

UNIVERSITA' DI PISA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**Dottorato in “Esplorazione molecolare, metabolica e
funzionale del sistema nervoso e degli organi di senso”**

A.A. 2006-2007

Tesi di Dottorato

**IMPIEGO DI G-CSF DOPO
MITOXANTRONE NELLA SCLEROSI
MULTIPLA SECONDARIA PROGRESSIVA**

Dottorando: Livia Pasquali

Relatore: Chiar.mo Prof. Luigi Murri

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giovanni Ronca

INDICE

Introduzione	pag. 4
-Definizione di SM	pag. 4
-Epidemiologia della SM	pag. 4
-Eziologia della SM	pag. 6
-Patogenesi della SM	pag. 11
-Clinica della SM	pag. 18
-Decorso della SM	pag. 20
-Risonanza magnetica nella SM	pag. 27
-Diagnosi di SM	pag. 28
Terapia della SM	pag. 29
-Corticosteroidi	pag. 30
-Farmaci immunomodulanti	pag. 30
-Farmaci immunosoppressori	pag. 39
G-CSF	pag. 45
Scopi dello studio	pag. 49
Materiali e Metodi	pag. 50
-Pazienti	pag. 50
-Piano di trattamento	pag. 52
Analisi statistica	pag. 53
Risultati	pag. 53

Discussione	pag. 55
Bibliografia	pag. 63
Tabelle	pag. 90
Figure	pag. 102

INTRODUZIONE

Definizione di SM

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale, in cui il danno tissutale è determinato da un processo autoimmune mediato prevalentemente dai linfociti T, con distruzione della mielina, degenerazione assonale e gliosi (Composton & Coles, 2002).

Epidemiologia della SM

Dagli studi epidemiologici sulla SM è stata evidenziata una notevole disomogeneità nella distribuzione della malattia nelle varie zone del mondo. La caratteristica emersa fin dalle prime indagini epidemiologiche è che la frequenza diminuisce con il diminuire della distanza dall'equatore.

Secondo Kurtzke possono essere individuate tre zone:

1. Zona ad alta frequenza, con una prevalenza superiore a 30/100.000 abitanti, in genere compresa tra 50 e 120/100.000, che comprende Nord Europa, parte degli Stati Uniti, Canada, Australia del sud e Nuova Zelanda. Anche l'Italia appartiene a questa zona.
2. Zona a media frequenza, con una prevalenza fra 5 e 29/100.000 abitanti, che include il Sud Europa, il bacino del Mediterraneo, le zone meridionali degli Stati Uniti e parte dell'Australia.

3. Zona a bassa frequenza, con una prevalenza inferiore a 5/100.000 abitanti, localizzata in Asia, America latina, Africa e zone prossime all'equatore (Kurtzke, 1993).

Nelle varie zone inoltre c'è una tendenza al mantenimento del gradiente frequenza-latitudine, sebbene con differenze più attenuate. Questo è stato evidenziato negli Stati Uniti (Hernan et al., 1999), in Australia (Hammond et al., 1988) ed in Europa.

Nelle regioni scandinave i tassi di incidenza e prevalenza raggiungono valori più alti, ad esempio in Norvegia si registrano valori di prevalenza da 163,6/100.000 per le donne e 122,6/100.000 per gli uomini a 105/100.000 a seconda delle zone (Dahl et al., 2004; Alstadhaug et al., 2005). In Svezia i valori oscillano intorno a 150/100.000 abitanti (Sundstrom et al., 2003) ed in Finlandia intorno a 105/100.000 (Sarasoja et al., 2004).

In Italia la prevalenza della malattia è circa di 70-80/100.000 a seconda delle zone (Ranzato et al., 2003; Ragonese et al., 2004), con punte più alte in Sardegna, di circa 150/100.000 abitanti. (Pugliatti et al., 2003).

Il Giappone, come del resto il continente asiatico, è una zona con frequenza molto bassa di malattia, con caratteristiche cliniche peculiari rispetto ai Paesi occidentali. In questo Paese è stata riportata una maggior frequenza della neuromielite ottica di Devic, una variante della SM, ed inoltre, nei casi con SM in forma classica, si repertano più raramente rispetto ai pazienti dei Paesi occidentali, bande oligoclonali di IgG nel liquor. Tuttavia, è stato

recentemente riportato come nell'area metropolitana di Tokio la forma classica della SM sia cinque volte più frequente della neuromielite ottica, a ridurre la differenza con le presentazioni cliniche più tipiche in Europa e negli Stati Uniti (Tanaka et al., 2005).

Eziologia della SM

L'eziologia della malattia è ignota, ma si ritiene attualmente che la SM sia dovuta ad un'abnorme risposta autoimmune diretta contro antigeni mielinici, in seguito ad un'infezione virale o batterica. Oltre a fattori infettivi, vi sono altri fattori ambientali e genetici considerati implicati nello sviluppo della malattia.

A) Fattori infettivi

L'ipotesi di un ruolo dei fattori infettivi nella SM deriva da indagini che riguardano popolazioni emigrate in zone a differente rischio di SM , oltre che dagli studi che hanno evidenziato possibili ondate epidemiche della malattia.

Nei casi in cui la migrazione avviene prima dei 15 anni di età, da una zona ad alta prevalenza verso una con tassi più bassi si osserva una diminuzione del rischio di malattia, che viene invece mantenuto uguale al rischio del Paese di origine per migrazioni in età successive (Alter et al., 1971; Kurtzke et al., 1985). In Islanda dopo la II guerra mondiale (Kurtzke et al., 1982) e nelle Isole Faroe nell' Atlantico settentrionale si sono verificate tre epidemie dal 1943 al 1973, di SM, dovute ad un agente eziologico che sarebbe stato

introdotta introdotta dalle truppe britanniche, che nel 1941-1942 occuparono le isole (Kurtzke et al., 1986).

Fra gli agenti infettivi sospettati come possibili fattori eziologici o quantomeno scatenanti la SM sono stati individuati, tra i virus, l'herpesvirus 6 (HHV6), ampiamente indagato perché provoca infezioni latenti e ricorrenti ed ha uno spiccato neurotropismo (Noseworthy, 1999; Lutton et al., 2004) ed il virus di Epstein Barr, che è stato associato in studi anche recenti alla SM (Barzilai et al, 2007). Fra i batteri è stata data importanza all'infezione da *Chlamidia pneumoniae*. Per nessuno di questi è stato però dimostrato un chiaro nesso patogenetico. I responsabili potrebbero essere più agenti, ubiquitari e comuni (Sospendra et al., 2005).

B) Fattori ambientali

Tra i fattori ambientali non infettivi è stato ipotizzato che l'esposizione ai raggi UV, in quanto in grado di influenzare l'attività di cellule immunoregolarie nonché la sintesi di vitamina D, abbia un ruolo nella SM. Questa ipotesi è stata formulata in base alle osservazioni che il gradiente di prevalenza di malattia dipende dalla latitudine. La forma attiva della vitamina D (1,25-(OH)₂ D₃) possiede proprietà immunomodulanti e sembra essere un regolatore fisiologico dello sviluppo delle cellule T. Sono stati dimostrati recettori per la vitamina D (VDR) a livello delle cellule ematopoietiche sia della linea mieloide che linfoide, degli astrociti, delle cellule gliali, dei neuroni e degli oligodendrociti. Questi recettori legano la

forma attiva della vitamina D e formano un complesso che regola la trascrizione genica (Spach et al., 2004). La vitamina D interviene nella regolazione dello sviluppo dei linfociti T, probabilmente influenzando la produzione di quelle citochine che sono necessarie per la maturazione in senso Th1 o Th2, ovvero determinando l'inibizione della produzione di interleuchina 12 (IL 12) (D'Ambrosio et al., 1998), che indirizza la maturazione in senso Th1 e la stimolazione della produzione di interleuchina 4 (IL-4) e fattore di crescita tumorale beta (TGF- β), che favoriscono la maturazione dei linfociti T in senso Th2 (Cantorna et al., 1998).

L'azione dell'ambiente nell'influenzare lo sviluppo della malattia è stata anche collegata alla cosiddetta "hygiene hypothesis" secondo la quale i bambini che sono esposti ad agenti infettivi solo in età più avanzata, come si verifica nei paesi più sviluppati economicamente, sarebbero più suscettibili a sviluppare allergie e malattie autoimmuni (Weiss, 2002).

C) Fattori genetici

L'importanza di fattori genetici è stata evidenziata soprattutto dagli studi di aggregazione familiare. Studi epidemiologici effettuati in famiglie con SM hanno evidenziato come in una popolazione di individui con un rischio generale di malattia dello 0,2%, il rischio sale al 3% nei parenti di primo grado e all' 1% nei parenti di secondo grado (Compston, 1997).

La presenza di un rischio ricorrente in parenti di primo, secondo e terzo grado ha portato inizialmente ad ipotizzare la presenza di uno schema di ereditarietà di tipo complesso, oligogenico (Sadovnick & Baird, 1988).

Tuttavia, studi recenti su fratelli che hanno un solo genitore in comune non sostengono l'ipotesi di questo schema di ereditarietà, in quanto il tasso di incidenza di malattia è maggiore di quanto dovrebbe essere in rapporto a quello presente in fratelli con entrambi i genitori in comune (Ebers et al. 2004). Se si considerano i bambini adottati nella prima infanzia da pazienti affetti da SM ed i parenti adottivi di pazienti con SM, in entrambi i casi non è stata dimostrata la presenza di un rischio aumentato rispetto alla popolazione generale (Ebers et al. 1995), rendendo improbabile la possibilità che un agente trasmissibile sia responsabile dell'aggregazione familiare nella SM.

I fratelli di pazienti con SM hanno un rischio di sviluppare la malattia di circa 20–40 volte rispetto alla popolazione generale e complessivamente del 3.5% (Sadovnick & Baird, 1988). Studi sui gemelli hanno dimostrato che il tasso di concordanza è di circa dieci volte e due volte superiore per i monozigoti e i dizigoti rispettivamente rispetto ai fratelli non gemelli (Willer et al. 2003). Inoltre il fatto che la presenza della malattia in un figlio sia stata messa in relazione al genitore affetto (Ebers et al. 2004) ed al periodo di nascita (Willer et al. 2005), suggerisce che la suscettibilità alla SM derivi da un'interazione complessa tra fattori genetici ed ambientali sia materni che esterni. Ulteriori evidenze sulla difficoltà a comprendere l'esatta natura

dell'ereditarietà della SM derivano dagli studi di linkage che non hanno mostrato risultati soddisfacenti (Ebers et al. 1996; Haines et al. 1996; Kuokkanen et al. 1996; Sawcer et al. 1996; Kuokkanen et al. 1997; Oturai et al. 1999; Broadley et al. 2001; Corradu et al. 2001; Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative 2001; Akesson et al. 2002; Ban et al. 2002; Goedde et al. 2002; Dyment et al. 2004; Kenealy et al. 2004).

Nell'ambito degli studi di epidemiologia genetica, sono stati valutati diversi geni che possono essere implicati nella SM, quali geni codificanti per proteine del sistema immunitario, come le citochine, le immunoglobuline, i recettori delle cellule T, gli antigeni HLA ed alcuni componenti del complemento, oltre a geni codificanti per antigeni e precursori della mielina, questi ultimi in quanto direttamente coinvolti nella SM. Ad eccezione degli antigeni del sistema HLA, gli altri geni candidati non hanno portato a significativi risultati in termini di associazione con la SM (Kenealy et al., 2003). L'associazione più forte è stata dimostrata con l'allele DR2 dell'HLA di classe II (Hauser et al., 1989), ed il suo alotipo corrispondente DRB1*1501 (Winchester et al., 1975); tuttavia il meccanismo con cui esercita un effetto sul rischio di malattia non è completamente chiaro (Hillert 1994). Benché sia stata dimostrata una forte associazione con questo alotipo non è infatti esclusa la possibilità che il reale responsabile della suscettibilità alla malattia sia o un secondo locus nella regione HLA indipendente dal DRB1*1501, che agisce come fattore che aumenta il rischio di SM o un altro

locus, non DRB1 che si trova in linkage disequilibrium con l'aplotipo DR15-DQ6 all'interno della regione HLA (Dyment et al., 1997; Ligiers et al. 2001). Tutto ciò dimostra come il ruolo del sistema HLA sulla suscettibilità di malattia sia nella SM più complesso che non la semplice presentazione dell'antigene (Dyment et al. 2004). Al fine di indagare questo aspetto sono stati effettuati numerosi studi, nel più completo e recente dei quali sono state identificate quaranta famiglie, nelle quali almeno quattro persone erano affette da SM (Willer et al., 2007). I risultati hanno dimostrato la presenza dell'allele HLA DRB1*1501 nel 70% degli affetti, senza tuttavia apportare nuovi dati, probabilmente anche in relazione alla eterogenicità del locus genico nelle varie famiglie e nell'ambito di una stessa famiglia. (Willer et al., 2007). Ad oggi non si conoscono ancora i meccanismi molecolari per cui la presenza di determinati alleli HLA conferisce suscettibilità allo sviluppo della malattia (Sospendra et al, 2005).. Certamente la selezione del repertorio di cellule T che giungono a maturazione nel timo, la loro successiva attivazione e l'innesco della risposta immunitaria sono geneticamente determinati, ed in questi processi un ruolo fondamentale è svolto dagli antigeni HLA.

Patogenesi della SM

Il meccanismo fisiopatologico più caratteristico della SM, cioè la demielinizzazione, è riconducibile sostanzialmente ad un danno delle cellule

giali che producono la mielina, mediato da una reazione immune erroneamente diretta contro epitopi condivisi dall'agente infettante e dalla mielina centrale (mimetismo molecolare) (Fujinami et al., 1985), ovvero una primitiva proliferazione di cloni autoreattivi o una continua abnorme stimolazione antigenica da parte di proteine mieliniche non riconosciute come self. La reazione autoimmune è caratterizzata dal coinvolgimento dei linfociti, con un aumentato numero dei linfociti Th1 antigene specifici (Olsson et al., 1992; Voskuhl et al., 1993; Hemmer et al., 1996) ed una riduzione delle cellule Ts (Antel & Arnason, 1979; Hafler et al., 1985), un'aumentata produzione degli anticorpi verso gli antigeni del *self* (Iglesias et al., 2001), una disregolazione delle citochine proinfiammatorie ed antiinfiammatorie, varie alterazioni nella produzione di citochine responsabili del fenotipo dei linfociti Th (Th1 e Th2) (Karp et al., 2000).

Dal punto di vista neuropatologico, l'elemento di base nella SM è rappresentato dalle placche multifocali di demielinizzazione della sostanza bianca nel sistema nervoso centrale, che possono presentarsi come attive o inattive. La placca cronica inattiva della SM è una lesione nettamente circoscritta, con ridotta componente cellulare, senza evidenza di distruzione attiva della mielina. Predomina la gliosi fibrillare, mentre la densità assonale è spesso marcatamente ridotta. Gli oligodendrociti sono fortemente diminuiti o assenti. Può tuttavia essere ancora presente un grado variabile di infiammazione, particolarmente nelle regioni perivascolari. La placca attiva

mostra invece infiltrati infiammatori costituiti da linfociti T, pochi linfociti B e plasmacellule ed un'intensa attivazione di macrofagi e microglia. Si riscontra inoltre una sovraregolazione di diverse citochine pro-infiammatorie, (interleuchina-2, interferone-gamma e fattore di necrosi tumorale alfa) prodotte dai linfociti Th1, che si riscontrano inoltre nel liquor di pazienti con malattia in fase attiva. Questo quadro anatomico patologico è simile a quello osservato nella encefalomielite allergica sperimentale autoimmune, un modello sperimentale di malattia autoimmune Th1 mediata, e modello animale di SM, che può essere indotto in animali suscettibili mediante attiva sensibilizzazione con tessuti del SNC, mielina, proteine della mielina o cellule T autoreattive (Zamvil et al., 1990; Wekerle et al., 1994).

Inoltre, gli studi di risonanza magnetica, eseguiti nelle fasi iniziali della malattia, suggeriscono come la maggior parte delle lesioni sia preceduta dalla rottura focale della barriera emato-encefalica. L'insieme di questi elementi indica che la SM rappresenta una malattia primariamente determinata dai linfociti Th1 con secondario coinvolgimento dei macrofagi e distruzione della mielina. In condizioni di integrità della barriera emato-encefalica si ha un limitato traffico di cellule T prive di specificità antigenica, che la attraversano, mediante molecole di adesione espresse sulla superficie dei linfociti e le integrine presenti sulle superfici dei vasi sanguigni. La rottura della barriera, come si verifica nella SM, può facilitare l'ingresso di cellule T potenzialmente autoreattive ed anticorpi all'interno del SNC . Una volta che

le cellule T autoreattive sono penetrate all'interno del SNC, le metalloproteasi della matrice, che degradano la matrice extracellulare e distruggono ulteriormente la barriera emato-encefalica, facilitano il passaggio di cellule immunitarie e di anticorpi secreti dai linfociti B. A seguito della formazione del complesso trimolecolare (recettore della cellula T, peptide antigenico e molecola del complesso maggiore di istocompatibilità) insieme ad altre appropriate molecole co-stimolatrici, i linfociti T si attivano a produrre diverse citochine. Le citochine possono stimolare le cellule immunitarie circostanti e la glia alla produzione di chemochine, che a loro volta possono produrre sostanze chemoattraenti, che conducono al reclutamento di altre cellule immunitarie nel SNC ed amplificazione della risposta immunitaria (Aloisi et al., 2001). Le citochine pro-infiammatorie all'interno del SNC attivano i macrofagi residenti e quelli provenienti dal sangue; si ritiene che queste cellule contribuiscano al danno tissutale ed alla demielinizzazione.

