttavia, il trapianto autologo è comunque associato ad un'elevata mortalità (circa 2-3%), mentre la mortalità a breve termine correlata alla sclerosi multipla è piuttosto bassa, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia. Pertanto, è sembrato ragionevole cercare di identificare dei regimi di condizionamento differenti, dotati di migliore profilo di sicurezza a parità di efficacia. L'abolizione di regimi di condizionamento a elevata intensità e una migliore selezione dei pazienti hanno abbassato la mortalità legata alla terapia dal 7,3% del periodo 1995-2000 all'1.3% del periodo 2001-2007. Sono stati fatti diversi studi per validare un metodo di condizionamento non mieloablativo, ma linfoablativo, più adatto per una malattia a carattere autoimmune e con minori rischi legati al trattamento. È stato recentemente pubblicato uno studio condotto da Burt e collaboratori (Chigago) con una terapia non immunoablativa (ciclofosfamide seguito da alemtuzumab o ATG). In tale casistica di 21 pazienti trattati con ciclofosfamide (200 mg/Kg) e Alemtuzumab o ATG non si sono verificate morti correlate alla procedura trapiantologica. Il risultato è stato particolarmente interessante con il 100% di stabilizzazione o miglioramento della malattia anche se circa un quarto dei pazienti hanno presentato una ricaduta.

## Obiettivi

L'obiettivo di questo studio è la ricerca di un nuovo regime immunoablativo "light", nel tentativo di trovare una terapia con minori effetti collaterali e simile efficacia rispetto al regime di condizionamento a media intensità abitualmente utilizzato (BEAM), in una popolazione di pazienti con SM gravi non sensibili alle comuni terapie immunomodulanti e immunosoppressive.

L'*endpoint* primario è valutare la sicurezza, l'efficacia sulla progressione clinica e sull'attività dimostrabile in RM e l'effetto sulla ricostruzione del repertorio immune, di un nuovo regime di condizionamento, ciclofosfamide 120 mg/kg seguita da ATG 3.75 mg/kg/die per 2 giorni.

*Endpoints* secondari sono la valutazione del decorso clinico dopo il trapianto, la progressione in RM di parametri quali la comparsa di nuove aree T2 positive, il carico lesionale nelle sequenze T2 pesate e l'atrofia cerebrale, l'effetto del trattamento sulla fertilità e sulla qualità di vita.

Sono stati considerati eleggibili pazienti tra 18 e 50 anni, con sclerosi multipla RR, o RP, un EDSS tra 3 e 6,5, con una progressione di malattia documentata nell'ultimo anno o almeno tre ricadute nell'ultimo anno, senza progressione di malattia e con RM attiva.

Dal gennaio 2006 all'ottobre 2007, sono stati inclusi 7 pazienti (3 femmine e 4 maschi). L'età media e la durata di malattia erano 28 e 7 anni rispettivamente. L'EDSS medio un anno prima del trattamento era 5,5 (range 3-6,5) e l'EDSS medio al *baseline* era 6 (range 5-7). I pazienti avevano presentato nell'anno precedente in media 2,4 ricadute e una media di 11,6 lesioni Gd+/mese nell'esame precedente all'arruolamento.

Le cellule ematopoietiche (PBSC) sono state mobilizzate con CY 4gr/ m<sup>2</sup> e con G-CSF (filgrastim) 5mg/kg per via sottocutanea a cominciare dal giorno +2 fino alla raccolta. È stato, inoltre, somministrato prednisone (5 mg/kg) in modo da prevenire il rilascio di citochine durante la som-

ministrato di CY. Il numero target di cellule CD34+ da raccogliere è stato da  $3 \times 10^6$  kg a  $8 \times 10^6$  Kg. Il condizionamento è stato effettuato entro 30-40 giorni dalla mobilitazione: CY 120mg/Kg in due giorni (60mg/Kg al giorno -3 e 60mg/Kg al giorno -2). Al giorno 0, le cellule sono state scongelate e reinfuse. Al giorno +2 e +3, è stato somministrato ATG di coniglio (Genzyme, Cambridge, USA) 3.75 mg/kg/giorno.

I pazienti sono stati valutati con visite periodiche allo *screening*, al *baseline*, dopo la mobilitazione, e mensilmente per i primi sei mesi, e poi ogni 3 mesi per 24 mesi. L'MSFC è stato effettuato allo *screening* e dopo 6, 12 e 24 mesi; agli stessi *timepoint*, sono stati somministrati questionari della qualità di vita. Inoltre, tutti i pazienti sono stati sottoposti a RM con il medesimo protocollo di acquisizione. Lo studio prevedeva un esame nei due mesi prima del trattamento e poi mensilmente per i primi 6 mesi, quindi ogni 3 mesi, fino a 24 mesi di *follow up*. Per valutare l'efficacia è stata utilizzata una tripla dose di gadolinio, a eccezione di un paziente per cui è stata eseguita una violazione del protocollo, avendo effettuato una singola dose di mezzo di contrasto sia prima che dopo la terapia. Oltre alle lesioni attive, è stata valutata l'atrofia, le nuove lesioni in T2, le lesioni ipointense in T1.

Sono stati prelevati campioni per effettuare lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie al *baseline*, dopo 3, 6, 12 e 24 mesi. Tale studio è tuttora in corso. presso il laboratorio di Neuroimmunologia, del Dipartimento di Neuroscienze cellulare e molecolare, divisione di Neuroscienze, e salute mentale, Facoltà di Medicina, Imperial College, Londra.

## Risultati

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visita neurologica secondo protocollo. L'EDSS mediano dopo il trattamento, all'ultimo *follow up* (*follow up* medio 31,8 mesi) era di 6,5 (range 2,5-7). Cinque pazienti sono rimasti stabili, un caso è migliorato e un paziente è peggiorato di 0,5 punti all'EDSS rispetto al *baseline*. Una sola paziente ha presentato una ricaduta dopo il 6 mese di trattamento, caratterizzata da un peggioramento della paraparesi atassica. La paziente è stata trattata con bolo di metilpredisolone, poiché in questo caso la RM evidenziava una forte ripresa della attività infiammatoria (34 lesioni Gd +)

Gli eventi avversi sono stati tutti di lieve entità e si sono risolti senza complicanze. Non si sono presentati eventi avversi seri. In sei casi su sette si è osservata febbre durante la fase neurotrofica, risoltasi con le adeguate terapie. È stata, inoltre, osservata una riattivazione di herpes zoster.

Per quanto riguarda l'attività in RM, il numero medio di lesioni Gd + al mese si è ridotto a 0,9/mese (differenza significativa rispetto al periodo precedente il trapianto  $p=0.018$ ) ma una completa soppressione dell'attività con scomparsa delle lesioni captanti gadolinio non è stata osservata in nessun paziente.

Dopo il ventiquattresimo mese, sono stati eseguiti *follow up* con singola dose di gadolinio per evitare tossicità renale a lungo termine. L'attività si è mantenuta soppressa per cinque pazienti. Nonostante la bassa intensità di condizionamento, il regime utilizzato in questo studio sembra apportare una stabilizzazione del quadro clinico in quasi tutti i pazienti, anche se, rispetto ai regimi di condizionamento a media intensità (BEAM), non è stata osservata la stessa abolizione dell'attività infiammatoria alla RMN.

Il profilo di tollerabilità è molto buono con pochi effetti collaterali e per lo più di lieve entità.

L'aspetto del profilo immunologico, tuttora in corso, promette dati interessanti e non precedentemente indagati.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

I risultati di questo studio sono stati presentati al congresso dell'European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), a Düsseldorf, nel settembre 2009.

*Progetto finanziato col bando 2005 per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 85.000 €.  
Studio iniziato nel 2007.*

# Imaging funzionale nello studio della plasticità neuronale in un modello sperimentale di sclerosi multipla

► **Pasquina Marzola**

Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche,  
Sezione di Istologia e Anatomia, Università di Verona

*Collaboratori:*

- ▷ **Silvia Fiorini**
- ▷ **Stefano Tambalo**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Daniela Ungaro, Ubaldo Del Carro, Stefano Pluchino**, Ospedale San Raffaele, Milano

## Premesse

L'encefalomielite sperimentale autoimmune (EAS) rappresenta un robusto modello sperimentale per la forma cronica-progressiva della sclerosi multipla (SM) ed è stato ampiamente caratterizzato usando tecniche standard di risonanza magnetica nucleare (RMN). Tecniche più moderne come l'*imaging* funzionale di risonanza magnetica (fMRI) che permettono di monitorare, in modo non invasivo, le aree cerebrali attivate da uno specifico stimolo non sono ancora state usate nell'EAS nonostante sia stato dimostrato, in diversi studi clinici, che la fMRI può fornire importanti informazioni sulla entità di riorganizzazione corticale cerebrale spontanea oppure indotta da terapia. Tecniche di stimolazione elettrica transcranica (SET) per lo studio non-invasivo del coinvolgimento del sistema motorio sono ampiamente applicate nella pratica clinica e rappresentano un mezzo affidabile per monitorare la localizzazione e l'attività del danno e per prevedere l'evoluzione naturale della patologia nella SM. È stato dimostrato che lo stato funzionale del sistema motorio può essere studiato anche nei piccoli roditori attraverso lo studio dei potenziali motori evocati (PEMs) in seguito a stimolazione transcranica (elettrica o magnetica) o stimolazione spinale. Anche le tecniche di fMRI possono essere applicate sui piccoli roditori e l'attivazione neuronale può essere monitorata utilizzando sia sequenze di tipo BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) che sequenze basate sulla somministrazione per via sistemica di mezzi di contrasto che rendono le immagini MRI sensibili alla variazione di volume ematico cerebrale (CBV). Lo scopo fondamentale di questo progetto pilota sarà quello di ottimizzare protocolli di fMRI e SET per studiare la plasticità cerebrale in topi con EAS. Nei primi sei mesi di esperimenti cercheremo di ottimizzare i diversi protocolli di fMRI e SET su topi di controllo sani, mentre nei secondi 6 mesi di studio applicheremo a topi con EAS indotta con MOG35-55 un

paradigma che utilizza la combinazione di SET e fMRI dopo stimolazione somatosensoriale. Siamo fiduciosi che i risultati collezionati al termine di questi studi preliminari possano contribuire alla strutturazione di un sensibile protocollo sperimentale per lo studio della plasticità cerebrale in topi con SM sperimentale. Questo paradigma può inoltre rappresentare una piattaforma estremamente innovativa per la sperimentazione preclinica di nuovi approcci terapeutici alla SM.

## Obiettivi

Gli obiettivi del progetto possono essere riassunti come segue:

- a) *stabilire e ottimizzare protocolli di fMRI e SET (Stimolazione Elettrica Transcranica) per studiare la plasticità neuronale in animali con Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAS);*
- b) *applicare tali protocolli su un modello sperimentale di patologia neurodegenerativa quale la EAS.*

## Risultati

Un protocollo per l'acquisizione di dati SET è stato precedentemente ottimizzato nel topo sano. Le tecniche di fMRI con stimolazione somatosensoriale sono ben stabilite sul ratto e diversi protocolli sperimentali sono stati pubblicati in letteratura. Riportiamo brevemente il protocollo ottimizzato: il ratto viene anestetizzato con Domitor (0,05 mg/kg 1:20 s.c.) e posto su un lettino riscaldato dotato di barre ferma-orecchie e ferma-denti. La concentrazione di CO<sub>2</sub> nel sangue, indicatore di condizioni fisiologiche compatibili con la risposta funzionale, viene monitorata tramite un elettrodo transcutaneo (TCM, Radiometer Copenhagen). Una bobina superficiale a forma di elmetto, ottimizzata per il cervello del ratto, viene utilizzata per rilevare il segnale, mentre una bobina di volume di 7.2 cm i.d. viene utilizzata per trasmettere il segnale. Tutte le immagini sono acquisite utilizzando un sistema Bruker Biospec, operante a 4.7 T. Le immagini MRI sono acquisite con sequenze EPI per l'alta risoluzione temporale offerta da questo tipo di sequenza e per la sua alta sensibilità a effetti di suscettibilità magnetica, originati dal processo metabolico di risposta funzionale. Questi i parametri analizzati: Matrice=128x64, TR=2000ms, TE=5.4ms, risoluzione temporale= 2s. In ogni animale, dopo le necessarie scansioni morfologiche, vengono acquisite 4 *slices* trasversali da 2mm di spessore posizionate in maniera da coprire tutta la regione cerebrale preposta alla risposta somatosensoriale. Il TE è stato scelto nell'ordine di grandezza del T<sub>2</sub> del tessuto di interesse, per massimizzare la sensibilità della sequenza all'effetto cercato. La stimolazione somatosensoriale viene realizzata utilizzando impulsi elettrici generati da un elettrostimolatore (GRASS mod. S88) e applicati all'animale tramite elettrodi inseriti nella zampa anteriore destra. I parametri dello stimolo sono i seguenti: corrente 2mA, frequenza degli impulsi 3Hz, durata dell'impulso 0.5ms. Il singolo paradigma è costituito da 30 immagini acquisite in condizione di riposo e 10 immagini acquisite durante la stimolazione, per una durata totale di 80s. Ogni paradigma è stato riproposto per 8 volte (240 immagini totali) in 6 ripetizioni, con 15 minuti di pausa fra ogni ripetizione per evitare artefatti nella risposta dati da fenomeni di abitudine allo stimolo.

Le immagini vengono analizzate tramite il Tool FUN di Paravision 4.0 (Bruker) che effettua test di correlazione fra immagini acquisite in presenza e in assenza dello stimolo. Una ulteriore analisi viene effettuata tramite il tool FEAT del pacchetto FSL (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl>) sulla

base del GLM (*General Linear Model*) che correla paradigma di stimolazione ed evoluzione temporale dell'intensità di segnale. Questo protocollo si è rivelato estremamente riproducibile e robusto.

In mancanza di un modello di EAS sul ratto, abbiamo testato il protocollo precedentemente descritto su un modello sperimentale di invecchiamento. Sono stati valutati due gruppi di animali, un primo gruppo costituito da animali di 12 mesi, considerati adulti, e un secondo gruppo costituito da animali di 26 mesi considerati anziani. Sono state rilevate differenze sensibili nelle zone di risposta cerebrale al medesimo stimolo nei due gruppi.

La risposta alla stimolazione somatosensoriale nei ratti anziani differisce notevolmente da quella osservata nei soggetti adulti: le analisi riportano un incremento di circa il 40% nell'area di interesse nei soggetti anziani, con un evidente interessamento degli strati più superficiali della corteccia negli stessi soggetti. Questo dato sperimentale può essere interpretato in termini di riorganizzazione del tessuto cerebrale con parziale redistribuzione dei compiti funzionali in regioni adiacenti.