Tutte le lesioni demielinizzanti attive si osservano quindi nel contesto di uno sfondo infiammatorio, composto principalmente da linfociti T e macrofagi. A fronte della similitudine della reazione infiammatoria, a livello anatomicopatologico, le lesioni possono essere suddivise in quattro differenti patterns caratteristici di distruzione della mielina (Lucchinetti et al., 2000): I) demielinizzazione associata ai macrofagi; II) demielinizzazione associata ai macrofagi con precipitazione locale di immunoglobuline e complemento

attivato (demielinizzazione anticorpo mediata); III) demielinizzazione con primaria alterazione nei processi oligodendrocitari più distali e apoptosi degli oligodendrociti (demielinizzazione associata ad oligodendropatia distale tipo *dying-back*); IV) degenerazione primaria degli oligodendrociti nella sostanza bianca che circonda le placche con secondaria distruzione della mielina. L'identificazione di più patterns di demielinizzazione, insieme a dati genetici di suscettibilità alla malattia ed a studi di risonanza magnetica, ha suggerito che diversi pazienti o sottogruppi di malattia presentano differenti meccanismi patogenetici, convergenti sulla particolare vulnerabilità del complesso mielina/oligodendrociti a diversi mediatori immunitari e tossici. Sebbene la sclerosi multipla sia tradizionalmente considerata una patologia causata principalmente da demielinizzazione con relativo risparmio dell'assone, l'osservazione che gli assoni vanno incontro a degenerazione risale al secolo scorso, ma l'effettiva portata di questo processo è stata rivalutata ed enfatizzata solo in tempi recenti grazie all'introduzione di nuove tecniche di microscopia e di risonanza magnetica. Una delle ragioni dell'attuale interesse verso la patologia assonale nella SM deriva dal riscontro di una correlazione tra il danno assonale ed il danno neurologico irreversibile, non osservabile con altre misure cliniche o paracliniche (Matthews et al., 1998; Arnold e Matthews, 2002). Poiché il cervello presenta una sua intrinseca capacità di compensare il danno assonale, il raggiungimento di un certo grado di perdita assonale potrebbe indicare il

momento di transizione tra la fase di ricadute e remissioni e la successiva fase di progressione della malattia, con i conseguenti risvolti in ambito terapeutico. I precisi meccanismi patogenetici attraverso i quali si realizzano il danno assonale e la degenerazione neuronale nella SM non sono completamente noti, ma probabilmente diversi meccanismi, immuno-mediati e non, concorrono a realizzare il danno neurodegenerativo. I principali fattori implicati nel determinare il danno assonale sono un aumento della permeabilità dell'assolemma per disfunzione dei canali ionici, la eccitotossicità da glutammato, l'attivazione "a cascata" delle proteasi, i radicali liberi, un alterato trasporto assonale, alterazioni glia-assone, alterazioni della funzione mitocondriale. Vi sono inoltre altri fattori, cellulari, anticorpali, mediatori dell'infiammazione, trofici, nonché una inadeguata rimielinizzazione, che interagiscono con diversi meccanismi nel determinismo del danno assonale. Una perdita assonale è documentabile nelle lesioni attive della SM ed è presente già nelle fasi molto iniziali di formazione delle lesioni, quando l'infiltrato infiammatorio è prevalente. La perdita assonale può essere causata, almeno in parte, dall'attacco dei linfociti citotossici (CD8+), che sono in grado di rilasciare citochine in grado in vitro di alterare l'integrità assonale, così come in vivo nel modello sperimentale dell'encefalomielite murina, attraverso l'attivazione della perforina, una proteina citolitica in grado di creare pori nelle membrane citoplasmatiche (Huseby et al., 2001; Steinman, 2001).

Diversi mediatori aspecifici dell'inflammazione vengono rilasciati da macrofagi e microglia attivata. Tra questi il il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF alfa), le metalloproteasi di matrice ed il NO sono considerati importanti mediatori del danno assonale nella SM (Redford et al., 1997; Smith et al., 2001; Neuman et al., 2002).

Anche gli anticorpi rilasciati dalle plasmacellule dell'infiltrato infiammatorio possono contribuire al danno neuronale tramite attivazione del complemento (Mead et al., 2002). Ciò permetterebbe di opsonizzare peptidi assonali e di indirizzare l'attacco immuno-mediato che porta alla degenerazione assonale.

Oltre al ruolo fondamentale di facilitare la conduzione nervosa, la mielina serve a mantenere l'integrità assonale. In seguito alla degenerazione mielinica, anche l'assone degenera; inoltre un assone demielinizzato è più suscettibile ai danni generati da processi infiammatori ed è in generale più esposto a qualsiasi altro fattore lesivo. Tuttavia assoni degenerati in seguito a degenerazione acuta (positivi alla proteina precursore dell'amiloide, marker precoce di danno assonale) si associano a placche demielinizzate sia attive che inattive, così come a lesioni rimielinizzanti, suggerendo che il danno assonale può essere indipendente dalla rimielinizzazione. Al processo di demielinizzazione si contrappone sempre uno spontaneo processo riparativo di rimielinizzazione, sostenuto dai precursori degli oligodendrociti (OPCs). Se nella fase remittente della SM tale processo riparativo compensa il processo distruttivo demielinizzante, nelle fasi avanzate della malattia esso

diventa inadeguato ed incapace di prevalere sulla degenerazione assonale ingravescente. Ciò avviene per due possibili ragioni: una deplezione degli OPCs, che implica sopravvivenza e reclutamento cellulare inadeguati, oppure la presenza di OPCs o oligodendrociti maturi ma in numero inadeguato a produrre mielina.

Ciò che rimane da chiarire è quindi se, come alcuni ricercatori ritengono il questo processo degenerativo assonale sia del tutto indipendente dall'attività infiammatoria, e che questo più o meno lento processo sia la vera essenza della malattia, mentre le placche di demielinizzazione avrebbero un ruolo sostanzialmente irrilevante, oppure se la degenerazione assonale secondaria sia sì un processo che comincia ad essere presente in una fase precoce della malattia, ma che essa sia espressione di una conseguenza tardiva dell'insulto infiammatorio. In base alla seconda ipotesi, l'insulto infiammatorio comporterebbe la perdita del supporto trofico all'assone per esaurimento dei processi di rimielinizzazione e per la ridotta produzione di energia dovuta al mal funzionamento dei mitocondri.

Clinica della SM

Anche se i segni ed i sintomi della SM sono del tutto imprevedibili, esistono pattern clinici più frequenti; questi quadri riflettono la maggior ricorrenza delle lesioni in particolari regioni della sostanza bianca. La maggior parte dei pazienti presenta un esordio brusco con successive ricadute e remissioni.

Solo una minoranza presenta un rapido peggioramento clinico. Il deterioramento è in genere lento ed avviene con ricadute non seguite da pieno recupero funzionale, con conseguente disabilità. Il progredire della malattia è il risultato di due meccanismi, da un lato un peggioramento a gradini causato dall'incompleto recupero dalle lesioni acute, dall'altro da un lento e graduale peggioramento che caratterizza le forme progressive.

Le manifestazioni più comuni comprendono disturbi della sensibilità, disturbi motori, cerebellari, bulbari ed autonomici. Alcune manifestazioni cliniche sono patognomoniche: tremore, nistagmo e parola scandita sono i tre sintomi che danno luogo alla triade di Charcot; la oftalmoplegia internucleare in un soggetto adulto è fortemente suggestiva di SM. Spesso gli attacchi iniziali sono dovuti ad un coinvolgimento delle vie sensitive del midollo spinale, che determina sensazioni disestesiche o parestesiche ai piedi, che dopo qualche giorno tendono a salire o a determinare un vero e proprio livello di sensibilità. L'interessamento del nervo ottico, sotto forma di neurite ottica o retrobulbare costituisce un altro evento frequente; quest'ultimo può anche rimanere un evento isolato, ma la concomitanza di altre lesioni alla risonanza magnetica nucleare è patognomonica di SM. I soggetti che presentano segni o sintomi singoli o multipli svilupperanno verosimilmente una sclerosi multipla recidivante remittente, mentre quelli che presentano mielopatia o disfunzione cerebellare andranno incontro a forme progressive di SM.

Decorso della SM

La SM ha un decorso variabile e spesso imprevedibile. Tra le forme cliniche si possono identificare quattro forme di malattia:

- 1) Recidivante-remittente (SM-RR) caratterizzata da ricadute clinicamente evidenti seguite da completo recupero o deficit residui dopo la risoluzione della crisi. Durante i periodi intercritici non vi è alcuna progressione di malattia.
- 2) Primariamente progressiva (SM-PP), in cui la progressione della malattia è *ab inizio*. I *plateau* sono occasionali e temporanei; sono possibili solo minimi miglioramenti. Questi pazienti non mostrano riesacerbazioni acute.
- 3) Secondariamente progressiva (SM-SP) caratterizzata da continua progressione della malattia dopo un periodo di tempo descrivibile come recidivante-remittente con o senza sovrapposizione di ricadute, remissioni o *plateau*.
- 4) Progressiva con ricadute (SM-PR) in cui la malattia è progressiva *ab inizio* ma con chiare esacerbazioni acute seguite o meno da completo recupero di *functio laesa*.

La SM-RR è la forma più frequente di SM , essendo presente nell'85% dei casi. Essa è caratterizzata dalla presenza di ricadute chiaramente definite con recupero completo o con sequele e deficit residuo. I periodi tra le ricadute di

malattia sono caratterizzati da assenza di progressione (Lublin et al., 1996). Gli attacchi sono quindi acuti, successivi e ben delimitati nel tempo, durante i quali compaiono nuovi sintomi o si riacutizzano sintomi già esistenti, intervallati da periodi di remissione.

Una metà dei soggetti con forma RR sviluppa una forma SP dopo circa 10 anni dall'esordio. Si può quindi affermare che l'evoluzione della malattia è caratterizzata da un'estrema variabilità individuale per la possibile diversa combinazione nel tempo di recidive, remissioni e progressione.

La SM-RR ha inizio in genere nella seconda o terza decade di vita ed è più frequente nel sesso femminile, con un rapporto femmine-maschi di 2:1. In genere i sintomi evolvono in un periodo di alcuni giorni, si stabilizzano e successivamente recedono nel giro di alcune settimane, spontaneamente o in risposta alla terapia corticosteroidea (Nosworthy et al., 2000). Gli episodi di disfunzione neurologica avvengono ad un intervallo di tempo variabile, inizialmente con la media di uno all'anno, diminuendo stabilmente in seguito (Compston & Coles, 2002). Alcuni fattori sono stati analizzati come possibili scatenanti degli episodi, tra questi le infezioni virali delle prime vie aeree o del tratto gastrointestinale, che nel 10% dei casi sono seguite da ricadute (Compston, Coles, 2002). Le vaccinazioni invece non sembrano aumentare il rischio di ricadute nei pazienti (Confavreux et al., 2001). Durante la gravidanza si registra una diminuzione nella frequenza di ricadute, in particolare nel terzo trimestre, ed un aumento nei primi tre mesi dopo il parto.

Questo effetto è stato messo in relazione col fatto che l'unità feto-placentare produce citochine, che riducono l'immunità cellulare della madre, mentre il puerperio potrebbe invece essere associato con un'inversione di questo bilancio di citochine (Confavreux et al., 1998).

L'eccessiva esposizione al calore, ed in particolare bagni molto caldi possono scatenare nuovi attacchi (Fernandez, 2002).

I pazienti affetti da SM tollerano meno i sintomi quando sottoposti a situazioni stressanti, ma i fattori psicologici in generale non influiscono sull'attività di malattia (Compston e Coles, 2002).

Alcune variabili che caratterizzano le prime fasi di malattia nella forma recidivante-remittente influenzano il periodo di tempo che intercorre tra l'esordio della SM e l'inizio della fase di disabilità irreversibile. La malattia sembra avere, per lo meno nella prime fasi, un decorso più favorevole nel sesso femminile, nei pazienti di più giovane età, in coloro che mostrano un completo recupero dopo il primo attacco e nei pazienti con un intervallo maggiore tra il primo ed il secondo episodio. Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche iniziali, la neurite ottica sembra essere indicativa di prognosi più favorevole, al contrario dei casi che presentano una disfunzione isolata delle vie lunghe, mentre in pazienti con una isolata disfunzione del tronco encefalico i risultati sono intermedi. Quando però il paziente raggiunge un grado di disabilità tale da limitare la deambulazione a 500 metri

senza aiuto o riposo, queste variabili non influenzano più il decorso della malattia (Confavreux et al., 2003).

Il grado di disabilità nella SM viene convenzionalmente quantificato attraverso l'utilizzo della scala EDSS (Kurtze Expanded Disability Status Scale), che comprende valori da zero (assenza di disfunzioni all'esame neurologico) a dieci (morte per SM). Per assegnare il paziente ad un determinato punteggio è necessario valutare, mediante l'esame obiettivo neurologico, vari sistemi funzionali, tra cui il sistema piramidale, cerebellare, sensitivo, il tronco encefalico, le funzioni vescicale ed intestinale, le funzioni visive e mentali e, a seconda del coinvolgimento, ad ognuno di questi viene associato un valore numerico, considerando l'assenza di interessamento patologico pari a zero. I valori così ottenuti permettono di assegnare al paziente il punteggio della scala EDSS. C'è da considerare inoltre che a partire dal livello 4 della EDSS viene specificamente valutata la capacità di deambulazione, se la deambulazione è eseguita autonomamente o con necessità di riposo o appoggio e la distanza per la quale può essere mantenuta. A partire dal livello 7 della EDSS sono compresi pazienti costretti sulla sedia a rotelle; un punteggio di 8,5 è assegnato a pazienti allettati per la maggior parte del giorno (Kurtzke, 1983).

La SM sembra pertanto essere caratterizzata da un decorso in due fasi, in cui il primo periodo, di durata variabile, è influenzato dalle caratteristiche cliniche di presentazione, mentre il secondo periodo non è modificato dai

sintomi e segni e dal decorso nelle prime fasi di malattia. Questo indica che quando è stata raggiunta una soglia di disabilità irreversibile, la patologia entra in una via finale comune in cui la successiva progressione procede indipendentemente dalla storia clinica precedente. Inoltre c'è da considerare che l'accumulo progressivo di disabilità, dopo che il paziente ha raggiunto il punteggio EDSS di 4, si sviluppa nella fase secondariamente progressiva della malattia (Confavreux et al., 2000; Confavreux et al., 2003).

Per quanto riguarda la prognosi, nella forma RR i principali indicatori del decorso della malattia sono rappresentati dalla frequenza e dalla gravità delle ricadute, nonché dalla capacità di recuperare dagli attacchi. Circa il 20% dei casi di RR rientra tra le forme benigne nelle quali, anche dopo oltre 20 anni la disabilità risulta quasi assente; due terzi circa dei casi entro i 50 anni ha già accumulato una disabilità significativa per la presenza di difficoltà del cammino, sensazione di fatica e disturbi cognitivi. Nelle fasi avanzate di malattia gli attacchi diventano rari, per cui il peggioramento clinico non può più essere attribuito agli effetti acuti dell'infiammazione. L'accumulo di disabilità che caratterizza questa fase è dovuto ad una lenta e progressiva degenerazione degli assoni.

Nei casi in cui si assiste ad una lenta progressione dei sintomi e si parla di forma progressiva.

In circa il 20% dei casi la malattia si presenta nella forma progressiva primaria, nella quale si assiste ad un graduale declino funzionale fin dall'esordio (Noseworthy et al., 2000).

L'età media di esordio di questa forma è 38,5 anni, circa dieci anni più tardi rispetto alla forma recidivante-remittante. Se però vengono comparate le età medie di esordio della fase progressiva della malattia nei pazienti con PP-SM e SP-SM, si può osservare una coincidenza di queste, cioè sembra che la malattia cominci la sua fase progressiva ad un'età di circa quarant'anni.

Per quel che riguarda la frequenza nei due sessi, i maschi hanno un'età di picco dell'esordio di 30-35 anni, mentre per le donne si sale a 40-45 anni. In generale il rapporto femmine:maschi affetti è di 1,3:1, se però si considerano le forme con età di esordio più avanzata, il rapporto fra i sessi raggiunge 2:1 a favore delle femmine, come si osserva anche tipicamente nella forma RR.

I fattori prognostici che sono risultati indicativi nella SM con questo fenotipo clinico sono il grado di disabilità precoce ed il numero di sistemi funzionali (motore, sensitivo, cerebellare ed altri) coinvolti a partire dall'esordio. E' stata osservata una peggiore prognosi a lungo termine nei pazienti che raggiungono una disabilità con EDSS di 3 in un tempo inferiore ai due anni, rispetto ai pazienti con un decorso clinico più lento. Inoltre nei pazienti che già dall'esordio presentano tre o più sistemi coinvolti, la progressione verso un grado di disabilità severa è più rapido (Cottrel et al., 1999 ; Ebers, 2004).

La forma SP si ha in seguito alla forma RR in circa il 50% dei pazienti ad una distanza di tempo di circa dieci anni dall'esordio di malattia (Fernandez, 2002). La SM-SP è caratterizzata da segni persistenti di deficit neurologici, con aumento continuo della disabilità.

Confrontando il decorso clinico delle due forme progressive di SM, è stato evidenziato che se le curve di sopravvivenza vengono considerate a partire dall'inizio della fase di progressione della malattia, la differenza tra PP-SM e SP-SM è molto lieve.

Esistono anche differenze paracliniche tra le forme progressive; studi effettuati con risonanza magnetica nucleare (RMN) seriata (esami mensili per 6 mesi) hanno dimostrato un numero maggiore di lesioni, più grandi e con maggiore tendenza alla confluenza, nei pazienti con forma SP di malattia (Thompson et al., 1991).

L'aspettativa di vita dei pazienti affetti da SM è solo lievemente diminuita rispetto alla popolazione generale, di circa cinque-sette anni (Ebers, 2001).

Una delle caratteristiche della SM è quindi l'estrema variabilità nell'evoluzione finale tra i diversi pazienti, che si estende da casi cosiddetti benigni in cui i pazienti rimangono pienamente funzionali in tutti i sistemi neurologici dopo 15 anni dall'esordio della malattia (Lublin et al, 1996), a forme maligne, in cui la malattia ha un decorso rapido e progressivo, che porta ad una significativa disabilità in molteplici sistemi neurologici o a morte in un tempo relativamente breve dall'esordio (Lublin et al., 1996).

Risonanza magnetica nella SM

Con la risonanza magnetica (RMN) è possibile visualizzare le lesioni tipiche della SM. In pazienti con SM-RR e SM-SP, l'attività di malattia viene evidenziata da cinque a dieci volte più frequentemente con la RMN che con la valutazione clinica (McDonald, 1994). Le nuove lesioni che compaiono nella sostanza bianca sono quasi sempre evidenziate da un'area nodulare di aumento di contrasto in seguito a somministrazione di gadolinio nelle immagini T1 pesate. Questo è quasi invariabilmente associato ad una lesione iperintensa, nella stessa localizzazione, nella sequenze pesate in T2. Circa il 65% delle aree di aumentato contrasto di maggiori dimensioni corrispondono a lesioni ipointense visualizzate in sequenze T1 pesate senza mezzo di contrasto. Nella maggior parte delle lesioni che captano il gadolinio, l'aumento di contrasto si affievolisce e scompare in circa 4-6 settimane ed il 50% delle aree ipointense si risolve spontaneamente entro 4 settimane. Una simile proporzione di quelle ancora visibili dopo un mese scompare nei successivi 4-5 mesi. Il ritorno alla isointensità o ad una lieve ipointensità nelle sequenze T1 pesate può indicare una rimielinizzazione estesa o parziale. L'estensione delle nuove lesioni T2 iperintense in genere diminuisce, l'intensità si riduce progressivamente con la risoluzione dell'edema ed avviene la riparazione del tessuto danneggiato. Tuttavia la maggior parte delle lesioni, una volta visualizzate nelle sequenze pesate in T2, raramente scompare. Inoltre, fin dalle prime fasi della SM, è evidenziabile un certo

grado di atrofia del tessuto nervoso, sebbene questo fenomeno sia progressivo ed aumenta col decorso della malattia (Bakshi et al., 2005).

Diagnosi di SM

Una caratteristica fondamentale della SM è che le lesioni si presentano disseminate nello spazio, ovvero colpiscono siti anatomici differenti, e nel tempo. Ottenere una evidenza oggettiva di disseminazione nello spazio e nel tempo è essenziale per poter porre una diagnosi sicura. Quindi nella valutazione del paziente è essenziale considerare il numero di “attacchi”, cioè gli episodi di deficit neurologico della durata di almeno 24 ore, separati tra loro da almeno 30 giorni, e l’evidenza clinica oggettiva della presenza di lesioni in siti anatomici diversi. Oltre all’obiettività clinica, anche la RMN può essere utilizzata per dimostrare la tipica disseminazione nello spazio. La RMN permette infatti di evidenziare la presenza di più lesioni nelle sequenze T2 pesate, in sedi anatomiche tipiche, e di lesioni captanti il mezzo di contrasto, oltre a mostrare la disseminazione nel tempo, in base ad immagini ottenute a distanza dal primo episodio clinico.

L’esame del liquor permette di identificare la natura infiammatoria del processo patologico, ed il reperto tipico, riscontrabile nel 90% dei casi, è la presenza di bande oligoclonali di IgG, diverse da bande eventualmente presenti nel siero, con linfociti inferiori a 50/ml.

Nell'analisi dei potenziali evocati visivi (PEV) il reperto tipico della SM, compatibile con un'area di demielinizzazione, è l'aumento della latenza, ma con forma dell'onda conservata; questo tipo di indagine può essere utilizzato per dimostrare una ulteriore lesione, quindi il criterio di disseminazione nello spazio. Nella forma primariamente progressiva della malattia l'esordio è insidioso, con un deficit neurologico progressivo in assenza dei tipici attacchi. In questo caso sono fondamentali: l'analisi del liquor per dimostrare che la patologia è di tipo infiammatorio, la dimostrazione della disseminazione nello spazio, per mezzo della RMN e dei PEV e la disseminazione nel tempo, che in questo caso può essere costituita da una progressione continua per un anno (Mc Donald et al., 2001).

Terapia della SM

Nella SM i trattamenti farmacologici variano a seconda della fase e del decorso di malattia: cortisonici ad alto dosaggio (boli di metilprednisolone) durante l'episodio acuto, farmaci immunomodulanti (interferone- β , copolimero-1) ed immunosoppressori (mitoxantrone) nella forma RR, al fine di prevenire le ricadute e rallentare la progressione. I farmaci immunomodulanti invece non mostrano in genere efficacia nella forma SP senza ricadute, dove trovano invece indicazione gli immunosoppressori, in particolare il mitoxantrone (MIT).

Corticosteroidi

I corticosteroidi sono il farmaco principale per un trattamento sintomatico durante le fasi di ricaduta nella SM (Calabresi, 2004). In particolare il metilprednisolone, in genere somministrato per via endovenosa a dosi di 500-1000 mg al giorno per 3-5 giorni, rende più rapido il recupero dopo l'attacco acuto (Zivadinov, 2005). I corticosteroidi sembrano in grado di ridurre la durata dell'episodio acuto e la morbilità a breve termine, ma non i successivi deficit permanenti (Compston & Coles, 2002). Tali farmaci esplicano il loro effetto a vari livelli: diminuiscono la migrazione di linfociti T autoreattivi e la risposta di questi agli antigeni, riducono l'espressione di molecole di adesione sia a livello delle cellule endoteliali che sui monoliti; riducono la produzione di citochine proinfiammatorie e la secrezione di metalloproteasi nel sito di infiammazione. Inoltre sembrano efficaci nella riparazione della barriera ematoencefalica, che è alterata nella sede di formazione delle placche (Pozzilli et al., 2004).

Farmaci immunomodulanti

L' interferon β -1b (INF β -1b) (BETAFERON[®]) ad un dosaggio di 8 milioni di unità (8 MIU) per via sottocutanea, a giorni alterni (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1995), l' interferon β -1a (INF β -1a) (AVONEX[®]) 30 μ g intramuscolo una volta a settimana (Jacobs et al., 1996) e l' interferon β -1a (REBIF[®]) a dosi di 22 o 44 μ g sottocute tre volte alla settimana

(PRISMS Study Group, 1998) sono efficaci nel ridurre la frequenza di ricadute di circa il 30% nella SM-RR. Durante il trattamento sembrano inoltre in grado di rallentare anche la progressione della malattia come evidenziato tramite RMN.

L'interferon beta (INF β) è una proteina di 166 aminoacidi, appartenente al gruppo delle citochine, prodotta dai fibroblasti, dalle cellule epiteliali e dai macrofagi in risposta ad infezioni virali, batteriche o protozoarie. Inoltre i linfociti T secernono IFN- β in risposta alla interleuchina 2 (IL-2), mentre i macrofagi secondariamente alla stimolazione con interleuchina 1 (IL-1) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) (Prieto et al., 2003). L'azione fisiologica della molecola è di tipo antivirale e antinfiammatorio, oltre che immunomodulante (Dhib-Jalbut, 2002). La proteina si lega al proprio recettore sulla superficie cellulare ed induce una cascata di eventi intracellulari che portano alla trascrizione di specifici prodotti genici ed alla produzione di proteine dalle proprietà antinfiammatorie, antivirali ed immunomodulanti.

L'INF β -1a viene sintetizzato con tecniche di ingegneria genetica in cellule di mammifero, utilizzando la sequenza del gene naturale (Stuart et al., 2004).

L'INF β -1b viene invece prodotto in cellule di *Escherichia Coli* e la molecola che ne deriva è una proteina non glicosilata, con la sostituzione di una serina al posto di una cisteina in posizione 17 della catena, in cui è inoltre eliminata una metionina terminale (Prieto et al., 2003).

Il meccanismo d'azione principale, responsabile dell'efficacia terapeutica dell' IFN- β nella SM non è ancora noto con certezza. Non c'è evidenza clinica che l'interferon beta sia in grado di penetrare a livello del sistema nervoso (Dhib-Jalbut, 2002), quindi la sua azione modulante sul sistema immunitario avverrebbe a livello periferico. L'IFN- β inibisce la proliferazione dei linfociti T e la produzione da parte loro di interferone gamma (IFN- γ), citochina proinfiammatoria, che attiva le cellule della linea monocito-macrofagica ed aumenta l' espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali, fenomeno necessario per la traslocazione dei linfociti T autoreattivi nel sistema nervoso centrale (Yong et al., 1998).

Un altro effetto dell'INF β consiste nella riduzione dell'attivazione dei linfociti T mediante l'inibizione della presentazione dell'antigene da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). Per l'attivazione delle cellule T è necessario in primo luogo il legame tra le molecole HLA di classe II sulle APC ed il recettore per l'antigene sui linfociti T (TcR); inoltre è fondamentale l'interazione tra molecole costimolatorie presenti sulle due cellule, come B7-CD28 e CD40-CD40L. L' IFN- β riduce sia l'espressione delle molecole HLA che delle molecole costimolatorie (Yong et al., 1998; Dhib-Jalbut, 2002).

L'IFN- β sembra inoltre favorire la risposta antinfiammatoria di tipo Th2 (Dhib-Jalbut, 2002), azione importante nella SM in quanto nelle lesioni

infiammatorie in tale patologia è presente una risposta Th1 mediata, con produzione di citochine ad azione proinfiammatoria.

L'IFN- β è anche in grado di ridurre la diapedesi dei linfociti T nel sistema nervoso attraverso la barriera ematoencefalica, determinando la diminuzione dell'espressione di molecole di adesione a livello delle cellule endoteliali e la produzione di metalloproteasi della matrice. L'attività di queste ultime, prodotte dai linfociti T, determina infatti la degradazione della membrana basale e danneggia la barriera ematoencefalica (Yong et al., 1998).

Un'altra molecola che appartiene, come gli interferoni, alla categoria degli immunomodulanti, e che trova indicazione nella SM, è il glatiramer acetato o copolimero-1 (COPAXONE[®]). Se somministrato alla dose di 20 mg per via sottocutanea, quotidianamente, si è dimostrato efficace nel ridurre la frequenza delle ricadute nella SM-RR (Johnson et al., 1995).

Il glatiramer acetato o copolimero-1 è un peptide sintetico formato da quattro aminoacidi, presenti anche nella struttura della proteina basica della mielina (MBP), un antigene coinvolto nella risposta autoimmunitaria nella SM. Il glatiramer acetato è stato originariamente sintetizzato al fine di indurre nel modello animale di SM, l'encefalite allergica sperimentale (EAE), la malattia, ma viceversa si è dimostrato in grado di prevenirne lo sviluppo. Il copolimero-1 influenza il sistema immunitario con vari meccanismi. In primo luogo ha la capacità di inibire l'attivazione dei linfociti T reattivi contro la MBP, inoltre stimolerebbe l'induzione di cellule Th2 antinfiammatorie. Un

altro meccanismo con cui agirebbe il glatiramer acetato nella SM è favorendo la penetrazione dei i linfociti T reattivi diretti verso la molecola stessa nel sistema nervoso centrale. Tali linfociti quindi cross-reagirebbero con antigeni mielinici e verrebbero indotti a produrre una serie di citochine antinfiammatorie (Dhib-Jalbut, 2002).

Le molecole di IFN- β e glatiramer acetato possono provocare la formazione di anticorpi, leganti o neutralizzanti, che sono in grado di bloccare l'attività biologica del peptide (Vartanian et al., 2004).

L' IFN- β 1b è più immunogeno dell' IFN- β 1a. Ciò può essere dovuto al fatto che l' IFN- β 1a è identico alla proteina naturale mentre l'IFN- β 1b ha una sequenza lievemente differente, non è glicosilato e può quindi presentare una diversa struttura terziaria e quaternaria (Giovannoni, 2003). In seguito alla produzione di questi anticorpi può diminuire l'efficacia terapeutica dei farmaci. In genere vengono prodotti in un intervallo di tempo variabile da tre a diciotto mesi dopo l'inizio del trattamento, ma la diminuzione dell'efficacia clinica della terapia si rende evidente dopo diciotto mesi e si manifesta inizialmente con un aumento della frequenza di ricadute e del carico lesionale visibile alla RMN (Vartanian et al., 2004).

Gli studi che sono stati effettuati con questi farmaci non hanno tuttavia dimostrato un effetto a lungo termine nella malattia, che comprende un periodo di diverse decadi (O' Connor, 2002).

La terapia con questi agenti è a lungo termine, e, sebbene generalmente siano ben tollerati, possono verificarsi vari effetti collaterali, alcuni tali da dover sospendere la terapia.

Per quanto riguarda la terapia con $\text{INF}\beta$, l'effetto collaterale più frequente è la comparsa di una sintomatologia simil-influenzale, che si verifica in circa il 60% dei pazienti, ed è caratterizzata da una combinazione di sintomi quali febbre, mal di testa, stanchezza, brividi e malessere. Tale sintomatologia compare tra due e sei ore dall'iniezione e recede nell'arco di ventiquattro ore. Per prevenire queste manifestazioni è comunemente consigliata l'assunzione di farmaci antinfiammatori non steroidei prima dell'iniezione ed eventualmente in seguito. Nel caso di somministrazione per via sottocutanea si possono osservare reazioni nella sede di iniezione, che vanno da eritema e dolore fino ai casi più rari di necrosi cutanea, che deve essere trattata tempestivamente con terapia antibiotica ed eventualmente necessita l'interruzione della terapia o il passaggio alla somministrazione intramuscolare. Il trattamento con $\text{IFN-}\beta$ può essere responsabile della comparsa di una sintomatologia di tipo depressivo o accentuarne la gravità in pazienti già affetti. Inoltre si possono verificare alterazioni, generalmente lievi, dei parametri ematochimici ed ematologici con leucopenia, neutropenia, linfopenia ed aumento delle transaminasi epatiche.

Altri tipi di effetti collaterali possono essere cefalea e mialgia, che in genere accompagnano la sindrome simil-influenzale, ed alopecia, che è una

manifestazione piuttosto rara (4% dei pazienti) ed ha tipicamente un carattere ciclico. Esistono inoltre una serie di effetti avversi di maggiore gravità, come epatite, insufficienza epatica, leucemia mieloide cronica ed anormalità della funzione tiroidea, compreso il morbo di Graves (Langer-Gould et al., 2004). Gli effetti collaterali più comuni del glatiramer acetato sono reazioni nel sito di iniezione, reazioni sistemiche in seguito alla somministrazione, dolore toracico e linfadenopatia. Le reazioni nella sede di iniezione comprendono eritema, infiammazione, indurimento e dolore. Si può anche manifestare lipoatrofia, dovuta ad un deterioramento delle cellule adipose sottocutanee, che si evidenzia come una lieve depressione cutanea. Immediatamente dopo la somministrazione, in circa il 10% dei pazienti, si manifestano reazioni sistemiche, caratterizzate da arrossamento (flushing) vasodilatazione, dolore toracico, palpitazioni, ansietà, dispnea, senso di costrizione alla gola ed orticaria. Questi sintomi possono durare da trenta secondi a mezz'ora, ma recedono spontaneamente e non richiedono trattamento. Dolore o senso di costrizione toracica transitori si verificano in circa il 20-25% dei pazienti, ma non sono associati ad eventi ischemici cardiaci, come dimostrato da registrazioni ECG. Dal 12 al 33% dei pazienti presenta linfadenopatia, non dolorosa, in genere a localizzazione inguinale ma che può anche essere generalizzata e si manifesta in genere dopo vari mesi di trattamento. Di fronte a questa evenienza è indicata una sospensione del trattamento con l'esecuzione di esami ematici specifici per accertare che l'ipertrofia

linfonodale sia causata al farmaco e non da una neoplasia ematologica (Langer-Gould et al., 2004).

Sebbene la terapia con IFN- β riduca la frequenza di ricadute di circa il 30%, non tutti i pazienti rispondono in maniera ottimale (Waubant et al., 2003).

Per identificare quali pazienti non rispondono alla terapia possono essere considerati, dopo un periodo di almeno sei-dodici mesi dall'inizio del trattamento, alcuni parametri. In primo luogo il decorso clinico, ed in particolare il numero di ricadute all'anno e la loro frequenza rispetto al periodo precedente alla terapia, ed in particolare le ricadute coinvolgenti più sistemi neurologici e quelle seguite da incompleto recupero funzionale. Inoltre, il giudizio soggettivo sia del medico che del paziente nell'identificare un lieve peggioramento in funzioni che coinvolgono le attività quotidiane, anche se non obiettivabile con cambiamenti nell'esame clinico, nonché eventuali alterazioni rivelate dalla RMN ed indicative di una persistente attività di malattia. Tra queste hanno importanza il carico lesionale nelle sequenze T2 pesate, la frequenza e l'entità di lesioni captanti il mezzo di contrasto (Cohen et al., 2004).

Per quanto riguarda la terapia con IFN- β nella forma SP della malattia, i risultati degli studi clinici sono stati contrastanti.

Nello studio europeo sull' IFN- β 1b nella SM-SP (European Study Group on Interferon β 1-b in Secondary Progressive MS, 1998) il farmaco si è dimostrato efficace nel diminuire la frequenza di ricadute, la progressione

della disabilità e le misure di attività di malattia alla RMN. Questi risultati non sono stati però replicati in un successivo studio condotto negli Stati Uniti (Goodkin et al., 2000) e neanche nello studio SPECTRIMS (Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-beta-1a in MS Study Group, 2001), in cui il trattamento era costituito dall' IFN- β 1a.

La differenza più importante tra questi studi consiste nella popolazione di pazienti selezionata, perchè nello studio europeo i soggetti avevano una malattia di più breve durata, erano più giovani ed il 70% aveva presentato ricadute nei due anni precedenti all'inizio dello studio, fattori indicativi di uno stadio di malattia con notevole attività infiammatoria. Al contrario i pazienti coinvolti negli studi statunitense e SPECTRIMS presentavano una malattia di più lunga durata, erano più anziani ed avevano una bassa frequenza di ricadute nel periodo precedente allo studio. Questi dati sembrano indicare che la maggior efficacia della terapia con INF β si possa ottenere in quei casi che presentano una componente di infiammazione attiva nella malattia. La fase SP della SM sembra essere dominata principalmente da fenomeni neurodegenerativi, fatto che spiegherebbe la minor efficacia di un intervento terapeutico teso alla modulazione del sistema immunitario quale è appunto la terapia con IFN- β .

Farmaci immunosoppressori

Nei pazienti con SM-RR che presentano una scarsa risposta al trattamento con IFN- β o glatiramer acetato, possono essere considerate altre opzioni terapeutiche (Jeffery, 2004 ; Rizvi et al., 2004 ; Stuart et al., 2004). Gli immunosoppressori trovano inoltre indicazione nella SM-SP. Farmaci immunosoppressori quali il metotrexate, l'azatioprina e la ciclofosfamide sono stati studiati in combinazione con l' IFN- β ed hanno mostrato un miglior controllo dell'attività di malattia (Jeffery, 2004). L'efficacia di tali terapie però è stata riportata solo in piccoli studi pilota (Stuart et al., 2004) e questi farmaci non sono specificamente indicati ed approvati per la terapia della SM. L'unico farmaco immunosoppressore approvato nel 2000 negli Stati Uniti D'America ed in Europa per il trattamento della SM-SP, SM-RR in fase di peggioramento, o SM-SP con ricadute progressive, al fine di ridurre la disabilità neurologica e/o la frequenza delle ricadute cliniche è il mitoxantrone (Edan & Morrissey).

Mitoxantrone

Il MIT è un agente antineoplastico, sintetizzato nel 1979 e sviluppato come analogo del farmaco citotossico doxorubicina, dotato di minor cardiotossicità.