I risultati ottenuti in questo primo gruppo di studio aprono la strada a nuove applicazioni delle tecniche di *imaging* nello studio della plasticità neuronale. I dati acquisiti possono fornire informazioni di carattere morfologico, volumetrico e funzionale. È, infatti, possibile determinare quantitativamente l'estensione delle aree attive, la loro precisa localizzazione spaziale e l'intensità della risposta rilevata.

La riorganizzazione della corteccia somatosensoriale osservata nei soggetti anziani dimostra la sensibilità del protocollo sperimentale ottimizzato e fornisce un metodo di indagine affidabile per lo studio della plasticità neuronale.

Al presente il limite di questo protocollo sta nel fatto che si è dimostrato non adatto a lavorare sul topo e questo ha impedito per il momento l'applicazione al modello sperimentale di EAS. Sottolineiamo tuttavia l'importanza scientifica dei risultati ottenuti sui soggetti anziani, che aprono alla possibilità di applicare questa metodica allo studio dell'*aging* e alle possibili terapie contro l'invecchiamento cerebrale.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Del Carro U, Fiorini S, Marzola P, et al. Functional MRI to study brain plasticity in experimental MS. Convegno Nazionale FISM. Roma, 17-18 maggio 2008.

Tambalo S, Fiorini S, Del Carro U, et al. Functional MRI to study brain plasticity in experimental MS. Convegno Nazionale FISM. Roma, 26-27 maggio 2009.

Tambalo S, Fiorini S, Daducci A, et al. fMRI in aging: an experimental study in rats. ESMRMB Annual Meeting. Antalya 2009.

**Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 1 anno (prorogato di 4 mesi) e l'ammontare di 25.000 €. Studio iniziato nel 2007.**

## Analisi della differenziazione e della regolazione negativa di linfociti umani T helper (Th)17 nella sclerosi multipla

### ► **Francesco Novelli**

Centro Ricerche Medicina Sperimentale,  
Dipartimento Medicina e Oncologia Sperimentale,  
Università di Torino

*Collaboratori:*

- ▷ **Laura Conti**
- ▷ **Daniela Boselli**
- ▷ **Simona Rolla**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Luca Durelli**, Divisione Universitaria di Neurologia, Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano (Torino)

### Premesse

Dati ottenuti in modelli murini hanno indicato che una nuova popolazione di linfociti CD4 T helper (Th), capaci di produrre la citochina IL-17 e per questo definiti Th17, gioca un ruolo importante nel promuovere infiammazione nel sistema nervoso centrale (CNS) e provoca la encefalite allergica sperimentale, una patologia simile alla sclerosi multipla (SM) umana. Queste evidenze suggeriscono che sia verosimile che anche nel sistema umano i Th17 svolgano un ruolo chiave nella SM, e quindi rappresentino un importante bersaglio terapeutico. Nel nostro laboratorio, studiando i meccanismi del differenziamento di questa sottopopolazione, abbiamo osservato che i) essa può essere generata *in vitro* utilizzando la citochina IL-23 in presenza di anticorpi anti-IFN- $\gamma$  neutralizzanti; ii) la presenza di IL-23 fa aumentare la suscettibilità dei Th17 agli effetti inibitori degli interferoni (IFN); iii) nel sangue periferico dei pazienti con SM è possibile individuare un aumentato numero di linfociti Th17 rispetto ai donatori sani.

### Obiettivi

Lo scopo del presente progetto è stato quello di definire se nel sangue periferico dei pazienti con SM vi sia un'espansione di linfociti Th17 autoreattivi. Secondariamente abbiamo voluto valutare il ruolo dei segnali citochinici che regolano l'espansione e l'inibizione dei Th17. In particolare abbiamo voluto studiare se le citochine IL-23, IL-4 e gli IFN di tipo I e di tipo II sono in grado di influenzare la decisione di un linfocita T di diventare un linfocita Th17 o, al contrario,

differenziarsi in un altro tipo funzionale o andare incontro a morte apoptotica. Le informazioni ottenute in questo programma sono molto importanti per disegnare strategie terapeutiche che potrebbero essere, nel medio periodo, applicate alla SM.

## Risultati

I principali risultati raggiunti dalla nostra ricerca hanno messo in evidenza che:

- nel sangue periferico di pazienti con sclerosi multipla vi è un'espansione dei linfociti Th17 ma non dei linfociti Th1. I linfociti Th17 che si espandono presentano le caratteristiche dei linfociti "memoria", cioè esprimono la molecola CD45RO. L'espansione dei linfociti Th17 nei pazienti è caratteristica della fase attiva della malattia mentre nella fase inattiva la percentuale dei linfociti Th17 è simile a quella degli individui sani. L'indagine longitudinale effettuata sui linfociti di pazienti che passavano dalla fase inattiva alla fase attiva della SM o in pazienti che hanno avuto multiple ricorrenze di malattia ha chiaramente confermato che l'espansione del numero dei Th17 (circa sette volte) correlava sempre con la fase attiva mentre la loro diminuzione al livello dei donatori sani correlava sempre con le fasi inattive della SM. Questi dati quindi indicano una relazione diretta tra l'espansione dei linfociti Th17 e la fase attiva della sclerosi multipla;
- i linfociti Th17 che producono anche IL-22 aumentano nel corso delle fasi attive della SM ;
- la gran parte dei linfociti Th17 espansi nella SM sono specifici per la proteina basica della mielina, indicando che sono autoreattivi. Nel loro insieme questi dati rafforzano l'ipotesi che i linfociti Th17 ricoprono un ruolo diretto nella patogenesi della SM;
- l'IL-23 è un fattore molto importante per l'espansione dei linfociti Th17, in particolare quando l'IFN $\gamma$  e l'IL-4 sono neutralizzate;
- l'IFN- $\gamma$  è il fattore critico che sopprime la proliferazione dei linfociti Th17 umani. Questo effetto soppressorio, a causa della transitoria espressione del recettore funzionale dell'IFN- $\gamma$  sulla superficie dei linfociti Th17 esposti all'IL-23, è limitato alle prime fasi dell'espansione di questa sottopopolazione di linfociti T;
- la sensibilità all'effetto soppressorio dell'IFN- $\gamma$  è però ripristinato nei linfociti Th17 del sangue periferico di pazienti con SM attiva, indicando che i linfociti Th17 cronicamente stimolati dall'antigene possono ridiventare sensibili all'effetto antiproliferativo dell'IFN- $\gamma$ . I linfociti Th17 cronicamente attivati sono infatti in grado di riesprimere il recettore funzionale dell'IFN $\gamma$  sulla loro membrana;
- i linfociti Th17 sono molto più sensibili dei linfociti Th1 all'effetto apoptotico dell'IFN $\alpha/\beta$ . Questa differenza è dovuta a una maggiore espressione del recettore per l'IFN di tipo I (catena IFNAR1) sulla superficie dei linfociti Th17 rispetto ai Th1.

## Conclusioni

Questi risultati hanno messo in luce per la prima volta il possibile ruolo patogenetico dei linfociti Th17 nella SM (Mitsdoerffer M and Kuchroo V, 2009,65:487-8) indicano inoltre che è possibile utilizzare l'IFN $\gamma$  per inibire la loro espansione. Infine questi dati indicano che i linfociti Th17, ma non i linfociti Th1, sono sensibili all'effetto pro-apoptotico dell'IFN $\alpha/\beta$ . Questa osservazione è molto importante perchè ha chiarito per la prima volta uno dei meccanismi responsabili dell'effetto benefico dell'IFN $\beta$  nella sclerosi multipla, ovvero l'effetto antiproliferativo dell'IFN $\beta$ . Inoltre abbiamo dimostrato che i linfociti Th17 cronicamente stimolati dall'antigene, oltre all'IFN $\beta$ ,

sono sensibili anche all'effetto antiproliferativo dell'IFN $\gamma$ , a causa della riespressione del recettore funzionale dell'IFN $\gamma$  sulla membrana di queste cellule. Sia l'IFN $\beta$  che IFN $\gamma$  possono agire sui linfociti Th17 attraverso i loro recettori specifici espressi (IFNAR1 e IFN $\gamma$ R2), attivare il fattore trascrizionale STAT1, da cui dipende l'insuccesso del programma antiproliferativo/apoptotico. La somministrazione di IFN $\gamma$  in pazienti con SM, probabilmente a causa dell'espressione ubiquitaria del suo recettore, ha determinato pesanti effetti tossici nei pazienti MS. L'effetto pro-apoptotico dell'IFN $\gamma$  sui Th17 potrebbe essere però ottenuto attraverso la modulazione positiva del suo recettore funzionale, attraverso l'uso dei chelanti del ferro o degli antagonisti del segnale dell'IGF-1. Queste sostanze agiscono in maniera specifica sui linfociti T inducendo un accumulo della catena IFN $\gamma$ R2 sulla superficie dei linfociti T (G. Regis et al., 2007 *Trends in Immunology*). Queste sostanze potrebbero indurre l'accumulo della catena IFN $\gamma$ R2 sui linfociti Th17 e favorire la loro apoptosi da parte dell'IFN $\gamma$  prodotto dai linfociti Th1 in risposta all'autoantigene della mielina. Questo suggerisce che l'uso integrato di IFN $\beta$  e di modulatori dell'espressione del recettore dell'IFN $\gamma$  potrebbe essere una strategia interessante per l'eliminazione dei linfociti Th17 autoreattivi nella SM.

### Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi

Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T helper 17 cells expanded in multiple sclerosis and are inhibited by interferon  $\beta$ . *Annals of Neurology* 2009;65:499-509.

Novelli F, Conti L, Clerico M, et al. Type I IFN inhibits the expansion of Th17 lymphocytes from both healthy subjects and multiple sclerosis patients. *The FASEB Journal* 2008;22:1069.6.

Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 lymphocytes increase during multiple sclerosis relapses and are inhibited by interferon beta. *Journal of Neurology* 2008 June;255:suppl 2.

Durelli L, Clerico M, Conti L, et al. Ready for a new saga? Th17 and not Th1 are selectively increase in active multiple sclerosis and undergo apoptosis with interferon beta. *Multiple Sclerosis* 2008 Sept;14:suppl 1.

Durelli L, Rolla S, Clerico M, et al. MBP-Specific Th17 Lymphocytes selectively increase during MS relapses. A multicentre longitudinal study. *American Academy of Neurology*, 2009;72(11):suppl 3.

Durelli L, Rolla S, Clerico M, et al. T-helper 17 lymphocytes during MS relapses: antigen specificity and cytokine production. A multicentre longitudinal study. ECTRIMS. Düsseldorf, 9-12 September 2009.

Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. IL-17 and IL-22 producing increased in multiple sclerosis relapses are MBP-specific. A multicentre longitudinal study. *Journal of Neurology* 2009 June;256:suppl 2.

Durelli L, Rolla S, Clerico M, et al. T-helper 17 lymphocytes during MS relapses: antigen specificity and cytokine production. A multicentre longitudinal study. *Multiple Sclerosis* 2009 Sept;15:suppl 2.

Novelli F, Conti L, Boselli D, et al. Th17 lymphocytes are expanded in multiple sclerosis and are inhibited by interferons. *Cytokine* 48;1-2:79.

Novelli F, Conti L, Boselli D, et al. Th17 lymphocytes are expanded in multiple sclerosis and are inhibited by interferons. SLB, ICS, ISICR Tri-society Annual conference. Lisbon, October 2009.

Rolla S, Conti L, Clerico M, et al. Longitudinal analysis of IL-17 and/or IL-22 producing CD4+ T Lymphocytes in relapsing remitting multiple sclerosis. WIRM. Davos, 29 March - 1st April 2010.

## Presentati per la pubblicazione

Boselli D, Ragimbeau J, Orlando L, et al. Expression of IFN-gR2 mutated in a dileucine internalization motif reinstaes IFN $\gamma$ /STAT1 signal in human T lymphocytes.

Conti L, Rolla S, Clerico M, et al. IFN $\gamma$ /STAT1 signaling of human TH17 lymphocytes.

*Progetto finanziato col bando 2007 per un periodo di 1 anno (prorogato di 3 mesi) e l'ammontare di 50.000 €. Studio iniziato nel 2008.*

# Meccanismi molecolari del trasferimento delle informazioni ambientali alle cellule T nella patogenesi della EAE

## ► **Francesco Ria**

Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica di Roma

*Collaboratori:*

- ▷ **Chiara Nicolò**
- ▷ **Gabriele Di Sante**
- ▷ **Giovanni Pani**
- ▷ **Salvatore Fusco**
- ▷ **Emiliano Panieri**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Massimo Castagnola, Chiara Fanali**, Istituto di Biochimica, Università Cattolica di Roma
- ▷ **Giovanni De Logu, Michela Sali**, Istituto di Microbiologia, Università Cattolica di Roma

## Premesse

L'Encefalite Allergica Sperimentale (EAE), il modello murino della sclerosi multipla (SM), può essere indotta nei topi SJL, geneticamente predisposti a sviluppare la malattia, se immunizzati con peptidi derivati dalla polipoproteina (PLP) emulsionata in adiuvante di Freund completo (CFA). In questo modello sono due i fattori importanti che portano allo sviluppo della malattia: un fattore non-antigene specifico dato dall'adiuvante che crea quel microambiente composto da citochine e altri fattori che coadiuva il *priming* e la polarizzazione delle cellule T; e un fattore antigene-specifico costituito dal peptide. Lo sviluppo della EAE nei topi è strettamente legato alla quantità di Mycobacterium Tuberculosis (MT) presente nell'adiuvante che deve essere presente ad alte concentrazioni (4mg/ml). Topi immunizzati con l'adiuvante di Freund in assenza di MT non sviluppano la malattia. Studiando il modello della EAE, abbiamo osservato che la dose di MT è correlata più a una più precoce mobilizzazione delle cellule T CD4+ potenzialmente patogeniche piuttosto che alla promozione della polarizzazione Th1. Questo legame tra dose di MT e mobilizzazione delle cellule T è ceppo-dipendente, con una sensibilità che va C57>SJL>BALB/c. I prodotti del MT legano TLR2 e 4 sulle DC, inducendone la maturazione. Le DC attivate stimolano la differenziazione delle cellule T e producono citochine infiammatorie che promuovono la risposta Th1. Nel nostro laboratorio abbiamo osservato che anche proteine derivanti dal MT inducono segnali biochimici, paralleli alla mobilizzazione cellulare.