Studi clinici hanno dimostrato come il MIT sia capace di ridurre il numero di ricadute, di determinare una stabilizzazione o un miglioramento del quadro clinico ed una riduzione del numero di lesioni captanti gadolinio in pazienti con SM-RR o SM-SP (Edan et al., 1997; Krapf et al., 1998; Hartung et al., 2002; Goodin et al., 2003). Anche nei modelli pre-clinici, di SM, come l'encefalomielite allergica sperimentale, la somministrazione di MIT inibisce e ritarda la comparsa di manifestazioni patologiche in forma acuta e recidivante-remittente (Lublin et al., 1987).

Meccanismo d'azione

Il MIT è un composto antracenicico la cui struttura somiglia a quella del nucleo antraciclinico della doxorubicina e della daunorubicina. Si lega al DNA producendo rottura dei filamenti ed inibizione della biosintesi sia di DNA che di RNA (Katzung, 2000). Gli enzimi topoisomerasi I e II interagiscono col DNA nei processi di trascrizione, replicazione e ricombinazione, alterano la conformazione del DNA producendo delle rotture transitorie a singolo (topoisomerasi I) o doppio (topoisomerasi II) filamento. Inoltre catalizzano la riparazione della rottura del DNA. Il mitoxantrone è un inibitore della topoisomerasi II, agisce provocando rotture nel DNA perchè induce la formazione di un complesso terziario DNA-farmaco-topoisomerasi II. Il farmaco, intercalato nel doppio filamento di DNA, oltre ad inibire la topoisomerasi II, danneggia i filamenti, in quanto capace di generare radicali

liberi e gruppi nucleofili che alchilano il DNA. (Clementi-Fumagalli, 2001). Il MIT quindi provoca il blocco della mitosi ed impedisce la proliferazione cellulare; inoltre può indurre l'apoptosi nelle cellule bersaglio (Bhalla et al., 1993). Usato come agente chemioterapico, il MIT è citotossico per le cellule tumorali, tuttavia nel trattamento della SM il farmaco provoca la morte di cellule normali, che svolgono deleterie funzioni autoimmuni (Fox, 2004).

Il MIT è dotato sia di attività immunosoppressiva che immunomodulante. (Neuhaus et al., 2004). L'attività immunosoppressiva si attua sia sulla componente cellulare che su quella umorale del sistema immunitario, attraverso l'inibizione delle cellule Th, l'incremento dell'attività delle cellule Ts (Fidler et al., 1985), l'inibizione dell'attività demielinizzante da parte dei macrofagi (Watson et al., 1991), ma anche la soppressione di funzioni proprie dei linfociti B, quali la presentazione dell'antigene (Neuhaus et al., 2004), la demielinizzazione mediata da anticorpi e la mielinolisi mediata dal complemento (Fidler et al., 1986 ; Watson et al., 1991).

Effetti collaterali

Gli effetti collaterali che si riscontrano in più del 10% dei casi sono: nausea, alopecia, infezioni, disturbi mestruali, stomatite, amenorrea, leucopenia, aritmie, aumento delle gamma-glutamiltanspeptidasi (γ -GT). Gli effetti

indesiderati che si riscontrano in una percentuale che va dall'1 al 10% dei casi sono: anomalie urinarie, elettrocardiografiche, costipazione, rinite, granulocitopenia, diarrea, leucopenia, anemia.

Ai dosaggi comunemente usati è tuttavia prevedibile la comparsa di leucopenia, raramente fino a valori inferiori a 1000 elementi/ml. La leucopenia è solitamente transitoria, raggiunge il nadir verso il decimo giorno, per poi tornare ai valori normali intorno al ventesimo giorno. Può verificarsi trombocitopenia e, con minore frequenza, anemia.

In alcuni casi si può avere una colorazione blu delle sclere, delle vene, del tessuto perivenoso e delle unghie. Nella zona di iniezione si può inoltre verificare una flebite. Nausea e vomito sono riscontrati raramente e comunque, nella maggior parte dei casi in forma lieve e transitoria. Possono comparire sintomi a carico del sistema nervoso, tra cui sonnolenza, confusione, ansietà e parestesie. Nei casi in cui si verifica alopecia, questa è in genere di modesta entità e reversibile. Raramente si possono verificare modificazioni di alcuni parametri di laboratorio, come aumento degli enzimi epatici, della bilirubinemia, della creatininemia e dell'azotemia.

Per via degli effetti immunosoppressivi possono verificarsi infezioni del tratto urogenitale. Inoltre il farmaco può impartire alle urine una colorazione blu-verdastra nelle prime 24 ore dopo la somministrazione.

Disturbi cardiovascolari, che solo raramente sono di rilevanza clinica comprendono: riduzione asintomatica della frazione di eiezione del

ventricolo sinistro, modificazioni del tracciato ECG, episodi di aritmie acute e cardiomiopatia. Nella sua forma più grave la tossicità cardiaca si manifesta con il quadro dell'insufficienza cardiaca congestizia e può verificarsi sia durante il trattamento con MIT, sia in un periodo che va da mesi ad anni dopo la sospensione della terapia. Il rischio di cardiotossicità aumenta con la dose cumulativa, soprattutto se superiore a 120 mg/m^2 , ma può presentarsi anche per dosaggi minori se sono presenti fattori di rischio cardiaco. Una malattia cardiovascolare in atto o latente, una precedente o concomitante irradiazione dell'area mediastinica, la precedente terapia con altre antracicline o antracenedioni o il concomitante utilizzo di altri farmaci cardiotossici possono aumentare il rischio di tossicità cardiaca.

Il MIT inoltre non deve essere utilizzato in corso gravidanza, perché può provocare danni fetali, e durante l'allattamento, in quanto viene escreto nel latte materno. Le donne in età fertile devono evitare una gravidanza per tutta la durata della terapia e per i sei mesi successivi alla sospensione. Anche se non sono noti con certezza gli effetti della terapia con mitoxantrone sulla fertilità, è noto che il farmaco può provocare danni al DNA e quindi è possibile che induca infertilità irreversibile. (Novantrone[®], scheda tecnica).

Nei vari studi clinici effettuati sull'efficacia della terapia nella SM, il trattamento con mitoxantrone è risultato in genere ben tollerato (Hartung et al., 2002). Gli effetti collaterali più comuni sono stati leucopenia e neutropenia transitorie, nausea, infezioni delle vie urinarie, più frequenti nei

pazienti che presentano disturbi della minzione ed in particolare ritenzione urinaria. Nelle donne sono piuttosto frequenti anomalie del ciclo mestruale, nelle pazienti di età inferiore ai 35 anni si è verificata amenorrea secondaria prolungata in circa il 7% dei casi, mentre l'amenorrea permanente è più frequente in soggetti di età più avanzata e può arrivare al 14% nelle donne di età superiore ai 35 anni. (Cohen & Mikol, 2004). Gli effetti più gravi, come lo scompenso cardiaco e l'insorgenza di leucemia, si osservano molto raramente. Il MIT è attivamente captato dai cardiomiociti e all'interno di queste cellule forma complessi con il ferro che portano alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno, tossici per il tessuto cardiaco. In una revisione dei dati derivanti da tre studi clinici diversi lo scompenso cardiaco si è verificato nello 0,15% dei casi, mentre una riduzione asintomatica della frazione di eiezione del ventricolo sinistro è stata riscontrata in meno del 2,2% dei casi (Ghalie et al., 2002).

Gli inibitori della topoisomerasi II, di cui il MIT fa parte, sono associati all'insorgenza di un tipo particolare di leucemia acuta legata al trattamento. Nei pazienti trattati con questi chemioterapici per malattie oncologiche, e spesso sottoposti a polichemioterapia, quasi tutti i casi si verificano entro due-quattro anni dall'inizio della terapia. Questa forma di leucemia spesso è caratterizzata dalla presenza di una traslocazione bilanciata delle bande cromosomiche 11q23 e 21q22 e in genere risponde al trattamento antileucemico. Dalla revisione dei dati di tre diversi studi clinici è emerso che

l'incidenza di leucemia acuta indotta dal trattamento con MIT nei pazienti affetti da SM è di circa lo 0.07%, molto inferiore rispetto alle percentuali osservate nei pazienti affetti da cancro e trattati con polichemioterapia comprendente anche il MIT (Ghalie et al., 2002).

Anche se il MIT è uno dei farmaci più efficaci nel trattamento della SM (Edan et al., 1997, Hartung et al., 2002) e determina un rallentamento della progressione di malattia nei pazienti non rispondenti alle terapie immunomodulanti, molti pazienti con SM particolarmente aggressiva non traggono benefici dal trattamento. In tali circostanze sono necessari ulteriori e più incisivi interventi terapeutici, attualmente non disponibili. Una possibilità di intervento nei pazienti che non traggono benefici dal MIT potrebbe essere rappresentata dal potenziamento ottenuto tramite l'impiego del G-CSF in aggiunta al MIT.

G-CSF

Indicazioni terapeutiche

Il G-CSF, fattore che stimola la formazione di colonie di granulociti, viene utilizzato per ridurre la durata della neutropenia e l'incidenza della neutropenia febbrile in pazienti trattati con chemioterapia citotossica standard per affezioni maligne (con l'eccezione della leucemia mieloide cronica e delle sindromi mielodisplastiche) e per la riduzione della durata della neutropenia

in pazienti sottoposti a terapia mieloablativa seguita da trapianto di midollo osseo considerati a maggior rischio di neutropenia severa prolungata.

Il G-CSF è inoltre indicato per la mobilitazione delle cellule autologhe progenitrici del sangue periferico (PBPC) da solo o dopo chemioterapia mielosoppressiva, per accelerare il recupero emopoietico mediante reinfusione di tali cellule, dopo terapia mielosoppressiva o mieloablativa.

Effetti collaterali

Gli effetti indesiderati del G-CSF sono costituiti da disturbi gastrointestinali (nausea, vomito e diarrea), anoressia, cefalea, astenia, febbre, dolori muscoloscheletrici, dolore alle ossa, rash cutaneo, alopecia, reazione nel sito di iniezione e leucocitosi. Gli effetti indesiderati meno frequenti sono il dolore toracico, la reazione da ipersensibilità (anafilassi e broncospasmo) e le artralgie. Sono stati riportati casi di infiltrati polmonari che hanno portato a una sindrome da distress respiratorio acuto.

G-CSF e malattie autoimmuni

L'osservazione, che i progenitori emopoietici, normalmente rappresentati nel sangue periferico in concentrazione trascurabile, potevano essere mobilizzati mediante la somministrazione di fattori di crescita, tra cui il G-CSF, in associazione ad immunosoppressori (Siena et al., 1989; Bensinger et al., 1993), ha consentito l'utilizzo del G-CSF anche per la mobilitazione di

cellule staminali emopoietiche, nella fase precedente il trapianto di midollo osseo nelle neoplasie ematologiche. In base a questa attività, più recentemente il G-CSF è stato impiegato quindi per la mobilizzazione precedente il trapianto autologo di cellule staminali in pazienti affetti da patologie autoimmuni, nelle forme resistenti al trattamento con le terapie convenzionali (Burt et al., 1998a; Espigado et al., 2003), inclusa la sclerosi multipla (Fassas et al., 2000; Mancardi et al., 2001; Fassas et al., 2002; Carreras et al., 2003). La procedura del trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche in pazienti affetti da sclerosi multipla, si è rivelata, tuttavia, ad alto rischio di morbilità (infezioni) (Fassas et al., 2002) e di mortalità (Tyndall et al., 1999), per cui tale trattamento è al momento utilizzato in maniera limitata.

In prospettiva il G-CSF, potrebbe agire in sinergia con il MIT nella regolazione del sistema immunitario nei pazienti affetti da SM. Ciò è supportato da recenti dati della letteratura che indicano come il G-CSF presenti proprietà immunoregolatrici. Il G-CSF determina infatti una risposta antinfiammatoria, attraverso il rilascio di citochine con attività antinfiammatoria (IL-6, IL-8, IL-10, INF- α) da parte dei linfociti Th2, e l'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie (IL-2, IFN- γ) da parte dei linfociti Th1, sia *in vitro* che *in vivo* (Hartung et al., 1995; Pan et al., 1995; Sloand et al., 2000; Rutella et al., 2002; Rutella et al., 2004). Inoltre il G-CSF determina una riduzione della proliferazione dei linfociti T CD4+ e

CD8+ (Pan et al., 1995; Mielcarek et al., 1997; Rutella et al., 1998) o anergia (Rutella et al., 2004), mediata dai monociti attraverso la produzione di IL-10 (Mielcarek et al., 1998). Le evidenze riguardanti le proprietà antiinfiammatorie del G-CSF hanno giustificato la necessità di valutare le sue potenzialità terapeutiche nell'ambito delle malattie autoimmuni. A tale proposito uno studio sul modello murino della SM, l'encefalite allergica sperimentale, in cui la reazione infiammatoria è scatenata dall'attivazione di cellule Th1 autoaggressive con produzione di citochine proinfiammatorie (Antel & Owens, 1999; Goverman et al., 1993), ha dimostrato come la somministrazione di G-CSF all'esordio delle manifestazioni cliniche, determini nel sistema nervoso centrale, un quadro lieve di demielinizzazione, un ridotto reclutamento delle cellule T, una risposta autoimmune infiammatoria di entità limitata e bassi livelli di mRNA di citochine e chemochine (Zavala et al., 2002). A livello periferico la risposta immunitaria è caratterizzata da un incremento di citochine antinfiammatorie (IL-4, TGF- β) e una riduzione di citochine proinfiammatorie (TNF- α , INF- γ) (Zavala et al., 2002). Oltre a presentare proprietà immunoregolatrici attraverso l'attività diretta sulle cellule T, il G-CSF determina la mobilizzazione dal midollo osseo di cellule mesenchimali staminali. Studi recenti hanno evidenziato come tali cellule presentino un effetto immunosoppressivo sia *in vitro* che *in vivo* (Stagg & Galipeau, 2007), che si esplica attraverso l'azione su vari componenti del sistema immunitario, quali le cellule T, le cellule presentanti

l'antigene, le cellule "natural killer" e le cellule B (Stagg & Galipeau, 2007). Tale effetto indiretto del G-CSF è certamente da considerare nell'ambito di un sua applicazione in pazienti con SM-SP, nei quali l'effetto immunosoppressore del MIT verrebbe quindi potenziato dalla somministrazione di G-CSF.

L'insieme delle osservazioni cliniche e sperimentali disponibili supportano il potenziale utilizzo del G-CSF, in aggiunta al mitoxantrone, quale più incisiva procedura terapeutica nel trattamento della SM resistente alle terapie convenzionali.

SCOPI DELLO STUDIO

Lo scopo primario dello studio è stato quello di valutare gli effetti della mobilitazione di cellule staminali emopoietiche mediante MIT e G-CSF, in confronto a monoterapia con MIT, in pazienti affetti da sclerosi multipla refrattaria al trattamento. A tal fine sono stati valutati:

- 1) La risposta clinica, mediante esame neurologico e scale di valutazione (EDSS, Ambulation Index, SNRS) (EDSS, Kurtzke, 1983; Hauser et al., 1983; Sipe et al., 1984).
- 2) Il numero di lesioni demielinizzanti evidenziate alla RMN dell'encefalo.
- 3) La modulazione immunologica tramite studio delle sottopopolazioni linfocitarie e del profilo citochinico.

Lo scopo secondario dello studio è stato quello di valutare la tollerabilità al trattamento combinato con MIT e G-CSF, in confronto a monoterapia con MIT, sulla base dei parametri:

- 1) Numero di episodi infettivi emergenti
- 2) Eventi avversi

MATERIALI E METODI

PAZIENTI

Sono stati inclusi nello studio 14 pazienti affetti da sclerosi multipla refrattaria al trattamento convenzionale. Tutti i pazienti già sottoposti a terapia con MIT sono stati randomizzati in due gruppi di trattamento, uno in monoterapia con MIT e l'altro con MIT e G-CSF.

I criteri di inclusione dei pazienti sono stati: 1) età compresa fra 18 e 70 anni; 2) pazienti con diagnosi di SM-SP clinicamente definita, in terapia con MIT alle dosi di 12 mg/m² e.v. ogni 3 mesi (per un numero non superiore alle otto somministrazioni), fino ad una dose cumulativa massima di 120 mg/m² ; 3) punteggio iniziale alla EDSS \geq 4.

I pazienti, prima di essere sottoposti alla randomizzazione, hanno effettuato i seguenti esami: 1) profilo ematochimico e delle citochine (interleuchina 2-IL2, interleuchina 6-IL6, interleuchina 8-IL8, interleuchina 10-IL10, interleuchina 12-IL12, fattore di necrosi tumorale alfa TNF- α , recettore I del fattore di necrosi tumorale alfa- TNFRI, recettore II del fattore di necrosi

tumorale alfa- TNFR_{II}, fattore di crescita tumorale beta-TGF- β , interferone gamma-INF- γ , fattore stimolante le colonie granulocitarie-macrofagi (GM-CSF) sette giorni dopo l'ultima somministrazione di MIT; 2) RMN dell'encefalo senza e dopo somministrazione di mezzo di contrasto (gadolinio) nei trenta più o meno sette giorni precedenti il trattamento. I parametri di valutazione hanno incluso la determinazione alla RMN del numero (e del volume totale) delle lesioni T2-pesate e delle lesioni captanti contrasto in T1 dopo iniezione di gadolinio, oltrechè la determinazione e la quantificazione del carico lesionale ipointenso in T1; 3) valutazione neurologica (EDSS, Ambulation Index, SNRS) nei trenta più o meno sette giorni precedenti la mobilizzazione.

Il follow-up dello studio ha previsto le seguenti valutazioni: 1) a dieci e ventuno giorni dopo l'ultima somministrazione di MIT, profilo ematochimico, delle citochine e dosaggio delle sottopopolazioni linfocitarie; 2) a trentasette giorni dopo l'ultima somministrazione di MIT e ogni sei mesi per i successivi diciotto mesi, RMN encefalo 3) a trentasette giorni dopo l'ultima somministrazione di MIT e ogni sei mesi per i successivi diciotto mesi, valutazione neurologica (vedi flow chart).

Flow chart

	Screening	V0	V1	V2	V3	V4	FU1	FU2	FU3	FU4
Consenso informato	X									
Randomizzazione				X						
Valutazione neurologica		X					X	X	X	X
RMN		X					X	X	X	X
Citofluorimetria				*, #	*, #	*, #				
Somministrazione mitoxantrone			X							
Somministrazione G-CSF				X						
Trattamenti concomitanti			X	X	X	X	X	X	X	X
Eventi avversi		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ricadute di malattia		X	X	X	X	X	X	X	X	X

V0: 30±7 giorni prima della terapia

V1: ultima somministrazione di mitoxantrone

V2: +7 dopo mitoxantrone TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA* E CITOCHINE#

V3: +10 TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA* E CITOCHINE#

V4: +21 TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA* E CITOCHINE#

FU1: + 37

FU2: 6 mesi dopo FU1

FU3: 12 mesi dopo FU1

FU4: 18 mesi dopo FU1 (fine studio)

PIANO DI TRATTAMENTO

Nel gruppo in monoterapia con MIT, quest'ultimo è stato somministrato alla dose di 12 mg/m² in 100 cc sol. fisiol. e.v., a 60 gtt/min.

Nel gruppo in terapia con MIT e G-CSF, il MIT è stato somministrato alla dose sopra citata. Dopo una settimana è stato aggiunto e somministrato per sette giorni consecutivamente il G-CSF alla dose di dose 5 µg/Kg due volte al giorno s.c.

A giorni alterni i pazienti sono sottoposti a controllo dell'esame emocromocitometrico, esame obiettivo e monitoraggio citofluorimetrico delle cellule CD34+.

ANALISI STATISTICA

I valori delle scale e delle citochine dei due gruppi di pazienti sono stati analizzati mediante il test di Wilcoxon per dati non parametrici.

Inoltre è stata applicata anche l'analisi ANOVA per misure ripetute.

RISULTATI

Valutazione clinico-neurologica.

Abbiamo esaminato i valori dei test clinici in due gruppi di pazienti con SM-SP comparabili per età (t-test, $p=0.29$) e sesso: quello in trattamento con solo mitoxantrone (6 M/1 F; età: $42,1 \pm 10,5$) e quello in trattamento con mitoxantrone + G-CSF (5 M/2 F; età: $45,3 \pm 8,6$).

I dati delle scale EDSS, Ambulation Index e SNRS sono rappresentati nelle tabelle 1, 2, 3 per il gruppo di pazienti con SM - SP e MIT e nelle tabelle 4, 5, 6 per il gruppo di pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF. I rispettivi valori

medi per il gruppo con il G-CSF sono rappresentati nelle figure 1, 2, 3. L'analisi statistica dei dati clinici non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi, indicando tuttavia una tendenza alla stabilizzazione del decorso della malattia dopo G-CSF.

Valutazione strumentale (RMN)

Per quanto riguarda l'analisi delle lesioni demielinizzanti osservate mediante RMN senza e dopo somministrazione di gadolinio, si è riscontrato in un solo paziente del gruppo SM-SP e MIT un incremento del carico lesionale dopo la somministrazione del MIT che si è aumentato nelle successive valutazioni di follow-up. Negli altri sei pazienti non è stata osservata nessuna variazione rispetto alla valutazione di base. Nel gruppo dei pazienti con SM-SP e MIT+G-CSF, un paziente ha presentato una diminuzione del carico lesionale dopo trenta giorni dall'assunzione del G-CSF. In un altro paziente di questo gruppo vi è stato, invece, un aumento del carico lesionale dopo la somministrazione del MIT che però non ha subito variazioni alle successive valutazioni effettuate dopo l'assunzione di G-CSF.

Valutazione ematochimica

Il dosaggio delle citochine ha rilevato come i valori si discostassero dal range della normalità per la IL2 (vedi Tab. 7), in tutti i cinque pazienti esaminati e per tutte e tre le valutazioni; per la IL6 (vedi Tab. 8), in quattro

pazienti solo per alcune valutazioni; per la IL8 (vedi Tab .9), solo in un paziente in una sola valutazione; per la IL10 (vedi tab. 10) in tutti e cinque i pazienti, maggiormente alla seconda e terza valutazione; per la IL12 (vedi Tab, 11) solo in un paziente per una sola valutazione; per il TNF alfa (vedi Tab. 12) in due pazienti alla seconda e terza e prima e seconda valutazione, rispettivamente; per il TNFRI (vedi Tab. 13) ed il TNFRII (vedi Tab. 14) solo negli stessi due pazienti alla seconda valutazione; per il TGF beta 1 (vedi Tab. 15) in quattro pazienti, dei quali solo per uno in tutte e tre le valutazioni e per gli altri in una sola; per l'INF gamma (vedi Tab. 16) in nessun paziente; per il GM-CSF (vedi Tab. 17) nei tre pazienti esaminati, alla terza, alla prima e seconda, e prima valutazione, rispettivamente.

I valori medi delle citochine sono rappresentati nelle figure da 3 a 14.

All'analisi statistica con ANOVA per misure ripetute si è riscontrata una tendenza alla significatività per il TGF beta 1. Il test di Wilcoxon ha rivelato una significatività ($P < 0.062$) per l' IL 12.

Il dosaggio citofluorimetrico delle cellule T CD34+ nei giorni successivi alla somministrazione del G-CSF ha mostrato che i pazienti non hanno raggiunto valori tali da indicare un'avvenuta mobilitazione.

DISCUSSIONE

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati nuovi farmaci per il trattamento dei pazienti affetti da SM, che hanno consentito di passare da un'era in cui ci

si limitava alla terapia sintomatica ad un'era in cui si dispone di terapie in grado di influire sul decorso della malattia, attraverso l'utilizzo dei così detti "disease-modifying drugs". Molti pazienti possono attualmente trarre beneficio dall'uso di farmaci immunomodulanti, che agiscono come "disease-modifying drugs", quali gli IFN- β ed il glatiramer acetato per le forme RR, per ridurre la frequenza di recidive, l'attività della malattia alla RMN e per rallentare lo sviluppo di disabilità. Per le forme più aggressive di SM-RR sono inoltre utilizzati il MIT ed il natalizumab (Tysabri; anti- α -4 ab). Per i pazienti con SM-PR è stato recentemente approvato l'utilizzo dell'IFN- β 1b, mentre i pazienti con SP il solo MIT. Considerato che solo circa il 40% dei pazienti risponde adeguatamente al trattamento con le terapie attualmente approvate per la SM, numerose trattamenti sono in corso di sperimentazione, per nessuna delle quali è tuttavia ad oggi possibile prevedere se sarà in grado di superare per efficacia e tollerabilità le attuali terapie disponibili per la SM.

Le strategie terapeutiche in corso di sperimentazione includono: 1) gli anticorpi monoclonali quali l'alemtuzumab (Campath-1), il daclizumab (Zenapax; anti-cd25 ab), il rituximab (Rituxan o mabthera; anti-cd20 ab); 2) gli immunomodulanti quali il fingolimod (FTY-720), la teriflunomide, il laquinimod, gli inibitori della fosfodiesterasi, l'acido fumarico, le statine; 3) gli immunosoppressori quali la cladribina, il temsirolimus (rapamicina); 4) il trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche rappresenta un passo ulteriore nel trattamento della SM. In particolare il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche include la mobilizzazione e la conservazione delle cellule staminali ematopoietiche autologhe, con successiva reinfusione delle cellule staminali. Per ottenere ciò è tuttavia necessario effettuare nei pazienti la immunosoppressione mieloablativa, attraverso l'utilizzo di chemioterapici in combinazione e spesso irradiazione corporea totale (Tyndall et al., 1999). Questo trattamento, effettuato nell'ultimo decennio in gruppi di pazienti con SM, ha dimostrato una notevole soppressione dell'attività infiammatoria nella maggior parte dei casi, ma anche, piuttosto frequentemente, una certa progressione di malattia (Fassas et al., 2000; Mancardi et al., 2001; Fassas et al., 2002; Burt et al., 2003; Nash et al., 2003; Saiz et al., 2004; Saccardi et al., 2005; Ni et al., 2006; Samijn et al., 2007). Inoltre la mortalità dovuta al trapianto è riportata in una percentuale variabile dal 5% all' 8% nei pazienti in cui è stato effettuato il trapianto autologo di cellule staminali (Saccardi et al., 2006). La procedura comporta inoltre nel 50% dei casi la comparsa di effetti collaterali quali disturbi gastrointestinali ed alopecia; meno frequentemente infezioni, febbra da neutropenia, sindrome da "engraftment", disturbi neurologici transitori, emorragie, disfunzioni di organi (polmoni, cuore, reni, fegato). I rischi a lungo termine includono la insufficienza gonadica, l'infertilità e le neoplasie. I dati derivanti da questi studi indicano, quindi, che la procedura potrebbe essere molto efficace, ma allo stesso tempo

che comporta dei rischi notevoli. Proprio l'elevato rapporto rischio/beneficio ha fatto sì che il trapianto autologo di cellule staminali non sia ancora stato sperimentato in uno studio fondamentale controllato. Nel trapianto autologo di cellule staminali il razionale consiste nella capacità della chemioterapia mieloablativa, con o senza irradiazione corporea totale, di sopprimere un sistema immunitario alterato e le sue componenti cellulari prima della procedura di reinfusione di cellule staminali ematopoietiche. La successiva differenziazione in tutte le linee emopoietiche delle cellule staminali emopoietiche reinfuse determina la ricostituzione di un sistema immunitario "nuovo" e "tollerante" (Muraro et al., 2003). La completa assenza di nuova attività infiammatoria nella maggior parte dei pazienti trattati con trapianto autologo di cellule staminali è stata dimostrata per almeno uno degli studi effettuati (Mancardi et al., 2001) ed inoltre studi sul sistema immunitario dopo trapianto hanno dimostrato che il repertorio delle cellule T è sia più complesso che completamente rinnovato dopo il trapianto rispetto a quello prima del trapianto (Muraro et al., 2005).

Lo scopo del trapianto autologo di cellule staminali nella SM è quello di ottenere una significativa modificazione del decorso della malattia fino ad indurre una remissione stabile e completa. L'ipotesi che le cellule staminali trapiantate possano migrare negli organi danneggiati dall'infiammazione, determinando così un recupero funzionale, ha certamente suscitato notevole interesse medico ma anche un certo grado di confusione semantica. Le

evidenze che supportano l'integrazione nel sistema nervoso centrale e la transdifferenziazione delle cellule di origine ematopoietica in cellule nervose sono infatti controverse (Castro et al., 2002; Mezey et al., 2000; Mezey et al., 2003; Wagers et al., 2002; Weimann et al., 2003). Nel modello murino della SM, l'encefalite allergica sperimentale, è stato osservato che il trapianto di cellule staminali ematopoietiche può prevenire la demielinizzazione autoimmune o arrestarne la progressione, ma non far regredire il danno già presente (Karussis et al., 1993; Burt et al., 1998b). Ulteriori studi sono quindi necessari per chiarire se la capacità delle cellule staminali ematopoietiche di promuovere la riparazione di cellule nervose o degli oligodendrociti sia realmente più efficace rispetto alla riparazione spontanea che avviene nelle fasi di remissione di malattia nella SM.

Tra i fattori di crescita ematopoietici utilizzati per la mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche nella fase precedente il trapianto autologo di cellule staminali, il G-CSF rappresenta il "gold standard". Il G-CSF presenta inoltre altre proprietà, tra cui quella di interagire con il sistema immunitario, determinando l'attivazione delle cellule Th2 ed una modulazione della produzione citochinica, come dimostrato in modelli sperimentali di malattia autoimmune, quali il lupus eritematosus sistemico, l'artrite reumatoide, il diabete mellito e la sclerosi multipla (Rutella et al., 2005; Rutella et al., 2007). Nel modello murino di SM, la encefalite allergica sperimentale, è stato dimostrato che il trattamento per sette giorni con G-CSF all'esordio

clinico di malattia, determina un diminuito reclutamento delle cellule T nel sistema nervoso centrale, oltre ad uno spostamento della risposta immunitaria da Th1 a Th2, con conseguente produzione di citochine ad attività antinfiammatoria (Zavala et al., 2002). Inoltre, uno studio effettuato utilizzando la tecnica del “microarray”, su placche di pazienti con SM, ha evidenziato come il G-CSF sia espresso maggiormente nelle placche con infiammazione rispetto a quelle inattive (Lock et al., 2002), suggerendo un ruolo del G-CSF nel controllo del processo autoreattivo. Il MIT, benché rientri nella categoria dei farmaci immunosoppressori, non altera l’assetto citochinico in pazienti affetti da SM-SP, suggerendo che molto probabilmente l’azione terapeutica del MIT non dipende esclusivamente dalla sua azione immunosoppressiva (Angelucci et al., 2006). Prendendo in considerazione i principali studi clinici, si può dire che il MIT è moderatamente efficace nel ridurre la progressione di malattia nei pazienti con SM-SP a breve termine (Martinelli Boneschi et al., 2005) e che comunque una certa percentuale di pazienti con forme più aggressive di malattia trae un beneficio relativo dal trattamento. Partendo da tali presupposti, in questo studio abbiamo somministrato a pazienti con SM-SP, che avevano effettuato la terapia con MIT, il G-CSF.

I dati analizzati non hanno rilevato variazioni statisticamente significative degli indicatori clinici di malattia dopo trattamento con il G-CSF, anche per osservazioni cliniche con follow-up prolungato (18 mesi).

La relativa modesta dimensione del campione esaminato può essere un fattore responsabile della mancata osservazione di significatività statistica. Tuttavia l'inclusione nello studio di una popolazione campionaria più numerosa avrebbe richiesto un periodo di osservazione nettamente più lungo, ed avrebbe esposto un maggior numero di pazienti agli svantaggi potenziali del trattamento con G-CSF – trattandosi di una valutazione terapeutica sperimentale. L'analisi di gruppi più numerosi di pazienti potrebbe tuttavia in futuro dare maggiori indicazioni sul piano della risposta clinica al trattamento. Per quanto riguarda il trattamento con G-CSF, la bassa percentuale di linfociti T CD34+, rilevata nei pazienti dopo la somministrazione del farmaco, dimostra la mancata efficacia della procedura di mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche. Ciò può essere dovuto al fatto che il MIT non presenta buone proprietà come mobilizzatore di cellule staminali in associazione al G-CSF. A tale proposito bisogna considerare che negli studi in cui è stato effettuato il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche nei pazienti con SM-SP, il regime di mobilizzazione ha previsto l'utilizzo di un altro farmaco immunosoppressore in associazione al G-CSF, la ciclofosfamida (Fassas et al., 2000; Burt et al., 2003; Nash et al., 2003; Saiz et al., 2004; Saccardi et al., 2005; Ni et al., 2006; Samijn et al., 2007). Tuttavia, l'unico farmaco immunosoppressore approvato come “disease-modifying drug” per il trattamento della SM è il MIT, e per tale motivo è stato inevitabile associare tale immunosoppressore al G-CSF.

Sulla base delle indicazioni rilevate dall'analisi delle citochine, si può inoltre ipotizzare che per ottenere una risposta clinica significativa sarebbe stato utile arruolare i pazienti in una diversa fase della malattia, quando cioè l'attività infiammatoria mediata dai linfociti T è ancora preponderante. Ciò avrebbe consentito inoltre al G-CSF di esplicare a pieno la sua attività immunomodulante anche con una somministrazione in cicli ripetuti. I pazienti inclusi nello studio erano invece consistentemente in una fase di progressione di malattia, in assenza di attività infiammatoria – come rilevato alle indagini RMN, caratteristica irrinunciabile per il rispetto della eticità per un trattamento sperimentale.

In sintesi, il trattamento sequenziale con G-CSF dopo MIT è stato ben tollerato in tutti i pazienti, con l'assenza pressoché completa di manifestazioni avverse. Il trattamento tuttavia non ha mostrato di indurre un beneficio clinicamente rilevabile e significativo, ad indicare che la sola procedura di mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche non seguita dal regime di condizionamento e dal successivo trapianto autologo di cellule staminali, non è sufficiente per questo obiettivo terapeutico. Sulla scorta dei risultati ottenuti, la somministrazione di G-CSF associato a MIT non rappresenta quindi al momento una strategia terapeutica alternativa nella SM-SP.

BIBLIOGRAFIA

1. Akesson E, Oturai A, Berg J, Fredrikson S, Andersen O, Harbo HF, Laaksonen M, Myhr KM, Nyland HI, Ryder LP, Sandberg- Wollheim M, Sorensen PS, Spurkland A, Svejgaard A, Holmans P, Compston A, Hillert J, Sawcer S. A genome-wide screen for linkage in Nordic sib-pairs with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2002;3:279–85.
2. Aloisi F, Ambrosini E, Columba-Cabezas S, Magliozzi R, Serafini B. Intracerebral regulation of immune responses. *Ann Med* 2001 Nov;33(8):510-15.
3. Alstadhaug KB, Olavsen J, Salvesen R. Occurrence of Multiple Sclerosis in Nordland, 1970-1999. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2005;125:431-3.
4. Angelucci F, Batocchi AP, Caggiula M, Frisullo G, Patanella K, Sancricca C, Nociti V, Tonali PA, Mirabella M. In vivo effects of mitoxantrone on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of secondary progressive multiple sclerosis patients. *Neuroimmunomodulation* 2006;13(2):76-81.
5. Antel JP, Arnason BG, Medof ME. Suppressor cell function in multiple sclerosis: correlation with clinical disease activity. *Ann Neurol* 1979 Apr;5(4):338-42.
6. Antel JP, Owens T. Immune regulation and CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 1999 Dec;100(1-2):181-9.

7. Alter M, Okihiro M, Rowley W, Morris T. Multiple Sclerosis among Orientals and Caucasians in Hawaii. *Neurology* 1971;21:122-30.
8. Arnold DL, Matthews PM. MRI in the diagnosis and management of multiple sclerosis. *Neurology* 2002 Apr 23;58(8 Suppl 4):S23-31.
9. Ban M, Stewart GJ, Bennetts BH, Heard R, Simmons R, Maranian M, Compston A, Sawcer SJ. A genome screen for linkage in Australian sibling-pairs with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2002;3:464-9.
10. Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya JM, Shoenfeld Y. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 2007 Jun;1108:567-77.
11. Bakshi R, Minagar A, Jaisani Z, Wolinsky JS. Imaging of Multiple Sclerosis: Role in Neurotherapeutics. *NeuroRx* 2005;2:277-303.
12. Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Grant S, Bullock G, Huang Y, Ponnathpur V, Mahoney ME. High Dose Mitoxantrone Induces Programmed Cell Death or Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells. *Blood* 1993;82:3133-40.
13. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clarke E, Clift R, Hansen J, Shields T. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 1993 Jun 1;81(11):3158-63.