## Obiettivi

In questo progetto ci siamo proposti di studiare i meccanismi molecolari e biochimici coinvolti nella trasmissione dell'informazione dall'ambiente alle cellule DC e alle cellule T encefalitogeniche. Il nostro obiettivo è di individuare le molecole coinvolte nella variabilità ceppo-dipendente della risposta al MT, usando contemporaneamente un approccio dall'alto verso il basso e dal basso verso l'alto. Nel primo approccio, vogliamo stabilire se il TLR2 o 4 giocano un ruolo diretto nell'influenzare la mobilitazione delle cellule T, attraverso ceppi murini che mancano del TLR2 o 4. Nell'approccio dal basso verso l'alto ci proponiamo di individuare proteine la cui fosforilazione è regolata da PPD in maniera ceppo-specifica, per stabilire quale sia il segnale biochimico da cui dipendono e ancora più a monte quale sia il recettore coinvolto.

## Risultati

Per il nostro studio è stata utilizzata la tecnica dell'*Immunoscope*, una tecnica di biologia molecolare basata sull'utilizzo della PCR che permette di suddividere la popolazione T sulla base della lunghezza della regione CDR3 della catena beta del TCR. Questa tecnica permette di fare un quadro dettagliato della risposta immune T-dipendente.

Per valutare il ruolo del TLR2 sul movimento MT-dipendente delle cellule T, encefalitogeniche p139-specifiche BV10+, sono stati utilizzati topi C57 KO per il TLR2. Esperimenti preliminari fatti su topi SJL immunizzati con p139 emulsionata in CFA standard o concentrata, hanno evidenziato che l'analisi fatta 15 giorni dopo l'immunizzazione costituiva un punto critico per lo studio del movimento delle cellule BV10+ MT-dipendente. Successivamente è stata analizzata la presenza delle BV10+ in milze di topi F1, provenienti da SJL incrociati con C57-TLR2ko o con C57/B6 *wild type* (wt), immunizzati con p139 emulsionata in CFA standard a 15 giorni dalla immunizzazione. I risultati mostrano che il 100% delle milze di topi SJL immunizzati in CFA concentrata a 15 giorni, positivi nei linfonodi a BV10+, sono positive, mentre il gruppo di topi immunizzato con CFA standard mostra una frequenza del 33% di milze positive alle cellule BV10+. Nella progenie SJLxC57 immunizzata con p139 in CFA standard il 100% delle milze di topi con linfonodi BV10+ sono positive contro la totale assenza di cellule positive nei topi BV10+ progenie di SJLxC57-TLR2ko. Questi risultati fanno pensare che polimorfismi presenti nel recettore TLR2, ceppo-specifici, abbiano un ruolo importante nel movimento delle cellule T BV10+.

Per valutare se il TLR2 di SJL e di C57 avessero una differente forma ed efficacia abbiamo stimolato cellule aderenti di milza provenienti da topi SJL, C57wt e C57 TLR2ko con 0,01  $\mu\text{g/ml}$  di PPD per 30 minuti. Le cellule sono state lisate e sono state estratte le proteine, corse su gel ed evidenziate con anti-fosfotirosina. Due proteine in particolare, p70 Kd e p30 Kd, appaiono differenzialmente fosforilate in maniera TLR2-dipendente. Infatti, la proteina p30 è mantenuta defosforilata nelle cellule TLR2+, l'ingaggio del TLR2 induce una parziale fosforilazione nei topi SJL mentre si evidenzia una fosforilazione più forte nei C57. Dall'altro lato il PPD non induce la fosforilazione di p70 nei topi KO, mentre lo fa nei C57wt e anche in maniera più evidente negli SJL, dove la fosforilazione basale della p70 è anche più alta rispetto a quella dei C57. Al momento stiamo cercando di identificare queste due proteine attraverso il MALDI-TOF e l'ORBITRAP.

In seguito a questi risultati abbiamo voluto capire se questi differenti polimorfismi del TLR2 potessero avere un effetto sul decorso della EAE. È stata quindi indotta la malattia in topi F1 SJLxC57 e F1 SJLxC57TLR2KO, questo ci ha permesso di studiare l'effetto sulla malattia della presenza dei due tipi di alleli TLR2 (F1 SJLxC57) rispetto a quello della presenza del solo allele

SJL (F1 JlxC57TLR2KO). Due osservazioni importanti emergono dai dati di questo esperimento: la prima è che i topi che hanno solo l'allele SJL sviluppano la malattia più precocemente e, secondo, i due gruppi di topi mostrano un decorso di malattia differente, e cioè quelli con l'allele SJL hanno un decorso *relapsing remitting* mentre quelli che hanno entrambi gli alleli hanno un decorso cronico progressivo. Questi dati dimostrano che il TLR2 influenzano il decorso clinico della EAE nei topi e l'incidenza della malattia.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Nicolò C, Sali M, Di Sante G, et al. Mycobacterium smegmatis expressing a chimeric protein MPT64-PLP139-151 reorganizes the PLP-specific T cell repertoire favouring a CD8-mediated response and induces R-EAE. *J Immunol* 2009;184:222-235.

Nicolò C, Di Sante G, Fusco S, et al. Interaction of mycobacterium-derived motives with polymorphic traits (TLR2) of the host regulates trafficking of self-reactive T cells. EFIS. Berlin, 13-16 September 2009.

**Progetto finanziato col bando 2008 per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 25.000 €.  
Studio iniziato nel 2009.**

# Alimenti sani e funzionali per i pazienti con sclerosi multipla

## ► **Paolo Riccio**

Dipartimento di Biologia DBAF,  
Università della Basilicata, Potenza

*Collaboratori:*

- ▷ **Rocco Rossano**
- ▷ **Marilena Larocca**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Liuzzi GM, Fasano A, Latronico T**, Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare “Ernesto Quagliariello”, Università di Bari
- ▷ **Ettore M**, Centro di Nutrizione Applicata, Statte, Taranto
- ▷ **Coniglio G**, Clinica Neurologica, ASL Matera
- ▷ **Carratù MR**, Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università di Bari

## Premesse

La sclerosi multipla (SM) è una malattia complessa e multifattoriale con una particolare distribuzione geografica. A parità di predisposizione genetica, la SM è determinata da fattori ambientali di natura infettiva e/o nutrizionale. Studi recenti indicano che le diete occidentali, ipercaloriche, ricche di grassi animali e di carboidrati possono essere una concausa della SM e spiegare l'influenza della migrazione sul decorso della malattia.

## Obiettivi

Per prendere in considerazione un intervento nutrizionale da associare alla terapia della SM occorre identificare le molecole della dieta, i loro bersagli e i meccanismi d'azione coinvolti nel controllo dei processi neuro-infiammatori e auto-immuni della malattia.

## Risultati

1. *Valutazione delle basi molecolari per un intervento nutrizionale nella sclerosi multipla*  
I componenti e le abitudini alimentari da evitare sono quelli che attivano le vie biosintetiche (ad es. lipogenesi), quindi le diete ipercaloriche ricche di carboidrati e soprattutto di grassi animali.

I grassi saturi di origine animale formano grossi aggregati che possono ostruire i piccoli capillari e portano alla formazione di TNF- $\alpha$ . Inoltre, un'alimentazione ipercalorica e ricca in grassi animali modifica la composizione della microflora batterica selezionando le specie microbiche che hanno una maggiore capacità di estrarre energia dagli alimenti e di aumentare i depositi di grassi. Tale variazione della microflora batterica è però collegata con l'attivazione delle cellule Th17, la produzione di LPS e a una moderata infiammazione.

Altri componenti alimentari da evitare sono alcune proteine minori del latte bovino (le proteine MFGM) che sono associate alla membrana dei globuli di grasso del latte intero. Le proteine MFGM, e in particolare la butirfilina (BTN), possono avere un ruolo nei processi autoimmuni: la BTN è molto simile alla MOG, la glicoproteina della mielina dell'oligodendrocita, uno degli autoantigeni nella SM.

I componenti alimentari da preferire sono i polifenoli e i carotenoidi, presenti nella frutta, nelle verdure, e negli ortaggi, e gli acidi grassi poliinsaturi omega-3 (n-3 PUFA), presenti nei pesci e in particolare nell'olio di pesce. Fra i più importanti polifenoli si possono citare: le catechine (tè verde), l'idrossitirosolo e il tirosolo (olio di oliva), la quercetina (mele, cipolle), il resveratrolo (vino rosso), il licopene (pomodoro), e la curcumina (curry). I polifenoli, generalmente conosciuti come antiossidanti, e gli n-3 PUFA, hanno in realtà un'azione molteplice e agiscono su bersagli molecolari diversi, sia direttamente che indirettamente, favorendo il catabolismo delle sostanze nutrienti e contrastando l'infiammazione, lo stress ossidativo, e l'angiogenesi. Inoltre, gli n-3 PUFA inibiscono gli enzimi che portano alla formazione di acido arachidonico (AA) e di molecole proinfiammatorie come le prostaglandine, i leucotrieni e i trombossani.

I più importanti target molecolari dei polifenoli e degli n-3 PUFA sono le proteine chinasi attivate dall'AMP (AMPK), le sirtuine e i fattori di trascrizione che appartengono alla famiglia dei recettori nucleari, soprattutto i PPAR, cioè i recettori attivati per la proliferazione dei perossisomi. I PPAR sono coinvolti nel controllo del metabolismo energetico e nel controllo dei processi infiammatori. I polifenoli e gli n-3 PUFA che si legano ai PPAR attivano il catabolismo degli acidi grassi e inibiscono la lipogenesi e i fattori di trascrizione coinvolti nei processi infiammatori come l'AP-1 e l'NF- $\kappa$ B. Questi sono attivati nella SM, e producono citochine proinfiammatorie, radicali liberi come i ROS (le specie reattive dell'ossigeno), molecole di adesione, ed enzimi come le metalloproteinasi di matrice (MMP) - in particolare la MMP-9. Una dieta a basso contenuto calorico, o il digiuno intermittente, l'attività fisica, e vitamine come la vitamina D e la niacina, fanno diminuire i livelli del danno ossidativo, stimolano i processi catabolici e rallentano la progressione della malattia allo stesso modo dei polifenoli e degli n-3 PUFA.

## 2. *Determinazione dell'attività anti-infiammatoria dei polifenoli e dosaggio dell'inibizione dell'attività gelatinolitica*

L'attività anti-infiammatoria dei polifenoli è stata studiata su colture primarie di astrociti e di cellule microgliali di ratto, misurando l'espressione di metalloproteinasi (MMP) in presenza e in assenza di LPS.

Risultati: Nelle cellule trattate con LPS si è osservato un incremento dei livelli di MMP-2 e l'induzione della MMP-9. I polifenoli resveratrolo, quercetina, idrossitirosolo e l'N-acetilcisteina (NAC, un donatore di gruppi SH come l'acido lipoico) inibiscono le attività di MMP-9 e MMP-2 indotte da LPS. Alcuni polifenoli (catechine, licopene) sono in grado di stimolare le cellule in assenza di LPS. Il trattamento delle cellule non attivate con LPS con estratto da tè verde

e licopene induceva i livelli della MMP-9, ma non aveva nessun effetto sulla MMP-2. Tali studi hanno permesso di determinare le concentrazioni dei polifenoli alle quali si ha inibizione delle MMP senza avere citotossicità. Questi dati sono importanti perchè non sono ancora note le quantità raccomandate di assunzione giornaliera dei composti suddetti. L'inibizione diretta delle MMP su zimografie mono- e bidimensionali delle stesse si può avere con la quercetina ma non con il resveratrolo.

### 3. *Dosaggio del potere antiossidante dei polifenoli*

Risultati: Sono stati determinati i rapporti ottimali per l'utilizzo di miscele di polifenoli, a basse concentrazioni ma ad alta attività sinergica.

### 4. *Formulazione di uno yogurt commerciale modificato con l'aggiunta di integratori*

Studi precedenti avevano portato alla formulazione ed alla preparazione nei nostri laboratori di uno yogurt ipoallergenico contenente un cocktail di antiossidanti e fibre. Studi successivi hanno permesso di stabilire che è più conveniente e più pratico scegliere yogurt, senza grassi e senza le proteine MFGM, già disponibili in commercio ed aggiungere una miscela di fibre e di integratori ad alto valore sinergico come indicato dai risultati ottenuti al punto 3.

### 5. *Studio in vivo dell'influenza della somministrazione di olio di pesce in ratti in gravidanza e appena nati*

Risultati: le performances motorie aumentano in modo significativo. Conclusioni: l'olio di pesce può essere utile nella sindrome da fatica cronica nella SM.

### 6. *Formulazione di una dieta di 1700 kcal.*

In conclusione, si può affermare che esistono ormai le basi molecolari per un intervento nutrizionale nella SM da associare alla terapia.

Sulla base dei risultati ottenuti, è stata formulata una dieta di 1700 kcal basata sull'assunzione di verdure, pesci, e frutta da associare alla terapia farmacologica.

La dieta del paziente con SM dovrà essere a basso contenuto calorico, ricca di fibre, distribuita in piccoli e frequenti pasti giornalieri, basata sull'assunzione multivariata di vegetali, legumi, cereali integrali, frutta fresca e secca, pesce, latte scremato, acqua e caffè o tè, dovrà essere integrata con prebiotici e probiotici. Dalla dieta dovranno essere escluse le carni rosse, i grassi animali e i grassi vegetali idrogenati, le bevande zuccherate e le frittate.

### 7. *Intervento nutrizionale in pazienti con SM non in terapia*

In collaborazione con la Dott.ssa Coniglio della Clinica Neurologica di Matera, 30 pazienti con SM RR non in terapia sono stati coinvolti in uno studio basato sulla dieta riportata al punto 5 e sull'assunzione di integratori contenenti antiossidanti e olio di pesce. Nel siero dei pazienti verrà misurato il livello degli antiossidanti, degli omega-3 da olio di pesce e delle MMP.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Riccio P, Rossano R, Liuzzi GM. L'alimentazione nella sclerosi multipla. In: M. T. Montagna (a cura di). Alimentazione tra generazioni, Cacucci, Bari, 2008, pp. 205-220.

Riccio P, Haas H, Liuzzi GM, Rossano R. New diagnostic and therapeutic options for the treatment of multiple sclerosis. In:

Clinical Applications for Immunomics, Andras Falus ed. (Springer Science + Business Media LLC) New York, 2008, pp. 205-226.

Coluccia A, Borracci P, Renna G, et al. Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats. *Int J Dev Neurosci* 2009;27:599-605.

New diagnostic and therapeutic options for treatment of multiple sclerosis. 1st Immunomics Summer School Catania, 31 agosto 2007.

New diagnostic and therapeutic options for treatment of multiple sclerosis. Institute for Neuroimmunology and Clinical Multiple Sclerosis Research (INiMS) Center for Molecular Neurobiology Hamburg (ZMNH), 11 October 2007.

Novel biotechnological approaches for the study and treatment of multiple sclerosis. Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano Bicocca, 25 giugno 2008.

Complementary therapy of MS. XIX Congresso AINI. Porto Cervo, 4 ottobre 2009.

SM ed alimentazione. Corso di Aggiornamento Nazionale delle Scienze Neurologiche Ospedaliere. Multiple Sclerosis and Epilepsy Update. Maratea, 6 novembre 2009.

The molecular basis for complementary nutritional intervention in multiple sclerosis and in other chronic inflammatory diseases: is there a need to develop dietary-related drugs for their treatment? Convegno sulle malattie degenerative: dalla biologia alla clinica. Consorzio Interuniversitario Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), CNR. Roma, 11 novembre 2009.

SM e Alimentazione - sclerosi multipla – prospettive diagnostico-terapeutiche. Bari, 20 febbraio 2010.

***Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 50.000 €. Studio iniziato nel 2008.***

# Ruolo del corpo calloso nella coordinazione motoria bimanuale in pazienti affetti da sclerosi multipla

## ► **Luca Roccatagliata**

Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica,  
Università di Genova

*Collaboratori:*

- ▷ **Laura Bonzano**
- ▷ **Marco Bove**
- ▷ **Andrea Tacchino**

## Premesse

La perdita di integrità del corpo calloso (CC) altera le interazioni inter-emisferiche che giocano un importante ruolo nella coordinazione bimanuale, come è stato dimostrato in studi sulla callosotomia. Diversi studi descrivono la presenza di alterazioni dell'integrità del CC in pazienti con sclerosi multipla (SM) e associano tali alterazioni a una ridotta performance in compiti che richiedano il trasferimento di informazioni sensitive tra i due emisferi cerebrali, nell'esecuzione di movimenti rapidi e coordinati delle dita (*finger tapping*) e un'alterazione dell'integrazione inter-emisferica dell'informazione motoria.

Abbiamo studiato il ruolo del CC nella coordinazione bimanuale in pazienti con SM combinando dati comportamentali motori con dati derivati dall'analisi quantitativa di immagini di risonanza magnetica (RM) ottenuta con tensore di diffusione (DTI). Il DTI permette di studiare la diffusione delle molecole d'acqua lungo i fasci di sostanza bianca e di ottenere parametri che indicano l'integrità delle fibre.

## Obiettivi

Il nostro scopo era di studiare la performance motoria di un gruppo di pazienti con SM nell'esecuzione di movimenti bimanuali di opposizione delle dita e di comprendere se un eventuale deficit nella coordinazione fosse associato a un danno strutturale del CC e in particolare delle sue sottoregioni, correlando i dati motori con le misure derivate dal DTI.

## Risultati

14 pazienti con SM (età media  $37.4 \pm 5.8$  anni) e 10 volontari che servivano come gruppo di controllo (età  $33.4 \pm 6.0$  anni) hanno partecipato allo studio.

### *Dati comportamentali*

Ai soggetti che hanno partecipato allo studio è stato chiesto di eseguire movimenti ripetitivi di opposizione delle dita (pollice con indice, medio, anulare e mignolo) con le due mani simultaneamente e con gli occhi chiusi, sincronizzando i movimenti con un metronomo impostato a tre differenti frequenze (1, 1.5 and 2Hz). I dati sono stati acquisiti utilizzando un guanto dotato di sensori (patent: TO2005A00368). Le sessioni sperimentali comprendevano prove di 45 secondi (1 per frequenza). Per studiare la coordinazione bimanuale è stato calcolato l'intervallo tra le due mani - *Inter Hand Interval* (IHI) come la differenza di tempo assoluta tra l'inizio del contatto tra le dita corrispondenti delle due mani. Quindi, maggiore è l'IHI maggiore è la compromissione della coordinazione bimanuale.

La coordinazione bimanuale è risultata alterata nei pazienti con SM come mostrato da valori di IHI significativamente maggiori rispetto ai controlli. Tale differenza era significativa a tutte le frequenze del metronomo (1 Hz:  $44.7 \pm 8.1$  ms vs.  $24 \pm 4.5$  ms ( $p < 0.05$ ); 1.5 Hz:  $39.1 \pm 7.5$  ms vs.  $21.8 \pm 2.5$  ms ( $p < 0.05$ ); 2 Hz:  $35.5 \pm 6.1$  ms vs.  $18.5 \pm 2.3$  ms ( $p < 0.05$ ).

### *Dati di risonanza*

Il DTI è stato acquisito con una RM operante a 1.5Tesla con gradienti di diffusione in 15 direzioni ( $b=1000$  sec/mm<sup>2</sup>). I dati di DTI sono poi stati analizzati per ottenere mappe parametriche di anisotropia frazionale (FA). Le mappe di FA permettono di quantificare il danno del CC in quanto alti valori di FA sono presenti nel CC integro, data l'elevata organizzazione e mielinizzazione delle fibre che lo compongono.

Per studiare il CC sono state identificate delle sottoregioni (ROIs). In particolare sono state definite le seguenti sottoregioni: CC1 che include il ginocchio e il rostro, CC5 che comprende lo splenio; CC2, CC3, CC4 sono state identificate nella rimanente porzione del CC suddividendola in tre parti uguali lungo la linea antero-posteriore.

La presenza di danno a carico del CC nei pazienti con SM è stata dimostrata, in accordo con la letteratura, da una significativa diminuzione dei valori di FA nei pazienti rispetto ai controlli ( $0.63 \pm 0.02$  vs.  $0.74 \pm 0.01$ ;  $p=0.0005$ ). In particolare, una significativa riduzione dei valori di FA nei pazienti con SM è stata identificata in ognuna delle ROIs analizzate (CC1:  $p=0.002$ ; CC2:  $p=0.006$ ; CC3:  $p=0.008$ ; CC4:  $p=0.0008$ ; CC5:  $p=0.004$ ).

### *Correlazioni tra parametri motori e di risonanza*

Al fine di studiare il ruolo del CC nella coordinazione bimanuale, i valori medi di FA all'interno delle differenti sottoregioni del CC sono stati correlati con l'IHI nei pazienti con SM. Un aumento significativo dell'IHI corrispondeva a una diminuzione significativa della FA solo nelle sottoregioni CC1 e CC2, a tutte le frequenze di metronomo (1Hz: CC1  $r=-0.53$  e  $p < 0.05$ , CC2  $r=-0.74$  e  $p < 0.001$ ; 1.5Hz: CC1  $r=-0.57$  e  $p < 0.05$ , CC2  $r=-0.73$  e  $p < 0.001$ ; 2Hz: CC1  $r=-0.68$  e  $p < 0.05$ , CC2  $r=-0.58$  e  $p < 0.05$ ). Correlazioni significative con la FA in CC1 e CC2 sono state trovate anche con i valori di IHI mediati sulle diverse frequenze.

Sono stati successivamente reclutati 25 pazienti e i risultati sono stati confermati.

In conclusione, i nostri dati indicano che il grado di danno nelle porzioni più anteriori del CC influenza la coordinazione bimanuale. Inoltre l'approccio utilizzato che correla misure comportamentali con indici quantitativi di danno della sostanza bianca ottenuti con RM può aiutare a meglio comprendere i differenti aspetti dell'alterazione della performance motoria nella SM.

Una tecnica di indagine analoga è stata inoltre utilizzata per un nuovo protocollo di cinematica, basato su protocolli di apprendimento puramente motorio (senza sequenze di stimoli predefinite da imparare) e *reaction time*.

In particolare, a 22 pazienti e 10 controlli, tutti destrimani, è stato chiesto di rispondere a stimoli casuali con movimenti di opposizione delle dita con la mano destra e poi con la mano sinistra, sempre indossando il guanto dotato di sensori per registrare il contatto tra le dita. Lo stimolo consisteva nella presentazione sullo schermo di un computer di una sequenza casuale di quadrati rossi visualizzati sul polpastrello dell'indice, medio, anulare e mignolo di una mano disegnata a video; il soggetto doveva toccare il dito corrispondente con il pollice il più velocemente possibile.

Poiché è stato dimostrato che l'allenamento con una mano durante un compito motorio risulta in un miglioramento delle prestazioni con l'altra mano, abbiamo ipotizzato un ruolo del corpo calloso, combinando i dati sulla performance motoria (il trasferimento non specifico) con il danno nelle sottoregioni del CC.

I pazienti sono stati in grado di migliorare le prestazioni motorie riducendo i tempi di risposta con la pratica, con un andamento analogo ai controlli, e hanno conservato la capacità di trasferire le informazioni acquisite alla mano sinistra (non allenata). Si è notata una maggiore variabilità nel processo di trasferimento, indicata da una deviazione standard della media del grado di trasferimento non specifico molto più grande, nel gruppo dei pazienti rispetto al gruppo di controllo, suggerendo la presenza di disturbi sottili nella comunicazione interemisferica in alcuni pazienti. Quindi, abbiamo correlato l'entità del trasferimento non specifico con l'FA media ottenuta nelle cinque sottoregioni del CC. Una correlazione significativa è stata trovata soltanto nella ROI CC3, che comprende la porzione centrale e una parte della porzione posteriore del corpo del CC ( $r = 0.74$ ,  $p = 0,003$ ), che sembra quindi essere essenziale per il trasferimento interemisferico delle informazioni relative alle attività sensomotorie pure.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Bonzano L, Tacchino A, Roccatagliata L, et al. Callosal contributions to simultaneous bimanual finger movements. *Journal of Neuroscience* 2008;28(12):3227-3233.

## **In corso di pubblicazione**

Bonzano L, Tacchino A, Roccatagliata L, et al. Structural integrity of callosal midbody influences intermanual transfer in a motor reaction-time task. *Human Brain Mapping* 2010.

**Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 45.000 €.  
Studio iniziato nel 2008.**

## SIMS-Trial: efficacia di un supplemento informativo strutturato per le persone con sclerosi multipla di nuova diagnosi (ISRCTN81072971)

▶ **Alessandra Solari**

Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

*Collaboratori:*

- ▷ **Andrea Giordano**
- ▷ **Daniela Calabrese**
- ▷ **Giusi Ferrari**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Vittorio Martinelli, Bruno Colombo, Federica Esposito, Lucia Moiola, Mariaemma Rodegher, Marta Radaelli**, Dipartimento di Neurologia, IRCCS San Raffaele, Milano
- ▷ **Maria Trojano, Giovanni Zimatore, Imma Plasmati, Carla Tortorella**, Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche, Università di Bari
- ▷ **Alessandra Lugaresi, Deborah Farina, Giovanna De Luca, Valeria Di Tommaso, Maria Di Ioia, Daniela Travaglini**, Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università G. D'Annunzio, Chieti
- ▷ **Franco Granella, Paolo Immovilli, Eleonora Dalla Bella**, Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Neurologia, Università di Parma
- ▷ **Paolo Confalonieri, Carlo Antozzi, Lorenzo Maggi**, Dipartimento Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano
- ▷ **Michele Messmer Uccelli**, Area Servizi e Progetti Socio-Sanitari, Associazione Italiana Sclerosi Multipla Onlus, Genova
- ▷ **Claudia Borreani**, Unità di Psicologia, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano
- ▷ **Roberto D'Alessandro**, Clinica Neurologica, Università di Bologna
- ▷ **Eugenio Pucci**, Unità di Neurologia, Ospedale di Macerata

### Premesse

La comunicazione della diagnosi è descritta come un momento evocativamente pregnante dalle persone con sclerosi multipla (SM). Un contesto adeguato, la disponibilità di tempo e un maggiore scambio di informazioni emergono come le principali criticità, anche per i pazienti con diagnosi più recenti. Il cd e il booklet "Sapere Migliora" sono stati messi a punto per e con la diretta partecipazione delle persone con SM, in base a una revisione della letteratura, il contributo di esperti, e il risultato di gruppi di discussione.

## Obiettivi

Valutare l'efficacia di un supplemento informativo (colloquio individuale con navigazione del cd e consegna del booklet "Sapere Migliora") nel migliorare la conoscenza della malattia e la soddisfazione rispetto alla cura nelle persone con SM di nuova diagnosi. Il disegno utilizzato per la verifica di efficacia è stato quello del trial multicentrico randomizzato controllato di fase III, condotto secondo i principi della "Buona Pratica Clinica" (ISRCTN81072971).

## Risultati

Tra aprile 2008 e giugno 2009, sono stati valutati 197 pazienti, presso i cinque centri partecipanti, e 120 (61%) hanno soddisfatto i criteri di inclusione. La randomizzazione centralizzata, effettuata immediatamente dopo la comunicazione della diagnosi di SM, ha assegnato 60 dei 120 pazienti a ricevere il supplemento informativo entro 15 giorni dalla comunicazione; i rimanenti 60 pazienti sono stati assegnati a riceverlo dopo il completamento dello studio. L'esito primario dello studio, valutato a un mese (follow-up postale) e a sei mesi (visita), era costituito dal conseguimento di un punteggio al terzile superiore sia per conoscenza della malattia (questionario Multiple Sclerosis Knowledge Questionnaire [MSKQ]) che per soddisfazione rispetto alla cura (questionario Comunicazione medico-paziente nella SM, versione rivista, COSM-R sezione 2). Altri esiti erano gli eventi avversi seri (ospedalizzazione in ambito psichiatrico, tentativi suicidari, morte per ogni causa), i punteggi di MSKQ e COSM-R sezione 2, il numero di contatti presso il centro, l'aderenza alle terapie, i cambiamenti di centro e i punteggi alle scale *Hospital Anxiety and Depression Scale* e *Control Preference Scale*. Quattro pazienti hanno rifiutato il supplemento informativo, mentre un paziente ha rifiutato il colloquio. Il follow-up postale a un mese è stato completato da 60 (100%) pazienti assegnati al supplemento informativo vs. 58 (97%) controlli. La visita a sei mesi è stata effettuata da 55 (92%) pazienti assegnati al supplemento informativo vs. 55 (92%) controlli. I risultati dell'analisi sono stati ottenuti in base all'originaria assegnazione al trattamento (*intention to treat*) dei 120 pazienti.