14. Broadley S, Sawcer S, D'Alfonso S, Hensiek A, Coraddu F, Gray J, Roxburgh R, Clayton D, Buttinelli C, Quattrone A, Trojano M, Massacesi L, Compston A. A genome screen for multiple sclerosis in Italian families. *Genes Immun* 2001;2:205–10.
15. Burt RK, Traynor AE, Pope R, Schroeder J, Cohen B, Karlin KH, Lobeck L, Goolsby C, Rowlings P, Davis FA, Stefoski D, Terry C, Keever-Taylor C, Rosen S, Vesole D, Fishman M, Brush M, Mujias S, Villa M, Burns WH. Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1998a Nov 15;92(10):3505-14.
16. Burt RK, Padilla J, Begolka WS, Canto MC, Miller SD. Effect of disease stage on clinical outcome after syngeneic bone marrow transplantation for relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 1998b;91:2609 –16.
17. Burt RK, Cohen BA, Russell E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* 2003;102:2373–78.
18. Calabresi PA. Diagnosis and Management of Multiple Sclerosis. *Am Fam Physician* 2004;70:1935-44.
19. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, De Luca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two

- anti-encephalitogenic cytokines TGF- β 1 and IL-4. *J Immunology* 1998;160:5314-19.
- 20.** Carreras E, Saiz A, Marín P, Martínez C, Rovira M, Villamor N, Aymerich M, Lozano M, Fernández-Avilés F, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Graus F. CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple sclerosis: report of toxicity and treatment results at one year of follow-up in 15 patients. *Haematologica* 2003 Mar;88(3):306-14.
- 21.** Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002;297:1299.
- 22.** Clementi F, Fumagalli G. *Farmacologia generale e molecolare*. II edizione. UTET, Torino. 2001.
- 23.** Cohen BA & Mikol DD. Mitoxantrone treatment of multiple sclerosis. Safety considerations. *Neurology* 2004;63(Suppl 6):S28-S32.
- 24.** Cohen BA, Khan O, Jeffery DR, Bashir K, Rizvi SA, Fox EJ et al. Identifying and treating patients with suboptimal responses. *Neurology* 2004;63 (Suppl 6):S33-S40.
- 25.** Compston A. Genetic epidemiology of Multiple Sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62: 553-61.
- 26.** Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2002;359:1221-31.

27. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovic-Tourniaire P, Moreau T, for The Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. Rate of Pregnancy-Related Relapse in multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 1998;339:285-91.
28. Confavreux C, Suissa S, Saddier P, Bourdes V, Vukusic S, for The vaccine in Multiple Sclerosis Study Group. Vaccination and the risk of relapse in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2001;344:319-26.
29. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003;126:770-82.
30. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and Progression of disability in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:1430-38.
31. Coraddu F, Sawcer S, D'Alfonso S, Lai M, Hensiek A, Solla E, Broadley S, Mancosu C, Pugliatti M, Marrosu MG, Compston A. A genome screen for multiple sclerosis in Sardinian multiplex families. *Eur J Hum Genet* 2001;9:621-6.
32. Cottrell DA, Kremenutzky M, Rice G et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary-progressive multiple sclerosis. *Brain* 1999;122:625-39.

33. Dahl OP, Aarseth JH, Myhr KM, Nyland H, Midgard R. Multiple Sclerosis in Nord-Trondelag County, Norway: a prevalence and incidence study. *Acta Neurol Scand* 2004;109:378-84.
34. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. Inhibition of IL-12 production by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *J Clin Invest* 1998;101:252-62.
35. Dhib-Jalbut S. Mechanism of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58 (Suppl 4):S3-S9.
36. Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC. Genetics of Multiple Sclerosis. *Hum Mol Genet* 1997;6:1693-98.
37. Dyment DA, Sadovnick AD, Willer CJ, Armstrong H, Cader ZM, Wiltshire S, Kalman B, Risch N, Ebers GC. An extended genome scan in 442 Canadian multiple sclerosis-affected sibships: a report from the Canadian Collaborative Study Group. *Hum Mol Genet* 2004;13:1005–15.
38. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in Multiple Sclerosis. *Nature* 1995;377:150-1.
39. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, Armstrong H, Cousin K, Bell RB, Hader W, Paty DW, Hashimoto S, Oger J, Duquette P, Warren S, Gray T, O'Connor P, Nath A, Auty A, Metz L, Francis G, Paulseth JE, Murray TJ, Pryse-Phillips W, Nelson R, Freedman M, Brunet D, Bouchard JP, Hinds D, Risch N. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996;13:472–6.

40. Ebers GC. Natural history of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71 (Suppl. 1):16-19.
41. Ebers G, Sadovnick A, Dymment D, Yee I, Willer C, Risch N, Group fiCCS. A parent of origin effect in multiple sclerosis: observations in half siblings. *Lancet* 2004;363:847-50.
42. Edan G, Morrisey S. Mitoxantrone. In Hawkins CP, Wolinsky JS eds. *Principles of Treatments in Multiple Sclerosis*. Oxford: Butterworth Heinemann 2000:131-46.
43. Edan G, Miller D, Clanet M, Confavreux C, Lyon-Caen O, Lubetzki C, Brochet B, Berry I, Rolland Y, Froment JC, Cabanis E, Iba-Zizen MT, Gandon JM, Lai HM, Moseley I, Sabouraud O. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomized multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:112-8.
44. Espigado I, Marin-Niebla A, Rovira M, Julia A, Rodriguez JM, Altes A et al. Phase I/II trials of autologous peripheral blood stem cell transplantation in autoimmune diseases resistant to conventional therapy: preliminary results from the Spanish experience. *Transplant Proc* 2003 Mar;35(2):742-3.
45. European Study Group on Interferon β -1b in Secondary Progressive MS. Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon β -1b in

- treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1491-7.
46. Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V, Smias C, Eleftheriadis N, Tsimourtou V. Autologous stem cell transplantation in progressive multiple sclerosis—an interim analysis of efficacy. *J Clin Immunol* 2000 Jan;20(1):24-30.
47. Fassas A, Passweg JR, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kozak T, Havrdova E, Carreras E, Graus F, Kashyap A, Openshaw H, Schipperus M, Deconinck E, Mancardi G, Marmont A, Hansz J, Rabusin M, Zuazu Nagore FJ, Besalduch J, Dentamaro T, Fouillard L, Hertenstein B, La Nasa G, Musso M, Papineschi F, Rowe JM, Saccardi R, Steck A, Kappos L, Gratwohl A, Tyndall A, Samijn J; Autoimmune Disease Working Party of the EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation). Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol* 2002 Aug;249(8):1088-97.
48. Fernandez-Fernandez O. Clinica de la esclerosis multiple recidivante-remitente. Factores pronosticos. *Rev Neurol* 2002;35:1067-73.
49. Fidler J, Smith F, Gibbons J. Mitoxantrone inhibits helper function and enhances suppressor activity. *Agents Actions* 1985;16:607-8.

50. Fidler JM, De Joy SQ, Gibbons JJ. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone: 1. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol* 1986;137:727-32.
51. Fox EJ. Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology* 2004;63 (Suppl 6):S15-S18.
52. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 1985 Nov 29;230(4729):1043-5.
53. Ghalie RG, Edan G, Laurent M, Mauch E, Eisenman S, Hartung HP, Gonsette RE, Butine MD, Goodkin DE. Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. *Neurology* 2002;59:909-13.
54. Giovannoni G. Strategies to treat and prevent the development of neutralising anti-interferon- β antibodies. *Neurology* 2003;61 (Suppl 5):S13-S17.
55. Goedde R, Sawcer S, Boehringer S, Milterski B, Sindern E, Haupts M, Schimrigk S, Compston A, Epplen JT. A genome screen for linkage disequilibrium in HLA-DRB1*15-positive Germans with multiple sclerosis based on 4666 microsatellite markers. *Hum Genet* 2002;111:270-7.
56. Goodin DS, Arnason BG, Coyle PK, Frohman EM, Paty DW. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis. Report

- of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2003;61:1332-8.
- 57.** Goodkin DE and the North American Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS. Interferon Beta-1b in Secondary Progressive MS: Clinical and MRI Results of a 3-Year Randomized Controlled Trial. *Neurology* 2000;54:2352.
- 58.** Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 1993 Feb 26;72(4):551-60.
- 59.** Haegert DG, Swift FV, Benedikz J. Evidence for a complex role of HLA class II genotypes in susceptibility to Multiple Sclerosis in Iceland. *Neurology* 1996;46:1107-11.
- 60.** Hafler DA, Buchsbaum M, Weiner HL. Decreased autologous mixed lymphocyte reaction in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1985 Oct;9(6):339-47.
- 61.** Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Haynes CS, Roses AD, Lee A, Shaner B, Menold M, Seboun E, Fitoussi RP, Gartioux C, Reyes C, Ribierre F, Gyapay G, Weissenbach J, Hauser SL, Goodkin DE, Lincoln R, Usuku K, Oksenberg JR, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility

- complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet* 1996; 13:469–71.
- 62.** Hammond SR, McLeod JG, Millingen KS, Stewart-Wynne EG, English D, Holland JT, McCall MG. The epidemiology of Multiple Sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain* 1988;111:1-25.
- 63.** Hartung T, Docke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, Volk HD, Wendel A. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood* 1995 May 1;85(9):2482-89.
- 64.** Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T; Mitoxantrone in Multiple Sclerosis Study Group (MIMS). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002;360:2018-25.
- 65.** Hauser et al. Intensive immunosuppression in progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1983;308:173-80.
- 66.** Hauser SL, Fleischnick E, Weiner HL, Marcus D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with multiple Sclerosis. *Neurology* 1989;39:275-7.
- 67.** Hemmer B, Vergelli M, Calabresi P, Huang T, McFarland HF, Martin R. Cytokine phenotype of human autoreactive T cell clones specific for the

- immunodominant myelin basic protein peptide (83-99). *Neurosci Res* 1996 Sep 15;45(6):852-62.
68. Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. *Neurology* 1999;53:1711-18.
69. Hillert J. Human leukocyte antigen studies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl:S15-17.
70. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman JA. Pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001 Sep 3;194(5):669-76.
71. Iglesias A, Bauer J, Litznerburger T, Schubart A, Linington C. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 2001 Nov;36(2):220-34.
72. Jacobs L, Cookfair D, Rudick R, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM et al. Intramuscular interferon beta 1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:285-94.
73. Jeffery DR. Use of combination therapy with immunomodulators and immunosuppressants in treating multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63 (Suppl 6):S41-S46.
74. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-

- remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1995;45:1268-76.
75. Karp CL, Biron CA, Irani DN. Interferon beta in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunol Today* 2000 Jan;21(1):24-8.
76. Karussis DM, Vourka-Karussis U, Lehmann D, et al. Prevention and reversal of adoptively transferred, chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a single high dose cytoreductive treatment followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1993;92:765–72.
77. Katzung BG. *Farmacologia generale e clinica*. IV edizione. Piccin, Padova. 2000.
78. Kenealy SJ, Pericak-Vance MA, Haines JL. The genetic epidemiology of Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;143:7-12.
79. Kenealy SJ, Babron MC, Bradford Y, Schnetz-Boutaud N, Haines JL, Rimmler JB, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Barcellos LF, Lincoln RR, Oksenberg JR, Hauser SL, Clanet M, Brassat D, Edan G, Yaouanq J, Semana G, Cournu-Rebeix I, Lyon-Caen O, Fontaine B. A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004;75:1070–78.
80. Krapf H, Morrissey S, Zenker O. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, randomised, observer-blind European phase III study. MRI data. *Mult Scler* 1998;4:380.

81. Kuokkanen S, Sundvall M, Terwilliger JD, Tienari PJ, Wikstrom J, Holmdahl R, Pettersson U, Peltonen L. A putative vulnerability locus to multiple sclerosis maps to 5p14–p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. *Nat Genet* 1996;13:477–80.
82. Kuokkanen S, Gschwend M, Rioux JD, Daly MJ, Terwilliger JD, Tienari PJ, Wikstrom J, Palo J, Stein LD, Hudson TJ, Lander ES, Peltonen L. Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *Am J Hum Genet* 1997;61:1379–87.
83. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444-52.
84. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for Multiple Sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:382-427.
85. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE. Epidemiology of Multiple Sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS. *Neurology* 1985;35:672-8.
86. Kurtzke JF, Gudmundsson KR, Bergmann S. Multiple Sclerosis in Iceland: 1. Evidence of a postwar epidemic. *Neurology* 1982;32:143-50.
87. Kurtzke JF, Hyllested K. Multiple Sclerosis in the Faroe Islands. II Clinical update, transmission, and the nature of MS. *Neurology* 1986;36:307-28.

88. Langer-Gould A, Moses HH, Murray TJ. Strategies for managing the side effects of treatment for multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63 (Suppl 5):S35-S41.
89. Ligers A, Dymment DA, Willer CJ, Sadovnick AD, Ebers G, Risch N, Hillert J; Canadian Collaborative Study Groups. Evidence of linkage with HLA-DR in DRB1*15-negative families with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2001 Oct;69(4):900-3.
90. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002 May;8(5):500-8.
91. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-11.
92. Lublin FD, Lavasa M, Viti C, Knobler RL. Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. *Clin Immunol Immunopathol* 1987 Oct;45(1):122-8.
93. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000 Jun;47(6):707-17.

94. Lutton JD, Winston R, Rodman TC. Multiple Sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med* 2004;229:12-20.
95. Mancardi GL, Saccardi R, Filippi M, Gualandi F, Murialdo A, Inglese M, Marrosu MG, Meucci G, Massacesi L, Lugaresi A, Pagliai F, Sormani MP, Sardanelli F, Marmont A; Italian GITMO-NEURO Intergroup on Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology* 2001 Jul 10;57(1):62-8.
96. Martinelli Boneschi F, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005 Oct 19;(4):CD002127.
97. Matthews PM, De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Wolinsky JS, Antel JP, Arnold DL. Putting magnetic resonance spectroscopy studies in context: axonal damage and disability in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 1998;18(3):327-36.
98. McDonald WI. Rachele Fishman-Matthew Moore Lecture. The pathological and clinical dynamics of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:338-43.
99. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.

- 100.** Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 2002 Jan 1;168(1):458-65.
- 101.** Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1364–9.
- 102.** Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779 –82.
- 103.** Mielcarek M, Graf L, Johnson G, Torok-Storb B. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation. *Blood* 1998 Jul 1;92(1):215-22.
- 104.** Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1997 Mar 1;89(5):1629-34.
- 105.** Muraro PA, Cassiani-Ingoni R, Martin R. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: current status and future challenges. *Curr Opin Neurol* 2003;16:299–305.

- 106.** Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, Campbell C, Memon S, Nagle JW, Hakim FT, Gress RE, McFarland HF, Burt RK, Martin R. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* 2005;201:805–16.
- 107.** Nash RA, Bowen JD, McSweeney PA, Pavletic SZ, Maravilla KR, Park MS, Storek J, Sullivan KM, Al-Omaishi J, Corboy JR, DiPersio J, Georges GE, Gooley TA, Holmberg LA, LeMaistre CF, Ryan K, Openshaw H, Sunderhaus J, Storb R, Zunt J, Kraft GH. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood* 2003 Oct 1;102(7):2364-72.
- 108.** Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. Mechanism of mitoxantrone in multiple sclerosis-what is known? *J Neurol Sci* 2004;223:25-7.
- 109.** Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):854-62.
- 110.** Ni XS, Ouyang J, Zhu WH, Wang C, Chen B. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety at three yr of follow up in 21 patients. *Clin Transplant* 2006;20:485– 9.

111. Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of Multiple Sclerosis. *Nature* 1999;399(24):A40-7.
112. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343: 938-52.
113. O'Connor P. Key issue in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview. *Neurology* 2002;59 (Suppl 3): S1-S33.
114. Olsson T, Sun J, Hillert J, Hojberg B, Ekre HP, Andersson G, Olerup O, Link H. Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 1992 Apr;22(4):1083-7.
115. Oturai A, Larsen F, Ryder LP, Madsen HO, Hillert J, Fredrikson S, Pan L, Delmonte J Jr, Jalonen CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995 Dec 15;86(12):4422-9.
116. Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F. Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci* 2004;223:47-51.
117. Prieto JM, Lema M. Interferon β en la esclerosis multiple. *Rev Neurol* 2003;36:980-90.
118. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon β -1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-

blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352:1498-1504.

119. Pugliatti M, Sotgiu S, Sadovnick AD, Yee IM, Sotgiu MA, Poser CM, Rosati G. Multiple Sclerosis in northern Sardinia, Italy: a methodological approach for genetic epidemiological studies. *Neuroepidemiology* 2003;22:362-5.
120. Ragonese P, Salemi G, D'Amelio M, Gammino M, Aridon P, Savettieri G. Multiple Sclerosis in southern Europe: Monreale City, Italy. A twenty year follow up incidence and prevalence study. *Neuroepidemiology* 2004;23:306-9.
121. Ranzato F, Perini P, Tzintzeva E, Tiberio M, Calabrese M, Ermani M, Davettag F, De Zanche L, Garbin E, Verdelli F, Villacara A, Volpe G, Moretto G, Gallo P. Increasing Frequency of Multiple Sclerosis in Padova, Italy: a 30 year epidemiological survey. *Mult Scler* 2003;9:387-92.
122. Redford EJ, Kapoor R, Smith KJ. Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 1997 Dec;120:2149-57.
123. Rizvi SA, Agius MA. Current approved options for treating patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63 (Suppl 6):S8-S14.

124. Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol* 2005 Dec 1;175(11):7085-91.
125. Rutella S. Granulocyte colony-stimulating factor for the induction of T-cell tolerance. *Transplantation* 2007 Jul 15;84(1 Suppl):S26-30.
126. Rutella S, Rumi C, Lucia MB, Sica S, Cauda R, Leone G. Serum of healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor induces T cell unresponsiveness. *Exp Hematol* 1998 Oct;26(11):1024-33.
127. Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Sica S, Ameglio F, Capoluongo E, Mariotti A, Scambia G, d'Onofrio G, Leone G. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood* 2002 Oct 1;100(7):2562-71.
128. Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, Mariotti A, Capoluongo E, Contemi AM. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha. *Eur J Immunol* 2004 May;34(5):1291-1302.
129. Saccardi R, Mancardi GL, Solari A, et al. Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in a multicenter trial: impact on disease activity and quality of life. *Blood* 2005;105:2601-7.
130. Saccardi R, Kozak T, Bocelli-Tyndall C, Fassas A, Kazis A, Havrdova E, Carreras E, Saiz A, Löwenberg B, te Boekhorst PA, Gualandio F, Openshaw H, Longo G, Pagliai F, Massacesi L, Deconink

E, Ouyang J, Nagore FJ, Besalduch J, Lisukov IA, Bonini A, Merelli E, Slavino S, Gratwohl A, Passweg J, Tyndall A, Steck AJ, Andolina M, Capobianco M, Martin JL, Lugaresi A, Meucci G, Sáez RA, Clark RE, Fernandez MN, Fouillard L, Hersteinstein B, Koza V, Cocco E, Baurmann H, Mancardi GL; Autoimmune Diseases Working Party of EBMT. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: update of the European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Multiple Scler* 2006;12: 814–23.