Hanno conseguito l'esito primario a un mese 30 (50%) pazienti assegnati al supplemento informativo vs. 8 (13%) controlli (*odds ratio* [OR] 6.5; intervallo di confidenza [IC] al 95% 2.6 - 16.0;  $p < 0.001$ ; *number needed to treat* = 3). I valori a sei mesi erano 26 (43%) vs. 11 (18%; OR 3.4; 95%IC 1.5-7.8;  $P=0.004$ ; *number needed to treat* = 4). Non vi sono stati eventi avversi seri, né incrementi significativi dell'ansia associati all'esposizione al supplemento informativo. Nell'analisi multivariata, inclusiva delle principali variabili demografiche e cliniche, si è confermato l'effetto indipendente del supplemento informativo (OR a un mese 9.9; 95% IC 3.0 - 32.6;  $p = 0.001$ ; OR a sei mesi 6.2; 95% IC 2.1 - 17.9;  $p = 0.001$ ).

Conclusioni: Il supplemento informativo è risultato sicuro e in grado di migliorare significativamente la conoscenza della malattia e la soddisfazione rispetto alla cura.

## Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi

Giordano A, Messmer Uccelli M, Pucci E, et al. On behalf of the SIMS-Trial group. The multiple sclerosis knowledge questionnaire: a self-administered instrument for recently diagnosed patients. *Mult Scler* 2010;16:100-111.

Giordano A, Mattarozzi K, Pucci E, et al. Participation in medical decision making: attitudes of Italians with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;275:86-91.

Solari A, Lugaresi A, Trojano M, et al. The “Sapere Migliora” information aid for newly-diagnosed multiple sclerosis patients is effective: results of the SIMS-trial (ISRCTN81072971). *Neurol Sci* 2009;30: suppl. (Abstract S43).

Solari A, Giordano A, Lugaresi A, et al. Anxiety and depression symptoms in newly-diagnosed multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 2009;30: suppl. (Abstract S243).

Solari A, Giordano A, Pucci E, et al. Development of the multiple sclerosis knowledge questionnaire. *Neurol Sci* 2009;30: suppl. (Abstract S109).

Solari A, Lugaresi A, Trojano M, et al. On behalf of the SIMS-trial group. Effectiveness of an information aid for newly-diagnosed MS patients: the SIMS-trial. *J Neurol* 2009;256 suppl 2 (Abstract S238).

Solari A, Pucci E, Martinelli V, et al. On behalf of the SIMS-trial group. Development of an information aid for newly-diagnosed MS patients. *J Neurol* 2009;256 suppl 2 (Abstract S238).

Solari A, Trojano M, Martinelli V, et al. On behalf of the SIMS-trial. Effectiveness of an information aid for newly-diagnosed MS patients: the SIMS-trial. *The International Journal of MS Care* 2009;11 suppl 2 (Abstract 73).

Messmer Uccelli M, Pucci E, Martinelli V, et al. Development of an information aid for newly-diagnosed MS patients. *The International Journal of MS Care* 2009;11 suppl 2 (Abstract 82).

Solari A, Trojano M, Martinelli V, et al. On behalf of the SIMS-trial group. Effectiveness of an information aid for newly diagnosed multiple sclerosis patients: the SIMS-trial. *The International Journal of MS Care* 2009;11(1):45-46.

Giordano A. Results of the SIMS-trial. First International Conference on Patient Education in MS and RIMS special interest group meeting patient information. Trials on patient information in MS: past and present. Hamburg, 22-23 January 2010.

Giordano A. Efficacia del supplemento informativo “Sapere Migliora” per le persone con sclerosi multipla di nuova diagnosi (SIMS-Trial-ISRCTN81072971). Convegno del Centro Universitario di Ricerca sugli Aspetti comunicativo relazionali in medicina (C.U.R.A.) – Università degli Studi di Milano. Milano, 26-28 novembre 2009.

### **In corso di pubblicazione**

Giordano A, Lugaresi A, Trojano M, et al. Per il Gruppo SIMS-trial. Efficacia del supplemento informativo “Sapere Migliora” per le persone con sclerosi multipla di nuova diagnosi (SIMS-Trial-ISRCTN81072971). *La Cura* 2010.

### **Presentati per la pubblicazione**

Solari A, Mattarozzi K, Vignatelli L, et al. On behalf of the SIMS-Trial group and of the GERONIMUS group. Development and validation of a patient self-assessed questionnaire on satisfaction with communication of the multiple sclerosis diagnosis.

**Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 110.000 €.  
Studio iniziato nel 2008.**

# Indagini di Proteomica e Metabonomica per l'Identificazione di Marcatori Molecolari di sclerosi multipla

► **Andrea Urbani**

Dipartimento di Medicina Interna,  
Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

*Collaboratori:*

- ▷ **Stefano Levi Mortera**
- ▷ **Luisa Pieroni**
- ▷ **Maurizio Ronci**
- ▷ **Francesca Petrucci**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Luca Battistini, Giovanna Borsellino**, Fondazione Santa Lucia, IRCCS, Roma

## Premesse

Il sequenziamento completo del genoma umano ha aperto la strada a un nuovo movimento scientifico caratterizzato dallo studio di elementi funzionali della nostra eredità genetica, potenzialmente coinvolti in varie malattie multifattoriali. Lo sviluppo di una nuova generazione di spettrometri di massa sta cambiando drasticamente le tecnologie coinvolte in questo tipo di studi, dando la possibilità di effettuare analisi quantitative dirette in campioni biologici come sangue, urine, saliva, CSF.

Il nostro gruppo di ricerca è impegnato in studi di proteomica e metabonomica clinica su campioni di plasma, siero e CSF di persone con sclerosi multipla, mediante l'utilizzo di differenti strumentazioni di spettrometria di massa e metodi di bioinformatica. L'analisi dei dati di spettrometria di massa è ottenuta sia mediante software commerciali sia per mezzo di algoritmi sviluppati nei nostri laboratori (Mantini et al. 2007, Mantini et al. 2008) che ci permettono di elaborare i dati sperimentali con indagini di statistica multivariata. La metodologia messa a punto ha mostrato ottime performance analitiche in accordo con gli standards internazionali di chimica clinica.

L'approccio di metabonomica è una delle ultime sfide nei progetti che riguardano investigazioni *data driven*. Oggi queste tecnologie ci permettono di effettuare indagini non supervisionate che assicurano una esplorazione olistica delle biomolecole contenute in un campione biologico (Pandey et al. 2000), mettendo in luce possibili *patterns* differenziali associati all'evolversi della malattia.

Diverse evidenze sperimentali e cliniche testimoniano il coinvolgimento dei Linfociti T autoreattivi nello sviluppo delle lesioni neurodegenerative della SM: nel modello animale della SM, la En-

cefalomielite Sperimentale dei topi (EAE), la malattia può essere indotta trasferendo cellule T specifiche che riconoscono la mielina come antigene, inoltre uno dei marcatori istopatologici della malattia nell'uomo è costituito da lesioni di demielinizzazione caratterizzate da infiltrazioni perivenulari di linfociti T autoreattivi. Il sistema immunitario umano è molto complesso e costituito da diversi componenti cellulari che interagiscono tra loro ed è noto che alcune sottopopolazioni cellulari, apparentemente uguali dal punto di vista fenotipico, svolgono invece funzioni estremamente diverse e molto complesse.

I linfociti T autoreattivi circolano anche nel sangue di individui sani, dove sono sotto il controllo delle cellule T regolatorie, che ne sopprimono l'attivazione e tengono sotto controllo l'innescò di reazioni di autoimmunità.

In particolare il gruppo di Luca Battistini ha identificato nella molecola CD39 un marcatore di superficie specifico delle cellule T regolatorie, la cui espressione conferisce a queste cellule funzioni caratteristiche. Il CD39 è uno dei principali enzimi coinvolti nella regolazione della concentrazione extracellulare dei nucleotidi e fa parte della famiglia degli ecto-nucleoside -trifosfato-difosfoidrolasi (E-NTPasi), e metabolizza l'ATP in 5'-AMP.

L'ATP extracellulare è un segnale di pericolo che viene rilasciato da cellule danneggiate e funziona come segnale chemotattico per i linfociti, attivatore di una risposta preinfiammatoria e induttore di dolore localizzato. CD39, rimuovendo il nucleotide tramite idrolisi svolge quindi una funzione di immunomodulatore e ha un'influenza diretta nell'ambiente circostante.

È stato osservato che in pazienti con la forma *relapsing/remitting* di SM il numero di cellule T reg CD39+ è ridotto rispetto alle persone sane, quindi nell'uomo il CD39 potrebbe essere un marcatore cellulare caratteristico di una popolazione cellulare coinvolta nel controllo di questa patologia infiammatoria autoimmune.

Il quadro generale che emerge dallo studio della SM sottolinea come tutte le sottopopolazioni linfocitarie siano coinvolte nell'induzione e nella progressione della malattia.

Per chiarire i meccanismi molecolari coinvolti in questa patologia è determinante poter usufruire di tecnologie innovative che permettano di distinguere e caratterizzare le diverse popolazioni cellulari coinvolte sia dal punto di vista fenotipico che genetico.

Indagini di Proteomica e Metabonomica delle sottopopolazioni di linfociti T prevalentemente coinvolte nella SM possono generare dati molto utili all'identificazione di molecole chiave nell'induzione e progressione della malattia.

## Obiettivi

L'obiettivo di questo progetto è di ottenere una caratterizzazione fenotipica delle popolazioni linfocitarie coinvolte nella SM.

Gli esperimenti di Proteomica e Metabonomica sono stati condotti contestualmente su sottopopolazioni cellulari caratterizzate da marcatori di superficie tipicamente associati ai linfociti T circolanti nel sangue periferico di persone con SM a differenti stadi della malattia.

In collaborazione col gruppo di Luca Battistini saranno delineate delle strategie per poter identificare inequivocabilmente differenti sottopopolazioni linfocitarie, in particolare sono state studiate le cellule T regolatorie che espongono sulla loro superficie la molecola CD39.

Questa popolazione cellulare potenzialmente coinvolta nell'insorgenza e nella progressione della SM, è stata caratterizzata in esperimenti di citometria e proteomica allo scopo di ottenere una combinazione di informazioni utili all'identificazione di marcatori biologici con potenziale diagnostico.

L'obiettivo da raggiungere può essere riassunto dai seguenti punti fondamentali:

1. *ottimizzazione dei dati di citometria e proteomica;*
2. *identificazione di un profilo proteico caratteristico dei linfociti CD39+;*
3. *analisi dettagliata delle sottopopolazioni linfocitarie coinvolte nella risposta autoimmune nella SM per mezzo di esperimenti di citofluorimetria policromatica;*
4. *costruzione di un modello metabolico preliminare multilivello della dis-regolazione delle T-regolatorie basato sulla combinazione dei dati ottenuti dalla citometria e dalla proteomica.*

## Risultati

L'analisi proteomica delle cellule che esprimono diversi livelli di CD39 è stata preliminarmente svolta su sottopopolazioni di cellule CD4+CD25<sup>bright</sup> ottenute dal sangue periferico di persone sane. In particolare le sottopopolazioni CD4+CD25<sup>bright</sup>CD39+, CD4+CD25<sup>bright</sup>CD39- e CD25 negative sono state separate con esperimenti di citofluorimetria nel gruppo di Luca Battistini e l'analisi dell'espressione delle proteine è stata effettuata con esperimenti di proteomica quantitativa *shot gun* senza marcatura, con uno spettrometro di massa Q-ToF (Q-ToF Premiere, Waters Corporation), basato su una tecnologia di *nano ultra performance liquid chromatography* (nUPLC) accoppiata a MS<sup>E</sup>.

Abbiamo lavorato con *pool* di cellule per ognuna delle 3 sottopopolazioni cellulari che chiameremo A (CD25<sup>high</sup>CD39-), B (CD25<sup>high</sup>CD39+) e C (CD25 negative) per ottenere i quali sono stati necessari quattro esperimenti di separazione in citofluorimetria.

Ciascun *pool* è stato sottoposto a una lisi cellulare ed estrazione del contenuto proteico totale che è stato a sua volta successivamente modificato con una reazione di riduzione e alchilazione e successiva digestione triptica in fase liquida.

Il digesto peptidico è stato analizzato con il nostro sistema di nano cromatografia liquida ACQUITY UPLC™ System accoppiata a spettrometro di massa Q-ToF Premier™ (Waters) e i dati ottenuti in LC-MS sono stati direttamente processati e programmati per la ricerca in banca dati con il software ProteinLynx Global Server v2.3(Waters), limitando la ricerca a una banca dati umana per l'identificazione delle proteine. Con lo stesso software abbiamo potuto effettuare un'analisi di espressione proteica differenziale ed evidenziare quante e quali proteine fossero sovra o sotto regolate nei diversi gruppi sperimentali.

Abbiamo trovato un totale di 91330 EMRT *cluster peptidici*, sono state identificate 55 proteine risultate essere differenzialmente espresse nei tre gruppi considerati, utilizzando un filtro per l'espressione delle proteine in almeno 2 dei 3 replicati di ciascun gruppo e con un rapporto di espressione di almeno 1,5 volte tra i gruppi.

Per evidenziare delle possibili correlazioni funzionali tra le proteine identificate ed espresse differenzialmente abbiamo effettuato un'analisi con il software *Ingenuity Pathway Analysis-IPA* (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)), che permette di costruire delle reti globali di connessioni molecolari sviluppate sulla base delle informazioni contenute nell'Ingenuity Pathways Knowledge Base, e di identificare vie metaboliche canoniche in cui le proteine identificate potrebbero essere coinvolte.

Dall'analisi dei nostri risultati abbiamo ottenuto delle informazioni interessanti riguardo ad alcune delle proteine differenzialmente espresse nei gruppi A e B. Alcune di queste si sono infatti rivelate essere degli importanti nodi di controllo termodinamico nelle vie metaboliche della glicolisi e della gluconeogenesi (p.es. *phosphoglycerate mutase*, *pyruvate kinase*). Queste infor-

mazioni danno una prima indicazione sul fenotipo anergico delle cellule T regolatorie e sembrano essere in linea con la comprovata differente attività metabolica delle due popolazioni cellulari. Altre invece, come le *Heat Shock Protein 90 alpha*, classe A e B, sono proteine coinvolte nei processi autofagici *chaperonine*-mediati e hanno un ruolo di primaria importanza in condizioni di arresto dell'attività di degradazione delle proteine mediate dal complesso ubiquitina-proteosoma. Tale condizione è spesso associata a cellule del Sistema Nervoso Centrale in patologie neurodegenerative.