- 131.** Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 1988;29:533–41.
- 132.** Saiz A, Blanco Y, Carreras E, et al. Clinical and MRI outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology* 2004;62:282–4.
- 133.** Samijn JP, te Boekhorst PA, Mondria T, et al. Intense T cell depletion followed by autologous bone marrow transplantation for severe multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:46–50.
- 134.** Sarasoja T, Wikstrom J, Paltamaa J, Hakama M, Sumelahti ML. Occurrence of Multiple Sclerosis in central Finland: a regional and temporal comparison during 30 years. *Acta Neurol Scand* 2004;110:331-6.

- 135.** Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, Robertson N, Clayton D, Goodfellow PN, Compston A. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 1996;13:464–8.
- 136.** Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989 Nov 1;74(6):1905-14.
- 137.** Sipe JC, Knobler RL, Braheny SL, Rice GP, Panitch HS, Oldstone MB. A neurologic rating scale (NRS) for use in multiple sclerosis. *Neurology (Cleveland)* 1984;34:1368-72.
- 138.** Sloan EM, Kim S, MacIejewski, Van Rhee F, Chaudhuri A, Barret J, Young NS. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood* 2000;95:2269-74.
- 139.** Smith KJ, Kapoor R, Hall SM, Davies M. Electrically active axons degenerate when exposed to nitric oxide. *Ann Neurol* 2001 Apr;49(4):470-6.
- 140.** Sospendra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.

141. Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, Hayes CE. Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics* 2004;18:141-51.
142. Stagg J, Galipeau J. Immune plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Handb Exp Pharmacol* 2007;(180):45-66.
143. Steinman L. Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001 Sep 3;194(5):F27-30.
144. Stuart WH, Cohan S, Richert JR, Achiron A. Selecting a disease-modifying agent as a platform therapy in the long-term management of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63 (Suppl 5):S19-S27.
145. Sundstrom P, Nystrom L, Forsgren L. Incidence (1988-97) and prevalence (1997) of Multiple Sclerosis in Vasterbotten County in northern Sweden. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:29-32.
146. Tanaka K, Kujuro Y, Suzuki S, Tanahashi N, Hamada J, Nogawa S, Suzuki N. Clinical and laboratory features of in-patients with Multiple Sclerosis in a University Hospital in Tokyo from 1988-2002. *Intern Med* 2005;44:560-66.
147. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Interferon beta 1b in the

- treatment of multiple sclerosis: Final outcome of the randomised controlled trial. *Neurology* 1995;45:1277-85.
- 148.** Thompson AJ, Kermode AG, Wicks D, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, McDonald WI. Major Differences in the Dynamics of primary and secondary progressive multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 1991;29:53-62.
- 149.** Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative. A metaanalysis of genomic screens in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2001;7:3–11.
- 150.** Tyndall A, Fassas A, Passweg J, Ruiz de Elvira C, Attal M, Brooks P, Black C, Durez P, Finke J, Forman S, Fouillard L, Furst D, Holmes J, Joske D, Jouet J, Kötter I, Locatelli F, Prentice H, Marmont AM, McSweeney P, Musso M, Peter HH, Snowden JA, Sullivan K, Gratwohl A, et al. Autologous hematopoietic stem cells transplants for autoimmune disease-feasibility and transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:729-34.
- 151.** Vartanian TK, Zamvil SS, Fox E et al. Neutralizing antibodies to disease-modifying agents in the treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63 (Suppl 5):S42-S49.
- 152.** Voskuhl RR, Martin R, Bergman C, Dalal M, Ruddle NH, McFarland HF. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* 1993;15(2):137-43.

153. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256 –59.
154. Watson CM, Davison AN, Baker D, O’Neill JK, Turk JL. Suppression of demyelination by mitoxantrone. *Int J Immunopharmacol* 1991;13:923-30.
155. Waubant E, Vukusic S, Gignoux L et al. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 2003;61:184-9.
156. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl:S47-53.
157. Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2088 –93.
158. Weiss ST. Eat Dirt-The hygiene hypothesis and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347:930-1.
159. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12877-82.

160. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ* 2005;330:120.
161. Willer CJ, Dyment DA, Cherny S, Ramagopalan SV, Herrera BM, Morrison KM, Sadovnick AD, Risch NJ, Ebers GC. A genome-wide scan in forty large pedigrees with multiple sclerosis. *J Hum Genet* 2007;52(12):955-62.
162. Winchester RJ, Ebers GC, Fu SM, Espinosa L, Zabriskie J, Kunkel HG. B-cell alloantigen Ag 7a in multiple sclerosis. *Lancet* 1975;2:814.
163. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. Mechanism of action. *Neurology* 1998;51:682-9.
164. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.
165. Zavala F, Abad S, Ezine S, Taupin V, Masson A, Bach JF. G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation. *J Immunol* 2002 Feb15;168(4):2011-9.
166. Zivadinov R. Steroids and brain atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2005;233:73-81.

Tabella 1. Valori di EDSS nei pazienti con SM - SP e mitoxantrone (MIT)

INIZIALI	SESSO	ETA'	EDSS 30 gg prima di G-CSF	EDSS 30 gg dopo il GCSF	EDSS a 6 mesi	EDSS a 12 mesi	EDSS a 18 mesi
CV	M	56	6	6,5	6,5	6,5	6,5
BA	M	30	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
CR	M	40	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
GA	M	35	5,5	6	6	6	6
CF	F	34	6	6	6	6	6
DA	M	44	6	6	6	6	6
DC	M	56	7	7	7	8	8

Tabella 2. Valori di Ambulation Index (AI) nei pazienti con SM - SP e mitoxantrone (MIT)

INIZIALI	SESSO	ETA'	AI 30 gg prima di GCSF	AI 30 gg dopo il GCSF	AI a 6 mesi	AI a 12 mesi	AI a 18 mesi
CV	M	56	7	7	7	7	7
BA	M	30	5	5	5	5	5
CR	M	40	7	7	7	7	7
GA	M	35	4	5	5	5	5
CF	F	34	5	5	5	5	5
DA	M	44	8	8	8	8	8
DC	M	56	9	9	9	9	9

Tabella 3. Valori di SRNS nei pazienti con SM - SP e mitoxantrone (MIT)

INIZIALI	SESSO	ETA'	SNRS 30 gg prima di GCSF	SNRS 30 gg dopo il GCSF	SNRS a 6 mesi	SNRS a 12 mesi	SNRS a 18 mesi
CV	M	56	60	60	60	60	60
BA	M	30	63	63	63	63	63
CR	M	40	50	50	50	50	50
GA	M	35	57	57	57	57	57
CF	F	34	57	57	57	57	57
DA	M	44	40	40	40	40	40
DC	M	38	38	38	38	38	38

Tabella 4. Valori di EDSS nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	EDSS 30 gg prima di GCSF	EDSS 30 gg dopo il GCSF	EDSS a 6 mesi	EDSS a 12 mesi	EDSS a 18 mesi
LP	F	43	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
MA	M	33	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
DFC	M	57	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
LN	F	44	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
BS	F	56	3	2,5	2,5	2,5	2,5
AR	F	44	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
GP	F	40	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

Tabella 5. Valori di Ambulation Index (AI) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	AI 30 gg prima di GCSF	AI 30 gg dopo il GCSF	AI a 6 mesi	AI a 12 mesi	AI a 18 mesi
LP	F	43	5	6	6	6	6
MA	M	33	4	4	4	4	4
DFC	M	57	8	8	8	8	8
LN	F	44	5	5	5	5	5
BS	F	56	2	1	1	1	1
AR	F	44	4	4	4	4	4
GP	F	40	5	5	5	5	5

Tabella 6. Valori di SRNS nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	SNRS 30 gg prima di GCSF	SNRS 30 gg dopo il GCSF	SNRS a 6 mesi	SNRS a 12 mesi	SNRS a 18 mesi
LP	F	43	65	63	63	63	63
MA	M	33	59	59	59	59	59
DFC	M	57	44	44	44	44	44
LN	F	44	53	53	53	53	53
BS	F	56	68	71	71	71	71
AR	F	44	58	58	58	58	58
GP	F	40	49	49	49	49	49

Tabella 7. Valori di interleuchina 2 (v.n.: NR pg/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	IL2: dosaggio al tempo 0	IL2: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	IL2: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	<i>0,1</i>	<i>31,1</i>	NR
BS	F	56	<i>71,3</i>	<i>36,7</i>	<i>8,1</i>
MA	M	33	<i>35,9</i>	<i>12,3</i>	<i>21,3</i>
GP	F	40	<i>47</i>	<i>61</i>	<i>8,9</i>
AR	F	44	<i>40</i>	<i>28,2</i>	<i>47,6</i>

Tabella 8. Valori di interleuchina 6 (v.n.: 0,0-8,5 pg/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	IL6: dosaggio al tempo 0	IL6: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	IL6: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	<i>4,2</i>	<i>1,3</i>	<i>36,6</i>
BS	F	56	<i>41,5</i>	<i>23,7</i>	<i>6,8</i>
MA	M	33	<i>10,7</i>	<i>2,8</i>	<i>5,6</i>
GP	F	40	<i>26,2</i>	<i>36,3</i>	<i>10,1</i>
AR	F	44	<i>3,7</i>	<i>3,8</i>	<i>1,4</i>

Tabella 9. Valori di interleuchina 8 (v.n.: 0,0-47 pg/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	IL8: dosaggio al tempo 0	IL8: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	IL8: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	1	2	0,8
BS	F	56	0,8	2	1
MA	M	33	2	50	1
GP	F	40	0,6	0,4	0,3
AR	F	44	0,5	0,2	0,3

Tabella 10. Valori di interleuchina 10 (v.n.: 0,0-8,9 pg/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	IL10: dosaggio al tempo 0	IL10: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	IL10: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	1,7	78	116,2
BS	F	56	37,5	25	25,1
MA	M	33	5,4	14,6	7,9
GP	F	40	8	17,8	11,9
AR	F	44	6,8	21,2	12,3

Tabella 11. Valori di interleuchina 12 (v.n.: 16,5-590,1 pg/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	IL12: dosaggio al tempo 0	IL12: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	IL12: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	50	186	113
BS	F	56	63	103	122
MA	M	33	90	34	504
GP	F	40	100	76	283
AR	F	44	22	0	80

Tabella 12. Valori di TNF- α (v.n.: 0,0-14,0 pg/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	TNF-α: dosaggio al tempo 0	TNF-α: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	TNF-α: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	10,8	31,8	160
BS	F	56	126,4	73,1	10,1
MA	M	33	5,8	11,6	11
GP	F	40	4,1	6	13,1
AR	F	44	8,7	13,8	10,4

Tabella 13. Valori di TNFR1 (v.n.: 0,3-2,9 ng/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	TNFR1: dosaggio al tempo 0	TNFR1: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	TNFR1: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	2,7	3,2	2,2
BS	F	56	2	3,4	1,4
MA	M	33	1,2	1,7	1
GP	F	40	2	2,5	1,3
AR	F	44	1,9	2,9	1,1

Tabella 14. Valori di TNFR2 (v.n.: 1,91-8,51 ng/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	TNFR2: dosaggio al tempo 0	TNFR2: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	TNFR2: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	4,5	12,5	7,4
BS	F	56	3,3	9,8	3,2
MA	M	33	3,6	4,1	3,5
GP	F	40	3,6	9	5
AR	F	44	3,9	8,4	4,2

Tabella 15. Valori di TGF- β (v.n.: 19-71 ng/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	TGF-β: dosaggio al tempo 0	TGF-β: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	TGF-β: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	15,1	11,9	8,9
BS	F	56	93,3	49,3	67,3
MA	M	33	45	42	54
GP	F	40	35	33	139
AR	F	44	35	30	93

Tabella 16. Valori di INF- γ (v.n.: 0,0-0,89 U/ml) nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	INF-γ: dosaggio al tempo 0	INF-γ: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	INF-γ: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	0,1	0,1	0,2
BS	F	56	0,1	0,1	0,1
MA	M	33	0,3	0,1	0,2
GP	F	40	0,2	0,2	0,1
AR	F	44	0	0,1	0,1

Tabella 17. Valori di GM-CSF nei pazienti con SM - SP e MIT+G-CSF

INIZIALI	SESSO	ETA'	GM-CSF: dosaggio al tempo 0	GMCSF: dosaggio 3 gg dopo G-CSF	GMCSF: dosaggio 14 gg dopo G-CSF
LN	F	44	4,2	1,3	36,6
BS	F	56	<i>41,5</i>	<i>23,7</i>	6,8
MA	M	33	<i>10,7</i>	2,8	5,6
GP	F	40	26,2	<i>36,3</i>	<i>10,1</i>
AR	F	44	3,7	3,8	1,4

LEGENDA:

interleuchina 2: IL 2; interleuchina 6: IL 6; interleuchina 8: IL 8;
interleuchina 10: IL 10; interleuchina 12: IL 12; fattore di necrosi tumorale
alfa: TNF- α ; recettore I del fattore di necrosi tumorale alfa: TNFRI; recettore
II del fattore di necrosi tumorale alfa: TNFRII; fattore di crescita tumorale
beta: TGF- β ; interferone gamma: INF- γ ; fattore stimolante le colonie
granulocitarie-macrofagi: GM-CSF

Tempo 0: appena prima della somministrazione di G-CSF

In italico: valori al di fuori del range di normalità

Figura 1 - EDSS (valori medi; 5 paz con MIT+G-CSF)

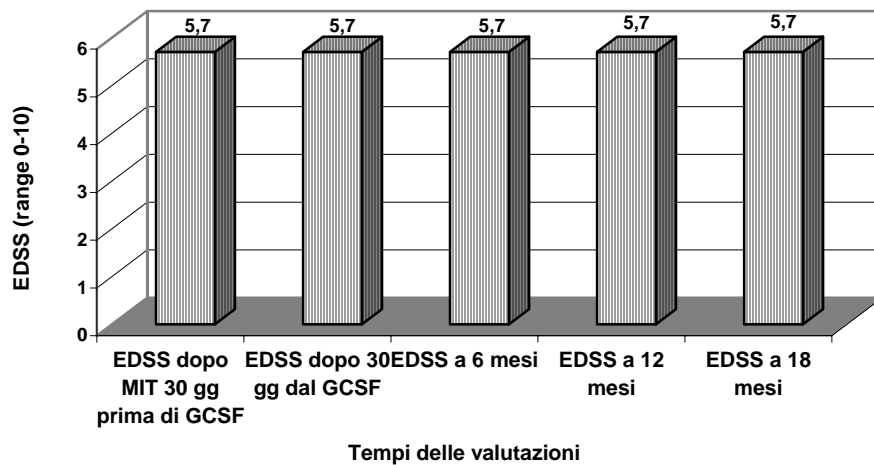


Figura 2 - Ambulation Index (valori medi; 5 paz. con MIT + G-CSF)

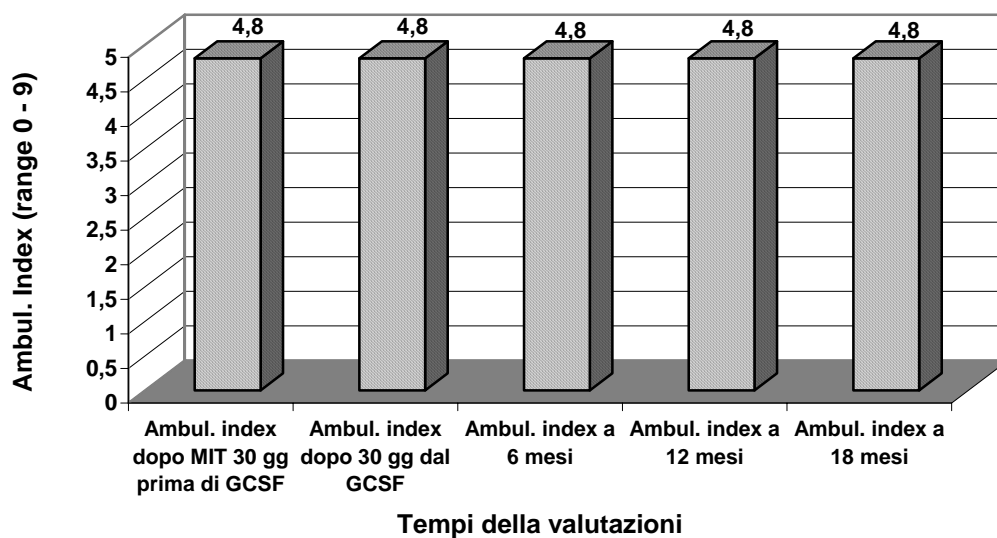


Figura 3 - SNRS (valori medi; 5 paz con MIT+G-CSF)