Sulla base di questi dati preliminari ci prefiggiamo di poter estendere questo studio pilota a un'indagine più approfondita per verificare eventuali strategie farmacologiche per l'amplificazione delle cellule T regolatorie *in vitro* al fine di promuovere strategie di trapianto autologo in persone con SM.

### **Publicazioni e Comunicazioni a congressi**

Indagini di proteomica e metabolomica per l'identificazione di marcatori molecolari di sclerosi multipla. Convegno Nazionale FISM. Roma, 26-27 maggio 2009.

Circulating polar lipids in multiple sclerosis: a mass spectrometry based lipidomic investigation. XIX AINI Congress. Porto Cervo, 1-4 ottobre 2009.

Proteomix of T-reg lymphocyte. MS Group Retreat 2010. Pieve a Salti (SI).

***Progetto finanziato col bando 2008, per un periodo di 1 anno e l'ammontare di 25.000 €. Studio iniziato nel 2009.***

# Imipramina come nuovo trattamento per inibire il rilascio di IL-1beta nella sclerosi multipla

► **Claudia Verderio**

Istituto CNR di Neuroscienze,  
Dipartimento di Farmacologia Medica, Milano

*Collaboratori:*

- ▷ **Luisa Novellino**
- ▷ **Loredana Riganti**
- ▷ **Cinzia Cagnoli**
- ▷ **Michela Matteoli**

*Collaborazioni con altri gruppi:*

- ▷ **Roberto Furlan, Francesca Ruffini**, IRCCS Ospedale San Raffaele, Unità di Neuroimmunologia, Dibat, Milano

## Premesse

La sclerosi multipla è una delle più comuni malattie invalidanti dell'uomo. Nel tessuto nervoso di pazienti con questa patologia sono presenti cellule infiammatorie, quali le cellule microgliali, che, rilasciando citochine proinfiammatorie, provocano una progressiva demielinizzazione e un conseguente danno neuronale.

L'idea alla base del progetto è derivata da uno studio recente del nostro laboratorio che ha mostrato che le cellule microgliali stimulate con ATP, un mediatore che si accumula ai siti d'infiammazione, rilasciano microvescicole dalla membrana plasmatica negli spazi extracellulari (Bianco et al., 2005). Queste microvescicole contengono e rilasciano IL-1beta, una citochina pro-infiammatoria d'importanza critica nella patogenesi della sclerosi multipla. Avevamo inoltre ottenuto indicazioni preliminari che suggerivano che la formazione delle microvescicole richiedesse l'attivazione dell'enzima sfingomielinasi acida e fosse inibita da inibitori di tale enzima. Scopo principale del progetto è stato quindi verificare se uno dei più efficaci bloccanti dell'enzima, il farmaco antidepressivo triciclico imipramina potesse inibire il rilascio di IL-1-beta in modelli animali di SM, riducendo la componente infiammatoria associata alla patologia.

## Obiettivi

- a) verificare che imipramina, efficace inibitore della sfingomielinasi acida, bloccando il rilascio di microvescicole rilasciate dalla membrana plasmatica di cellule microgliali attivate, inibisse il rilascio della citochina pro-infiammatoria IL1 beta da cellule microgliali primarie mantenute in vitro;
- b) definire la concentrazione di imipramina richiesta per bloccare il rilascio in vitro sia di microvescicole che di IL1 beta da parte delle cellule microgliali;
- c) valutare l'effetto terapeutico dell'imipramina nel modello murino (EAE) largamente utilizzato per studiare la patologia umana.

## Risultati

I risultati ottenuti hanno confermato le nostre osservazioni preliminari che suggerivano un ruolo cruciale della sfingomielinasi acida nel rilascio di microvescicole dalla membrana plasmatica e di IL1 beta da cellule gliali reattive. Abbiamo, infatti, osservato che in colture gliali ottenute da topi *knock out* per l'enzima sfingomielinasi acida il rilascio di IL1 beta e di microvescicole è completamente assente e può essere parzialmente ristabilito nelle colture tramite addizione di sfingomielinasi esogena (obiettivo 1, raggiunto). Questi risultati rappresentano la prima dimostrazione del ruolo fondamentale della sfingomielinasi acida nel rilascio di microvescicole e di IL1 beta dalle cellule gliali reattive e suggeriscono che il blocco del rilascio delle microvescicole rappresenti un nuovo approccio terapeutico per il trattamento di patologie infiammatorie come la sclerosi multipla caratterizzate da attivazione microgliale. Questi risultati sono stati descritti nel lavoro *Acid Sphingomyelinase Activity Triggers Microparticle Release From Glial Cells*, che è stato pubblicato sulla rivista EMBO Journal (Bianco et al., 2009).

Dopo aver stabilito che la minima concentrazione di imipramina in grado di ridurre in modo significativo il rilascio di IL1 beta da cellule gliali reattive equivale a 0.5  $\mu$ M (obiettivo 2, raggiunto), in collaborazione con Roberto Furlan, abbiamo valutato il potenziale effetto terapeutico di imipramina nel modello murino di EAE cronica progressiva. L'imipramina è stata somministrata tramite iniezione intravenosa (10mg/Kg die) una volta al giorno e la malattia è stata indotta in topi C57/BL6 tramite immunizzazione con il peptide MOG35-55. Un gruppo di dieci topi è stato iniettato con imipramina a partire dal giorno dell'immunizzazione e un secondo gruppo di topi ha ricevuto il farmaco a partire dal giorno di esordio della malattia. Gli animali di controllo sono stati trattati con il solo veicolo. Il grado e la progressione della malattia negli animali EAE trattati o meno con l'imipramina è stata valutata monitorando il peso e lo *score* clinico degli animali fino a 60 giorni dopo l'immunizzazione ed effettuando un'analisi immunohistologica dei tessuti dopo sacrificio degli animali. I risultati ottenuti indicano che né il trattamento preventivo né il trattamento terapeutico con imipramina riducono la perdita di peso degli animali EAE e non migliorano lo *score* clinico. La quantificazione degli infiltrati di cellule infiammatorie, delle aree demielinizzate e del danno assonale in topi EAE trattati o meno con imipramina hanno confermato l'assenza di riduzione del danno tissutale indotto dalla malattia negli animali trattati con il farmaco. Questi risultati negativi sono aperti a diverse interpretazioni. È possibile che l'imipramina non sia in grado di bloccare *in vivo* il rilascio di microvescicole o che il rilascio di questi organelli e della citochina pro-infiammatoria IL1 beta non contribuisca in modo significativo alla progressione della patologia, anche se questa possibilità è in netto contrasto con precedenti evidenze sperimentali che indicano un ruolo importante della citochina nella SM. In alternativa, i risultati negativi

ottenuti potrebbero essere semplicemente legati ad azioni aspecifiche del farmaco, non dipendenti dal blocco della sfingomielinasi acida, quali i numerosi effetti collaterali di imipramina, largamente documentati in pazienti sottoposti a terapia antidepressiva. In attesa che siano sviluppati inibitori più specifici per la sfingomielinasi, per valutare quanto le microvescicole gliali e la IL1 beta rilasciata tramite le stesse possano contribuire alla progressione della sclerosi multipla stiamo sviluppando una metodica per determinare *in vivo* la quantità di microvescicole gliali rilasciate nel corso della patologia sia nel modello murino di EAE che nell'uomo. Abbiamo inoltre iniziato a valutare l'andamento della EAE in topi *knock out* per sfingomielinasi acida, nei quali il rilascio delle microvescicole dovrebbe essere completamente compromesso.

## **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Bianco F, Colombo A, Soglietti L, et al. Different properties of P2X7 receptor in hippocampal and cortical astrocytes. *Purinergic Signal* 2009 Jun;5(2):233-40.

Bianco F, Perrotta C, Novellino L, et al. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J* 2009 Apr;28(8):1043-54. Erratum in: *EMBO J* 2009 May;28(9):1374.

Glia-derived microvesicles: a new pathway of intercellular communication in the CNS. 1st retreat of the CNR Institute of Neuroscience. Cavalese, January 2010.

Astrocyte-derived microvesicles: possible role in intercellular communication. 3rd Mediterranean Conference of Neuroscience. Alexandria, December 2009.

Microparticle release from glial cells: possible role in the control of neuronal activity. National Congress of the Italian Society of Neuroscience. Milano, ottobre 2009.

Microparticle release from glial cells: possible role in the control of neuronal activity. 34° Convegno Nazionale SIF. Rimini, ottobre 2009.

Acid Sphingomyelinase triggers P2X7-induced microparticle release from glial cells. 40th ASN Meeting. Charleston-South Carolina, March 2009.

Mechanism of microparticle release from glial cells. Role of glia-derived microparticles in the control of neuronal activity. ABCD Meeting. Bertinoro, aprile 2009.

**Progetto finanziato col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 45.000 €.  
Studio iniziato nel 2008.**



**LE BORSE  
DI STUDIO  
FINANZIATE  
DALLA FISM**

**2007 - 2009**

# Borse di studio finanziate nel **2007**

---

**Bodini Benedetta**

• 1 anno

• € 30.000

---

Institute of Neurology, University College of London

- *Risonanza Magnetica a trasferimento di magnetizzazione nella sclerosi multipla primariamente progressiva: uno studio longitudinale di 5 anni*

---

**Casazza Simona**

• 2 anni

• € 60.000

---

Department of Neurology, University of California, San Francisco

- *Identificazione di pathways molecolari coinvolti nell'effetto terapeutico delle cellule mesenchimali staminali*

---

**Giordano Andrea**

• 2 anni

• € 36.000

---

Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

- *La qualità della vita associata alla salute ed altri strumenti "orientati al paziente" nella sclerosi multipla*

---

**Nicola Stefania**

• 1 anno

• € 20.000

---

Laboratorio di Immunologia, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università del Piemonte Orientale, Novara

- *Analisi dei ruoli svolti da osteopontina e B7H sulle cellule dendritiche nella sclerosi multipla*

---

**Nicolò Chiara**

• 2 anni

• € 44.000

---

Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

- *Interazione fra ospite e patogeno nello sviluppo di Relapsing EAE*

---

**Borsa Senior "Rita Levi Montalcini"**

---

**Taveggia Carla**

• 3 anni

• € 450.000

---

DIBIT Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

- *Ruolo delle secretasi nel taglio della Neuregulina-1 CRD: rilevanza nella mielinizzazione*

# Borse di studio finanziate nel **2008**

---

## **Bononi Angela**

• 2 anni

• € 32.000

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Patologia Generale, Università degli Studi di Ferrara

- *Omeostasi intracellulare del Ca<sup>2+</sup> e mitocondri in oligodendrociti durante stress ossidativo e loro ruolo nella morte per apoptosi*

---

## **Costanza Massimo**

• 2 anni

• € 36.000

Immunologia e Patologia Neuromuscolare, Istituto Neurologico, Fondazione Carlo Besta, Milano

- *Il ruolo della prolattina nell'encefalite autoimmune sperimentale*

---

## **Lovato Laura**

• 2 anni

• € 60.000

Department of Neurology, Brigham and Womens Hospital, Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

- *Caratterizzazione molecolare e definizione del bersaglio antigenico delle popolazioni di cellule B nel cervello affetto da sclerosi multipla*

---

## **Menichetti Gianluca**

• 2 anni

• € 36.000

Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Torino

- *Regolazione oligodendrocitaria del potenziale intrinseco di crescita neuritica nelle cellule di Purkinje del cervelletto*

---

## **Ottoboni Linda**

• 2 anni

• € 60.000

Department of Neurology, Brigham and Womens Hospital, Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

- *Studio delle variazioni funzionali legate alla variabilità allelica del gene CD58, associato a suscettibilità per sclerosi multipla*

---

## **Teneud Luis**

• 2 anni

• € 41.000

Servizio di Neurofisiologia Clinica, Lab. di Psicofisiologia e Neurofisiologia Sperimentale, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

- *Validazione di markers elettrofisiologici di danno nervoso in modelli animali di sclerosi multipla*

# Borse di studio finanziate nel **2009**

---

**Corrado Lucia****• 2 anni****• € 44.000**

Dipartimento di Scienze Mediche, Laboratorio di Genetica Umana, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro"

- *Ricerca di variazioni di sequenza nella regione HLA di classe I associate alla SM attraverso un approccio basato sul risequenziamento di pool di DNA*

---

**Di Dario Marco****• 2 anni****• € 36.000**

Istituto Neurologico Fondazione Carlo Besta Neurologia IV, Malattie Neuromuscolari e Neuroimmunologia, Laboratorio di immunobiologia delle malattie demielinizzanti del sistema nervoso centrale, Milano

- *Profilo di espressione genica delle cellule mononucleari del sangue periferico: identificazione di potenziali marcatori molecolari per la sclerosi multipla*

---

**Giordano Andrea****• 2 anni****• € 42.000**

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Unità di Neuroepidemiologia, Milano

- *Preferenze individuali e partecipazione alle decisioni mediche nella SM*

---

**Laroni Alice****• 2 anni****• € 44.000**

Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Università degli studi di Genova

- *Ruolo della popolazione cellulare natural killer CD56bright nella patogenesi della sclerosi multipla*

---

**Laterza Cecilia****• 2 anni****• € 38.000**

Divisione di Neuroscienze, Laboratorio di "Cellule Staminali e Neurogenesi", Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

- *Generazione di cellule staminali riprogrammate da Pazienti con sclerosi multipla e differenziamento in precursori neuronali ed oligogliali*

---

**Malfitano Anna Maria****• 2 anni****• € 40.000**

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Portici, Università degli Studi di Salerno

- *Studio dell'efficacia terapeutica di nuovi modulatori del sistema endocannabinoide nella sclerosi multipla*

---

**Orilieri Elisabetta****• 2 anni****• € 40.000**

Dipartimento di Scienze Mediche, Laboratorio di Immunologia, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Novara

- *Ruolo di anticorpi anti-Osteopontina nella sclerosi multipla*

---

**Rolla Simona****• 2 anni****• € 40.000**

Dipartimento di Oncologia e Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Torino

- *Caratterizzazione del repertorio TCR dei linfociti Th17 autoreattivi nella sclerosi multipla*

# **BORSE DI STUDIO TERMINATE NEL 2009**

## Identificazioni di pathway molecolari coinvolti nell'effetto terapeutico delle cellule mesenchimali staminali (MSCs)

<p>▶ <b>Simona Casazza</b></p> <p>Mentore: ▷ <b>Jorge Oksenberg</b></p>	Department of Neurology, University of California, San Francisco
---	--

### Premesse

Lo stroma derivato dal midollo osseo contiene una subunità di progenitori cellulari mesenchimali chiamati cellule mesenchimali staminali (MSCs), che sono considerate parte della nicchia delle cellule ematopoietiche staminali e che possono regolare parecchie funzioni delle cellule immunologiche. *In vitro* le MSCs sono in grado di supportare l'ematopoiesi e il differenziamento in cellule della linea mesodermica ma anche, in determinate condizioni sperimentali di differenziarsi in altri tipi cellulari incluso quello neurale. Queste condizioni sono state essenziali per supportare l'utilizzo delle MSCs nel trapianto allogenico del midollo osseo e nel mantenimento in vita di tessuto o cellule danneggiate.

Recentemente sia noi che altri gruppi, abbiamo mostrato come le MSCs abbiano un profondo effetto inibitorio sulla proliferazione dei linfociti T sia *in vivo* che *in vitro*. Le MSCs esercitano un simile effetto anche sui linfociti B, sulle cellule dendritiche e sulle cellule natural killer. Questi dati suggeriscono che le MSCs potrebbero essere usate come terapia per migliorare le malattie immunomediate. Abbiamo anche dimostrato che, tramite analisi dell'espressione genica, il set di trascritti espresso univocamente dalle MSCs è arricchito in fattori di trascrizione e componenti del Wnt signaling pathway. Tuttavia i meccanismi con cui le MSCs esercitano il loro effetto immunomodulatorio sui linfociti T è ancora poco chiaro.

### Obiettivi

MSCs sono degli immunomodulatori potenti e potenzialmente benefici nel trattamento di malattie autoimmuni. Lo scopo principale di questo progetto è stato quello di identificare i principali meccanismi con cui queste cellule svolgono la loro attività. In particolare:

- *analizzare i pathways molecolari che si sviluppano durante il processo di immunomodulazione delle MSCs sui linfociti T in vitro;*

- caratterizzare il profilo trascrizionale delle MSCs sotto diverse condizioni di coltura;
- identificare specifiche molecole che sono responsabili dell'attività immunomodulatoria delle MSCs.

## Risultati

Usando la tecnologia dei microarray e un nuovo approccio bioinformatico, abbiamo studiato i *pathways* molecolari che si sviluppano durante il processo di immunomodulazione delle MSCs sui linfociti T *in vitro*. Precisamente, abbiamo caratterizzato il profilo trascrizionale delle MSCs sotto diverse condizioni di coltura. Inoltre, per identificare specifiche molecole che sono responsabili dell'attività immunomodulatoria delle MSCs, abbiamo comparato il profilo trascrizionale delle MSCs con e senza esposizione a linfociti T attivati tramite presenza di anticorpi come CD3 e CD28.

Le analisi bioinformatiche hanno rivelato che molti dei geni espressi differenzialmente in queste condizioni sono target di 11 fattori trascrizionali (TF). Ho focalizzato allora la mia attenzione sui target di questi TF con particolare enfasi sulle proteine secrete o espresse sulla membrana. Questa strategia ha permesso di identificare possibili molecole che potrebbero avere un ruolo chiave nell'effetto immunomodulatorio delle MSCs. Per visualizzare tutti questi TF e i loro geni target abbiamo creato un network usando il software Cytoscape.

Tra i geni che risultano up-regolati nelle MSCs ci sono due molecole che hanno un risaputo effetto antiproliferativo sui linfociti T, precisamente CD274 (PD-L1) e NOS2. Riteniamo che l'analisi dettagliata di questi geni potrà aiutare a capire meglio i meccanismi coinvolti nell'effetto terapeutico delle MSCs.

Abbiamo validato i risultati dell'espressione genica ottenuta *in vitro* anche *in vivo*, in particolare abbiamo iniettato per via endovenosa 1X10<sup>6</sup> di MSCs marcate con un proteina fluorescente (green fluorescent protein, eGFP) in topi affetti da encefalo mielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello animale della sclerosi multipla dopo l'insorgenza dei sintomi. Gli animali sono stati controllati quotidianamente per 20 giorni e poi sacrificati e le cellule eGFP positive, nei diversi organi (cervello, midollo spinale, milza e linfonodi) sono state catturate attraverso l'utilizzo di un microscopio a micro dissezione laser (LCM, Molecular Device, Sunnyvale CA). Da queste cellule si è proceduto a estrarre l'RNA per poi valutare di nuovo l'espressione genica.

Anche nel caso del trattamento *in vivo* con queste cellule è stato ottenuto un miglioramento della malattia sia in termini di riduzione dello *score* clinico sia in termini di riduzione degli infiltrati infiammatori.

## Conclusioni

Questi dati suggeriscono che i meccanismi con i quali le MSCs bloccano la proliferazione dei linfociti T coinvolgono due processi:

- 1) i linfociti T attivati inducono specifici cambiamenti nelle MSCs, attraverso la produzione di interferone gamma per esempio, cambiamenti guidati largamente da geni come NFKb e altri TFs. Questo risulta nella produzione di molecole solubili (Cxcl10, Cxcl16) mediatori infiammatori (Nos2) e proteine di superficie cellulare (CD274, Ogr, Ptpre, Ifitm3);
- 2) le MSC utilizzano queste molecole per inibire la proliferazione dei linfociti T.

## Prospettive future

Molti studi sono ancora necessari per determinare il potenziale terapeutico di queste molecole. Un possibile approccio sarà quello di usare anticorpi antagonisti per questi geni (Cxcl10, Cxcl16, Nos2, CD274, Ogf, Ptpre, Ifitm3), per vedere se questi possono revertire l'effetto antiproliferativo delle MSCs sui linfociti T attivati. Questo approccio permetterà di valutare chi tra questi geni ha peso maggiore sulla soppressione della proliferazione dei linfociti T o se sia una combinazione di più fattori.

Un secondo approccio che seguirò comprende l'analisi della risposta delle MSC nell'attivazione delle cellule B, dendritiche e natural killer.

## Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi

Corvol JC, Pelletier D, Henry RG, et al. Abrogation of T cell quiescence characterizes patients at high risk for multiple sclerosis after the initial neurological event. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Aug;105(33):11839-44.

Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2007 Mar;61(3):219-27.

Pedemonte E, Benvenuto F, Casazza S, et al. The molecular signature of therapeutic mesenchymal stem cells exposes the architecture of the hematopoietic stem cell niche synapse. *BMC Genomics* 2007 Mar;8:65.

Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005 Sept;106(5):1755-61.

Corcione A, Casazza S, Ferretti E, et al. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Jul;101(30):11064-9.

Convegno Nazionale FISM. Roma, 17-18 maggio 2008.

Identification of molecular pathways involved in therapeutic effect of mesenchymal stem cells. IX International Congress of Neuroimmunology. Fort Worth, 26-30 October 2008.

Convegno Nazionale FISM. Roma, 26-27 maggio 2009.

Tob1 deficient mice experience early EAE onset and present immunological abnormalities. Annual meeting of Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS). San Francisco, 11-14 June.

**Borsa di studio finanziata col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 60.000 €.  
Studio iniziato nel 2007.**

# Interazione fra ospite e patogeno nello sviluppo di Relapsing EAE

<p>► <b>Chiara Nicolò</b></p> <p><i>Mentore:</i> ▷ <b>Francesco Ria</b></p>	<p>Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma</p>
---	---

## Premessa

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune in cui due fattori giocano un ruolo molto importante: i fattori genetici e i fattori ambientali. Molti agenti infettivi sono stati associati all'insorgenza di malattie autoimmuni. Una delle ipotesi più accettate è quella del mimetismo molecolare. Nel modello sperimentale della EAE murina il "fattore ambientale" è sicuramente interpretato dal *M. Tuberculosis* presente nell'adiuvante di Freund's che possiede le caratteristiche non-antigene specifiche necessarie a conferire il fenotipo encefalitogenico alle cellule T. Lo sviluppo della EAE nel topo è strettamente correlato all'antigene utilizzato e alla concentrazione di *mycobacterium tuberculosis* (MT) nell'adiuvante. Utilizzando la tecnica dell'*Immunescope*, una tecnica basata sulla PCR che permette di analizzare le cellule T antigene-specifiche attraverso lo studio della lunghezza della regione ipervariabile CDR3 della catena beta del TCR, abbiamo studiato il comportamento delle cellule T specifiche per PLP139-151 (p139) in presenza di differenti concentrazioni di MT nell'adiuvante. Abbiamo così osservato che la concentrazione di MT nell'adiuvante influenza l'uscita dai linfonodi di cellule T encefalitogeniche, specifiche per p139 che portano il riarrangiamento pubblico BV10-BJ1.1 (BV10+).

I prodotti del MT vengono riconosciuti principalmente dai *Toll Like Receptor 2* (TLR2) e 4 che sono presenti su cellule dendritiche (DC), l'ingaggio di tali recettori attiva le DC che producono una serie di citochine infiammatorie promuovendo una risposta infiammatoria di tipo Th1.

Sia fattori antigene specifici che non antigene specifici contribuiscono allo sviluppo della EAE. Come già detto la componente non antigene-specifica è determinata dalla concentrazione dell'MT nell'adiuvante; i fattori antigene-specifici invece comprendono il peptide e la composizione clonale dell'individuo che sviluppa la malattia, in cui possono essere presenti cellule T cross-reattive per antigeni *self* che possono venire attivate da patogeni cross-reattivi. La composizione clonale del repertorio T dell'individuo è strettamente legata alla sua storia immunologica.

## Obiettivi

In questo progetto di ricerca ci siamo preposti di comprendere meglio i meccanismi che modulano gli effetti dell'interazione fra agente infettivo e soggetti geneticamente predisposti alla malattia, attraverso:

- *identificazione dei geni che nel topo mediano la capacità del MT nel promuovere l'uscita delle cellule T CD4+ specifiche dai linfonodi e il priming delle cellule T CD8+ specifiche;*
- *studio dell'effetto dell'espressione della proteina cross-reattiva MPT64-PLP 139-151 in ceppi di micobatterio che differiscono in termini di persistenza nell'ospite e immunogenicità, sulla selezione dei repertori T specifici e sull'induzione della malattia;*
- *studio dell'effetto sulla composizione clonale del repertorio pre-immune p139-specifico in corso di malattia indotto dal micobatterio cross-reattivo o dall'epitopo non cross-reattivo PLP178-191 (p178).*

## Risultati

Per poter analizzare l'ipotesi che il TLR2 abbia un ruolo nel modulare la capacità del MT di promuovere l'uscita dal linfonodo delle cellule T p139 specifiche BV10+, sono stati utilizzati topi *Knock Out* (KO) per il TLR2. Due gruppi di topi SJL sono stati immunizzati con p139 emulsionata in adiuvante di Freund a concentrazione standard di MT (1 mg/ml, CFA standard) o addizionato con 4 mg/ml di MT (CFA concentrata). Le cellule T di milza sono state analizzate per la presenza o assenza di cellule T BV10+ nella milza e nei linfonodi; l'analisi mostra che un punto critico per valutare differenze di comportamento nella velocità di uscita MT-mediata dai linfonodi è a 15 giorni dall'immunizzazione. Infatti, in topi SJL immunizzati con p139+CFA concentrata a 15 giorni il 100% delle milze di topi con linfonodi positivi per le cellule BV10+ sono positive mentre i topi immunizzati in CFA standard hanno una frequenza del 33% di milze BV10+, a parità di frequenza nei linfonodi. Per valutare l'effetto del TLR2 sul movimento delle cellule BV10+, la progenie di topi SJL incrociati con C57/TLR2KO o con C57 *wild type* (wt) è stata immunizzata con p139 emulsionata in CFA standard. Dopo 15 giorni è stata analizzata la presenza delle cellule BV10+ nelle milze. Negli animali F1 SJLXC57 a 15 giorni il 100% delle milze utilizza il BV10 in topi BV10+ mostrando un fenotipo che abbiamo chiamato "*fast*" rispetto a quello degli SJL. Nei topi SJLxC57TLR2ko invece le cellule T BV10+ sono assenti. Questi risultati indicano che polimorfismi del TLR2 hanno un ruolo importante nel movimento delle cellule T BV10+.

Per valutare se una infezione con un microrganismo non patogeno come il *Mycobacterium Smegmatis* (MS) cross-reattivo per la p139 rMS<sup>p139</sup>) fosse in grado di indurre la malattia EAE nei topi SJL, tre gruppi di topi sono stati trattati con p139 emulsionata con CFA standard o con  $4 \times 10^6$  CFU di rMS<sup>p139</sup> vivo o con MS trasfettato con un plasmide di controllo. La quantità totale di p139 alla quale i topi vengono esposti dopo 10 giorni dall'infezione è stata calcolata in ~8 ng/topo.

L'rMS<sup>p139</sup> induce una malattia con andamento simile a quella indotta con p139 emulsionato in CFA concentrata. Inizialmente, la malattia indotta dal rMS<sup>p139</sup> mostra un andamento simile a quello che si osserva nella EAE indotta da peptide ma con uno score di malattia più basso. I topi immunizzati con la p139 hanno un picco di malattia a 26 giorni con DS a ~2 mentre quelli infettati con rMS<sup>p139</sup> hanno picco di malattia a 22 giorni con DS a 1.5. Da questo momento in poi i due gruppi di topi sviluppano una malattia con tempi significativamente diversi soprattutto nella fase di remissione. La durata della remissione nel gruppo di topi con il rMS<sup>p139</sup> vivo è di 28 giorni

mentre nel gruppo immunizzato con p139 è di 17 giorni. I topi immunizzati con il MS di controllo non sviluppano malattia. I sintomi clinici osservati nei topi infettati con rMS<sup>p139</sup> vivo non sono dovuti alla presenza del micobatterio nel SNC che è eliminato entro il giorno 20 post infezione.

Successivamente abbiamo studiato come la dose dell'agente infettivo influenzi il decorso della malattia. Sono stati immunizzati tre gruppi di SJL infettati con 10<sup>6</sup>, 4x10<sup>6</sup> e 4x10<sup>7</sup> CFU di rMSP139. Nel primo gruppo due topi su sei (33%) hanno sviluppato malattia con uno score di malattia (DS) a 1 e 1,5, i primi segni clinici si sono evidenziati a 17 giorni dall'infezione. Negli altri due gruppi abbiamo avuto un'incidenza di 5/6 e 4/5 e un DS medio di 1,3. I primi segni di malattia sono stati osservati al giorno 18. L'analisi istologica dei sistemi nervosi di topi infettati con 4x10<sup>6</sup> CFU di rMSP139 o immunizzati con p139 al picco di malattia (22-24 giorni) mostra che nei topi p139 vi è un infiltrato di cellule mononucleate a livello delle meningi, perivascolare e nella materia bianca del cervello ricco di cellule CD3<sup>+</sup> e microglia attivata; i topi infettati con 4x10<sup>6</sup> CFU non mostrano infiltrato ma zone di demielinizzazione localizzate prevalentemente nel midollo spinale.