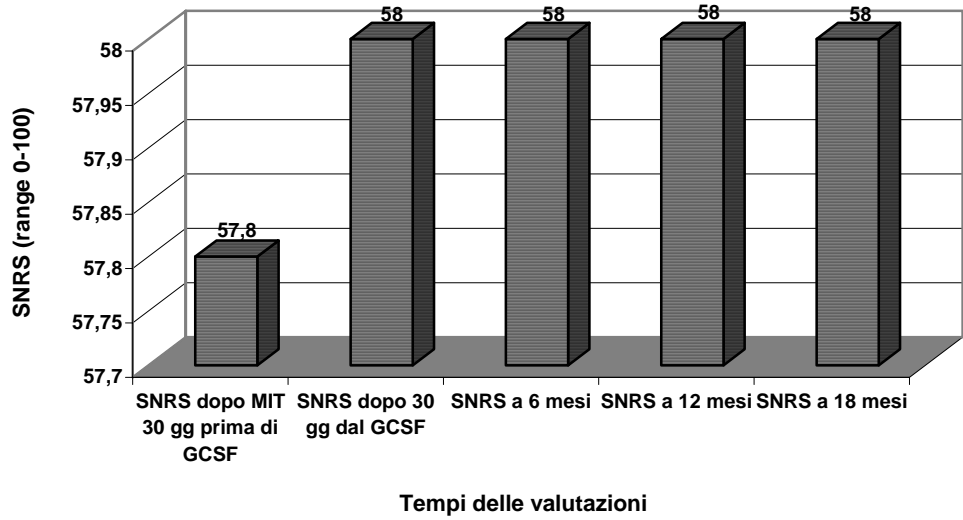
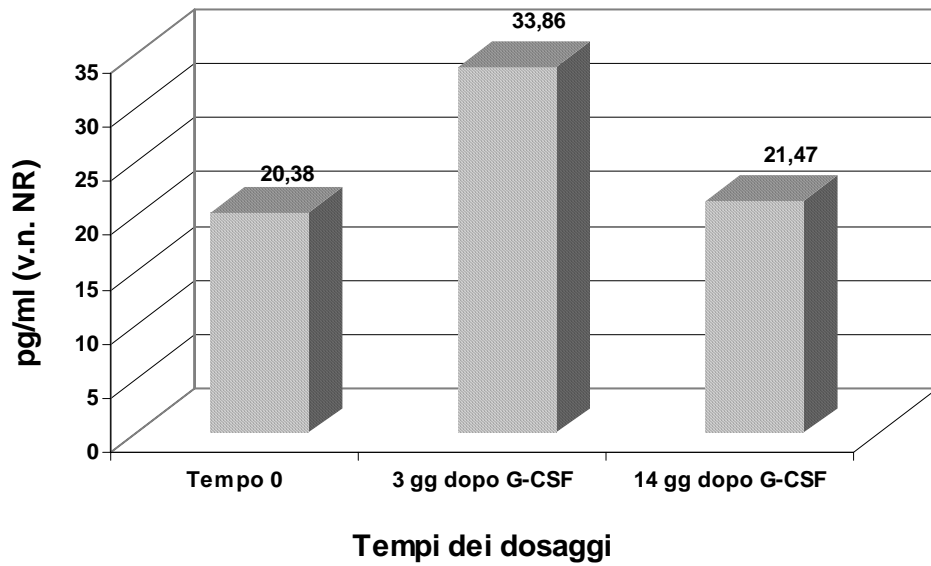
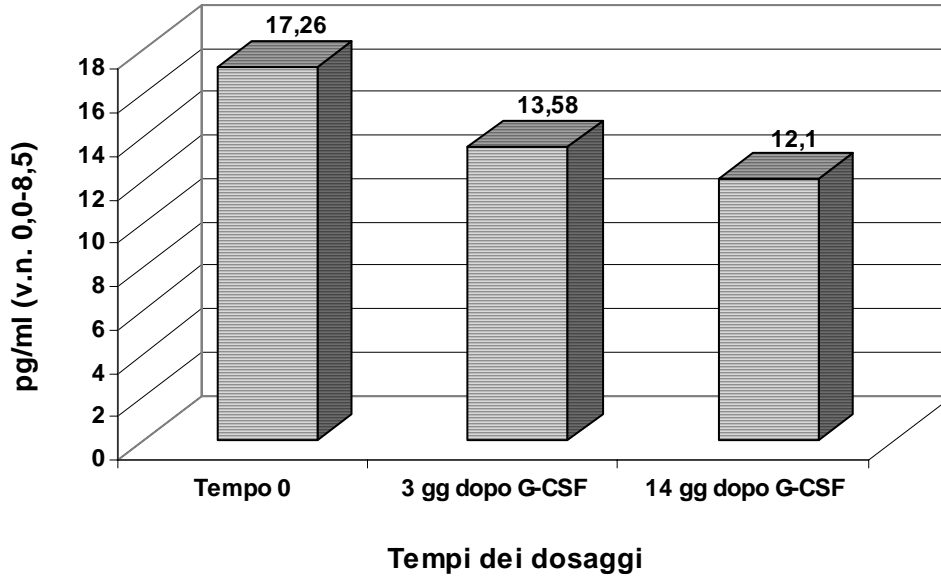


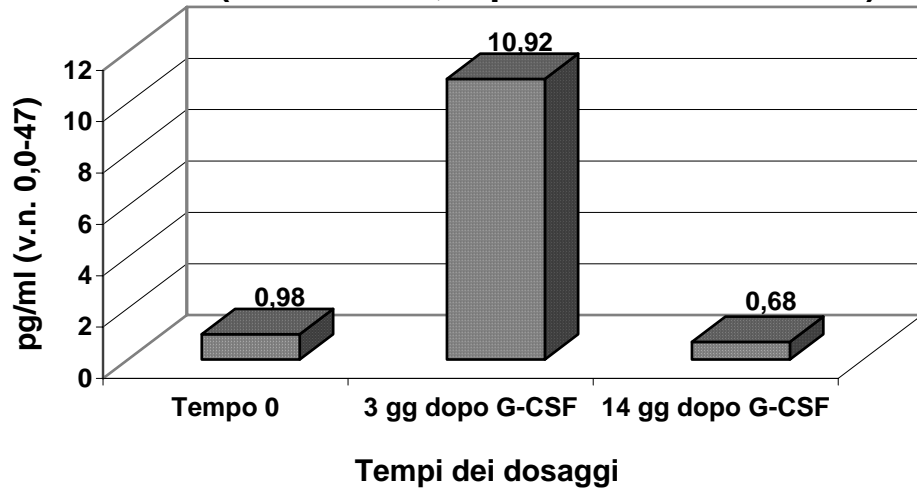
Figura 4 - Interleuchina 2 (valori medi; 5 paz. Con MIT+G-CSF)



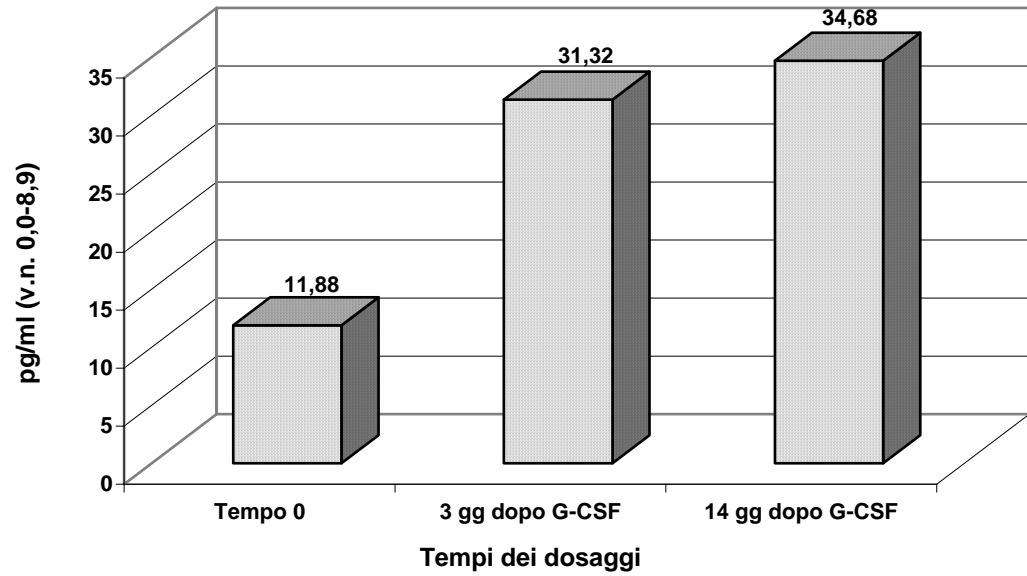
**Figura 5 - Interleuchina 6
(valore medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**



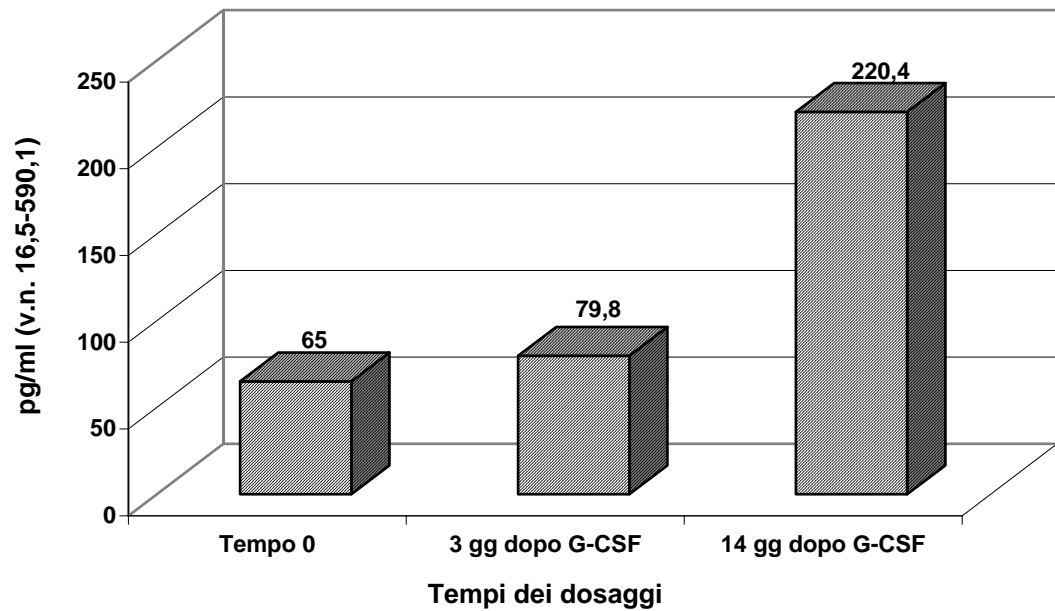
**Figura 6- Interluchina 8
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**



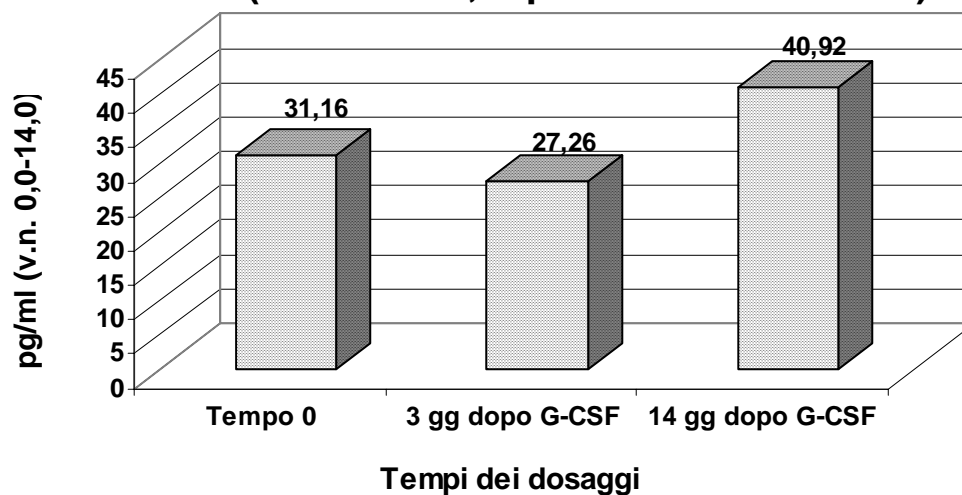
**Figura 7 - Interleuchina 10
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**



**Figura 8 - Interleuchina 12
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**



**Figura 9 - TNFalfa
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**



**Figura 10 - TNFR I
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**

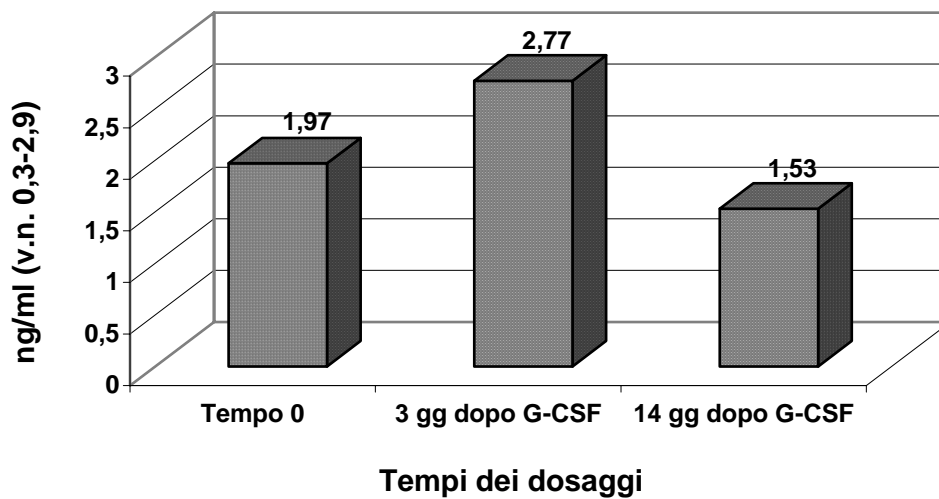


Figura 11 - TNFR II
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)

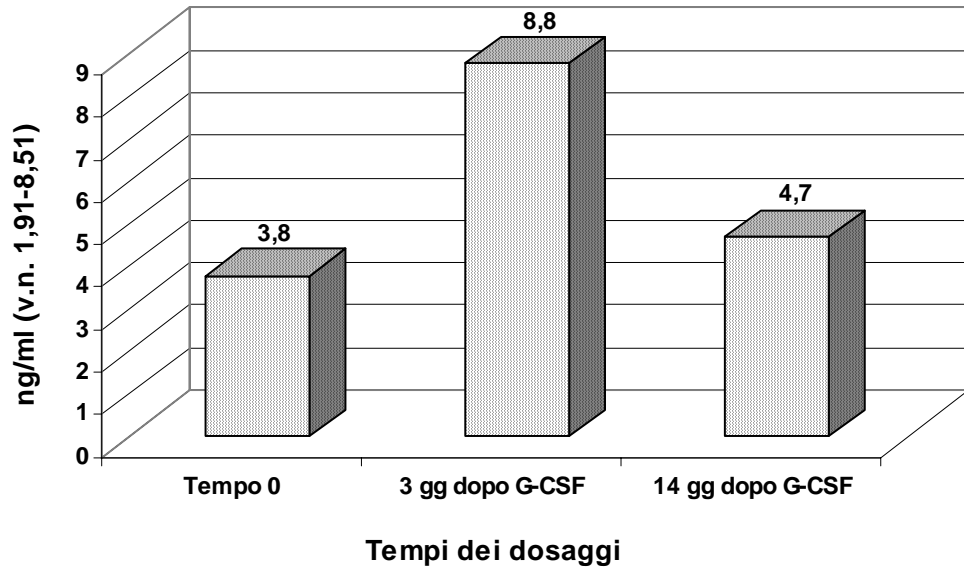
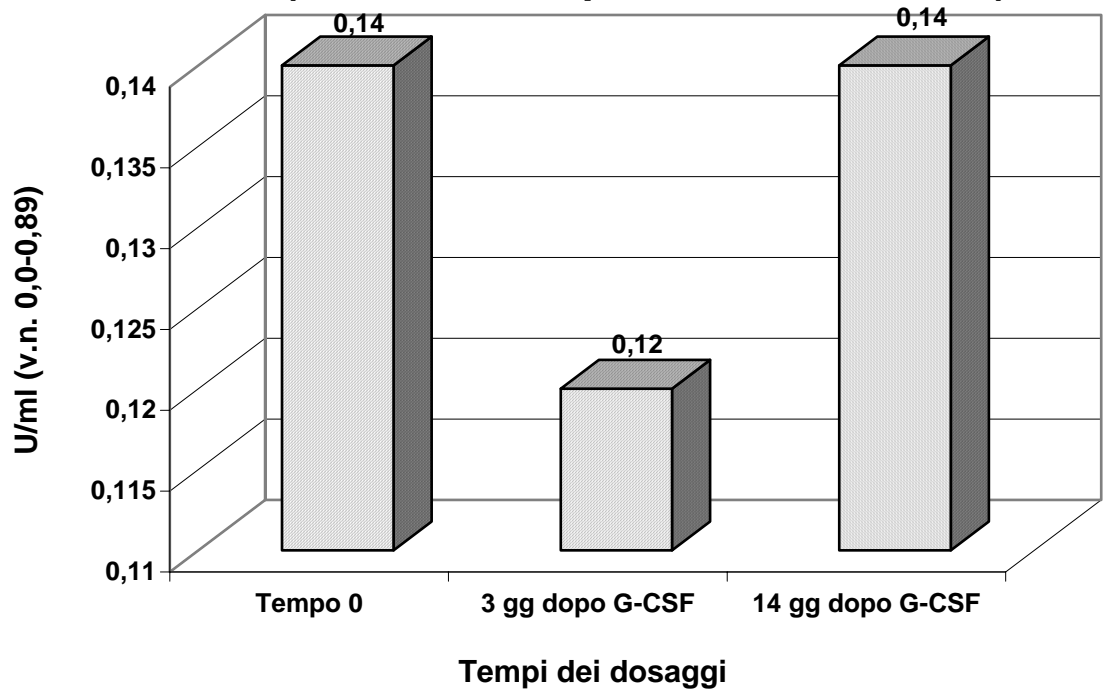
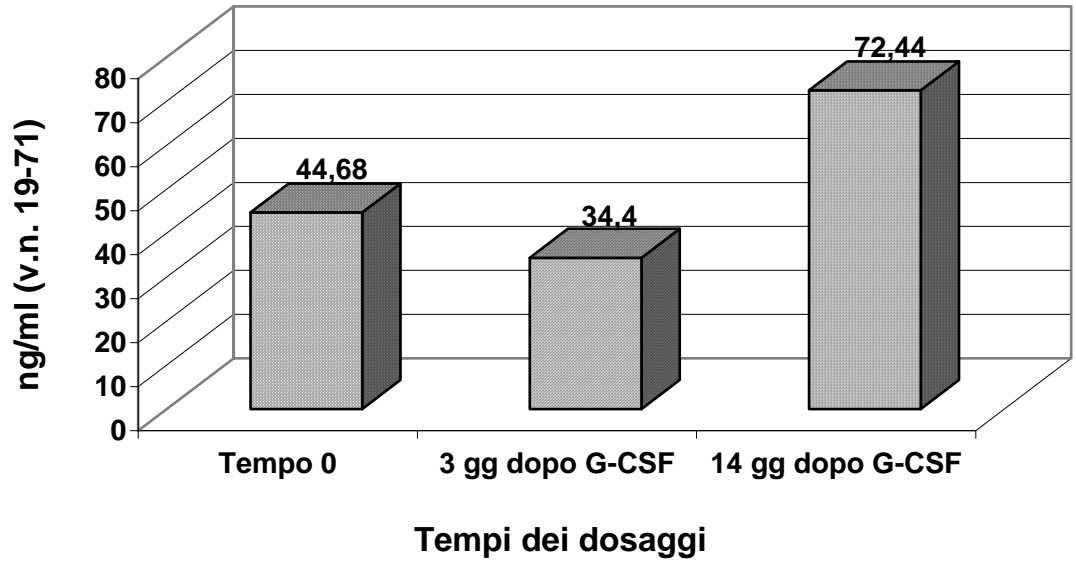


Figura 12 - INF gamma
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)



**Figura 13 - TGF beta 1
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**



**Figura 14 - GM-CSF
(valori medi; 5 paz. con MIT+G-CSF)**