Per valutare l'effetto di un ceppo con caratteristiche differenti rispetto al MS, abbiamo utilizzato un patogeno che ha una persistenza maggiore nell'organismo ed è più immunogenico, il *Mycobacterium Bovis* (BCG), geneticamente modificato per esprimere la p139 (rBCG<sup>p139</sup>). I topi infettati con 4x10<sup>6</sup> CFU di rBCG<sup>p139</sup> non hanno mostrato segni di malattia nei primi 20 giorni, che compaiono invece intorno al giorno 28 con un DS medio di 1,2.

Per avere una sorgente di cellule p139-specifiche che portano il riarrangiamento pubblico BV10-BJ1.1 e utilizzarle per modificare il repertorio clonale pre-immune dell'animale utilizzato abbiamo prodotto topi transgenici per la catena beta del TCR BV10-BJ1.1. Il transgene è stato prodotto utilizzando l'aplotipo TCR2 per potere individuare le cellule transgeniche BV10+ tramite l'uso di un anticorpo. Stiamo trasportando il transgene sul ceppo SJL, e abbiamo a disposizione allo stato corrente la generazione F7.

Per analizzare le caratteristiche delle cellule transgeniche in termini di specificità e frequenza, a un gruppo di topi F1 (SJLxC57wt) e F1 (SJLxC57Tg) sono state prelevate le milze e i linfonodi drenanti in assenza di immunizzazione (topi *naïve*) o dopo 10 giorni da immunizzazione con p139 emulsionata in CFA standard. Le cellule di questi topi sono state colorate con il CFSE e coltivate per tre giorni in assenza o presenza di 10 µg di p139. L'analisi al citofluorimetro delle cellule BV10+ CFSElow ci dice che:

- 1) lo 0.6% delle cellule totali di linfonodo e il 3% di quelle BV10+ sono specifiche per p139 rispetto allo 0.002% reperibile nelle stesse condizioni sperimentali in un topo SJL normale;
- 2) le cellule BV10+ transgeniche hanno bisogno di immunizzazione per attivarsi, dimostrando di avere un comportamento analogo a quelle del topo SJL normale.

## Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi

Nicolò C, Sali M, Di Sante G, et al. *Mycobacterium smegmatis* expressing a chimeric protein MPT64-PLP139-151 reorganizes the PLP-specific T cell repertoire favouring a CD8-mediated response and induces R-EAE. *J Immunol* 2009;184:222-235.

Nicolò C, Sali M, Di Sante G, et al. *Mycobacterium smegmatis* expressing a chimeric protein MPT64-PLP139-151 reorganizes the specific T cell repertoire favouring a CD8-mediated response and induces R-EAE. NeuroproMiSe International workshop. Roma 2009.

Di Sante G, Sali M, Penitente R, et al. Infection with *Mycobacterium smegmatis* expressing a chimeric MPT64-plp139-151 protein depletes the plp139-151 specific pre-immune repertoire, expands preferentially a plp-specific CD8+ repertoire and induces R-EAE. AINI Congress. Napoli 2008.

Nicolò C, Penitente R, Fusco S, et al. The dose of MT products influences in parallel mobilization of T cells and tyrosine-phosphorylation in spleen derived adherent cells, through polymorphic determinants. 7th National Conference SIICA; Italian Society Immunology, Clinical Immunology and Allergology. Rome 2008.

Nicolò C, Sali M, Di Sante G, et al. Infection with MS expressing PLP 139-151 shows that specific CD8+ are major players during the first acute bout of R-EAE. 7th National Conference SIICA; Italian Society Immunology, Clinical Immunology and Allergology. Rome 2008.

*Borsa di studio finanziata col Bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 44.000 €.  
Studio iniziato nel 2007.*

# La qualità della vita associata alla salute ed altri strumenti “orientati al paziente” nella sclerosi multipla

<p>► <b>Andrea Giordano</b></p> <p><i>Mentore:</i></p> <p>▷ <b>Alessandra Solari</b></p>	<p>Unità di Neuroepidemiologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano</p>
--	--

## Premessa

Il numero di strumenti di ricerca e analisi che misurano lo stato di salute dell'individuo e della popolazione documentati da rigorosi standard clinimetrici è limitato. Per questo motivo è necessario rendere gli strumenti sempre più efficaci e disponibili all'intera comunità scientifica, favorendone l'uso in culture non anglosassoni e in minoranze linguistiche, come quella italiana.

## Obiettivi

Il programma di addestramento ha riguardato diversi aspetti della validazione delle misure di esito “orientate al paziente” (PRO) nell'ambito della sclerosi multipla (SM). Nel corso dei due anni, il borsista ha partecipato al processo di traduzione e adattamento culturale in italiano di strumenti sviluppati negli Stati Uniti; ha condotto, dopo un'adeguata formazione, le analisi dei dati e fornito le interpretazioni degli stessi, soprattutto per quanto concerne la validità di contenuto degli strumenti di “Qualità della vita associata alla salute” (QdVS).

## Risultati

### *Traduzione e adattamento culturale*

Il borsista ha contribuito alla messa a punto della versione italiana del *Control Preference Scale* (CPS), che valuta le preferenze dei pazienti rispetto alla partecipazione alle decisioni mediche. Di seguito, vengono riportati i risultati della validazione clinica.

*Setting:* sono stati inclusi nello studio 140 persone con SM seguite presso cinque centri italiani, tra aprile 2007 e marzo 2008 (criteri di inclusione: età  $\geq 18$  anni, diagnosi da almeno 3 mesi).

*Disegno:* indagine trasversale, più re-test dopo 2 settimane (in 35). Alla compilazione del CPS è seguita un'intervista semi-strutturata con uno psicologo.

*Risultati e Conclusioni:* l'età media delle persone con SM era di 42.5 anni (deviazione standard [DS] 12), il 71% erano donne, il 65% aveva conseguito il diploma o la laurea e il 56% aveva un lavoro a tempo pieno o parziale. La durata mediana di malattia era di 13.8 anni (DS 9.0; range 0.2 - 38) e l'EDSS mediana 3.5 (range 0 - 8.5). Il 69% aveva un decorso RR, il 41% era in trattamento immunomodulante.

Il 90% delle persone con SM ha trovato lo strumento comprensibile e utile. La riproducibilità era soddisfacente (Kappa "pesato" 0.65, 95% Intervalli di Confidenza [IC] 0.49 - 0.77;  $p < 0.001$ ).

Quasi 2/3 delle persone con SM preferiva condividere con il neurologo le decisioni sulla malattia e 1/3 delegare al neurologo tali decisioni. La scolarità superiore era associata positivamente alla preferenza per un ruolo attivo/collaborativo (odds ratio [OR] 2.43, 95% IC 1.05 - 5.66;  $p < 0.04$ ), mentre la presa in carico  $>5$  anni era associata negativamente a tale preferenza (OR 0.36, 95% IC 0.14 - 0.92;  $p < 0.03$ ). Dal confronto con dati ottenuti da 109 studenti italiani e da 145 persone con SM tedesche è emersa l'influenza di fattori "culturali" alla base della preferenza di ruolo.

#### *Validazione psicometrica*

Gli strumenti QdVS si basano su un concetto multi-dimensionale dello stato di salute. La loro applicazione in popolazioni diverse ha reso pertanto necessaria la verifica delle proprietà originarie. Queste analisi, effettuate secondo i relativi protocolli di studio, hanno visto la partecipazione del borsista con la supervisione di uno statistico e del mentore.

Le principali proprietà degli strumenti che sono state verificate sono elencate di seguito:

- riproducibilità: (a) test-re-test, confrontando i punteggi forniti da un gruppo di pazienti stabili in tempi diversi; (b) tra due o più valutatori (pazienti, familiari, clinici);
- validità interna (convergenza, divergenza e consistenza interna);
- validità esterna, stimata attraverso l'associazione/correlazione con variabili cliniche e anagrafiche;
- responsività (sensibilità al cambiamento): (a) responsività "interna" indagata attraverso la stima dell'*Effect Size*; (b) responsività "esterna" determinata in base a un riferimento esterno, o "àncora", e stimata mediante diversi indicatori come *responsiveness ratio* (RR) e curve ROC (Receiver Operating Characteristic). Per un esempio si vedano i risultati della ricerca "Responsività delle misure di qualità della vita associata alla salute per la SM" (2005/R/19) riportati di seguito:

#### *Obiettivi*

Confrontare la responsività delle tre PRO maggiormente usate nella SM. Il Functional Assessment of MS (FAMS), il MS Impact Scale (MSIS-29) e il 54-item MS Quality of Life (MSQOL-54). *Disegno:* studio prospettico multicentrico longitudinale su 104 persone con SM trattate con steroidi e.v. per ricaduta. *Metodi:* informazioni cliniche-demografiche raccolte all'inclusione e dopo otto settimane. La responsività interna è stata valutata mediante "standardized response means (SRM)". La responsività esterna è stata determinata mediante curve ROC. L'àncora era costituita dal grado di miglioramento percepito dal paziente a otto settimane, valutato mediante scala Likert a cinque punti. *Risultati e Conclusioni:* complessivamente la responsività dei tre strumenti è risultata contenuta. Il grado di accordo tra medici e pazienti sul miglioramento è risultato buono (kappa 0.70, 95% IC 0.54-0.85). Le aree sotto le curve ROC differivano significativamente da 0.50 solo per il MSIS-29 e per il MSQOL-54,

dove variavano da 0.65 (95% IC 0.53-0.76) per MSIS-29 scala psicologica e 0.70 (95% IC 0.58-0.81) per MSQOL-54 superindice mentale. MSIS-29 e MSQOL-54 erano significativamente più sensibili al cambiamento del FAMS, usando sia l'ancora esterna che quella interna, e se ne raccomanda l'uso negli studi longitudinali.

Nel corso dei due anni, il borsista ha inoltre partecipato allo sviluppo dell'intervento informativo ("Sapere Migliora" CD e booklet) e delle due misure di esito primario della ricerca sperimentale SIMS-Trial ("Efficacia di un supplemento informativo strutturato per le persone con SM di nuova diagnosi (ISRCTN81072971; 2007/R/19). Le due misure di esito primario erano:

- "Multiple Sclerosis Knowledge Questionnaire" (MSKQ) - questionario che valuta la conoscenza della malattia da parte della persona con SM;
- "Comunicazione medico-paziente nella Sclerosi Multipla" - rivisto (COSM-R), questionario relativo al momento della comunicazione della diagnosi di SM e al periodo immediatamente successivo.

### **Pubblicazioni e Comunicazioni a congressi**

Giordano A, Messmer Uccelli M, Pucci E, et al. On behalf of the SIMS-Trial group. The multiple sclerosis knowledge questionnaire: a self-administered instrument for recently diagnosed patients. *Mult Scler* 2010;16:100-111.

Giordano A, Pucci E, Naldi P, et al. Responsiveness of patient-reported outcome measures in multiple sclerosis relapses: the REMS study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:1023-1028.

Giordano A, Mattarozzi K, Pucci E, et al. Participation in medical decision making: attitudes of Italians with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;275:86-91.

Solari A, Lugaresi A, Trojano M, et al. The "Sapere Migliora" information aid for newly-diagnosed multiple sclerosis patients is effective: results of the SIMS-trial (ISRCTN81072971). *Neurol Sci* 2009;30: suppl. (Abstract S43).

Solari A, Giordano A, Lugaresi A, et al. Anxiety and depression symptoms in newly-diagnosed multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 2009;30: suppl. (Abstract S243).

Solari A, Giordano A, Pucci E, et al. Development of the multiple sclerosis knowledge questionnaire. *Neurol Sci* 2009;30: suppl. (Abstract S109).

Solari A, Lugaresi A, Trojano M, et al. On behalf of the SIMS-trial group. Effectiveness of an information aid for newly-diagnosed MS patients: the SIMS-trial. *J Neurol* 2009;256: suppl 2 (Abstract S238).

Solari A, Pucci E, Martinelli V, et al. On behalf of the SIMS-trial group. Development of an information aid for newly-diagnosed MS patients. *J Neurol* 2009;256: suppl 2 (Abstract S238).

Solari A, Trojano M, Martinelli V, et al. On behalf of the SIMS-trial. Effectiveness of an information aid for newly-diagnosed MS patients: the SIMS-trial. *The International Journal of MS Care* 2009;11: suppl 2 (Abstract 73).

Messmer Uccelli M, Pucci E, Martinelli V, et al. Development of an information aid for newly-diagnosed MS patients. *The International Journal of MS Care* 2009;11: suppl 2 (Abstract 82).

Solari A, Trojano M, Martinelli V, et al. On behalf of the SIMS-trial group. Effectiveness of an information aid for newly diagnosed multiple sclerosis patients: the SIMS-trial. *The International Journal of MS Care* 2009;11(1):45-46.

Solari A, Giordano A, Mendozzi L, et al. How responsive are the three most used multiple sclerosis specific health-related quality of life measures? *Neurol Sci* 2008;29: suppl. (Abstract S106).

Giordano A. Results of the SIMS-trial. First International Conference on Patient Education in MS and RIMS special interest group meeting Patient Information. Trials on patient information in MS: past and present. Hamburg, 22-23 January 2010.

Giordano A. Efficacia del supplemento informativo "Sapere Migliora" per le persone con sclerosi multipla di nuova diagnosi (SIMS-Trial-ISRCTN81072971). Convegno del Centro Universitario di Ricerca sugli Aspetti comunicativo relazionali in medicina (C.U.R.A.), Università degli Studi di Milano. Milano, 26-28 novembre 2009.

## In corso di pubblicazione

Giordano A, Lugaresi A, Trojano M, et al. Efficacia del supplemento informativo "Sapere Migliora" per le persone con sclerosi multipla di nuova diagnosi (SIMS-trial-ISRCTN81072971). *La Cura* 2010.

## Presentati per la pubblicazione

Solari A, Mattarozzi K, Vignatelli L, et al. On behalf of the SIMS-Trial group and of the GERONIMUS group. Development and validation of a patient self-assessed questionnaire on satisfaction with communication of the multiple sclerosis diagnosis.

*Borsa di studio finanziata col bando 2007, per un periodo di 2 anni e l'ammontare di 36.000 €.  
Studio iniziato nel 2007.*



