



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Medicina

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Scuola di Specializzazione in Neurologia

Direttore: Prof. Ubaldo Bonuccelli

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**Sequestro linfocitario linfonodale versus cross-trafficking blockade
nell'immunità demielinizzante**

Relatore

Prof. Alfonso Iudice

Candidato

Dott.ssa Annalisa Amidei

Anno accademico 2014/2015

A Luca, Giulia e Sara

Indice

<i>Riassunto</i>	4
<i>Sclerosi Multipla: scenario immunopatogenetico</i>	5
Introduzione	5
Immunopatogenesi	7
Presentazione clinica e diagnosi	21
<i>Sclerosi Multipla: scenario terapeutico</i>	24
Le terapie a disposizione	24
Il rischio di PML	35
Nuovi farmaci in studio	41
La decisione terapeutica	43
<i>Sequestro linfocitario versus cross-trafficking blockade</i>	45
Razionale dello studio	45
Metodi	45
Analisi statistica	47
Risultati	47
Discussione	58
Conclusione	68
<i>Bibliografia</i>	70

Riassunto

Nei pazienti con Sclerosi Multipla spesso il trattamento con Interferon beta o Glatiramer Acetato riduce la frequenza delle ricadute cliniche e la progressione di disabilità a breve termine, tuttavia nei pazienti che continuano a sperimentare attività di malattia la strategia comune è cambiare verso una terapia più efficace (ESCALATION therapy). In quest'ottica attualmente vengono presi in considerazione Natalizumab o Fingolimod che con il loro meccanismo di blocco linfocitario a livello di barriera ematoencefalica per il primo e a livello dei linfonodi per il secondo, raggiungono un'efficacia maggiore rispetto agli iniettabili. La terapia di escalation a Natalizumab versus quella a Fingolimod non è mai stata comparata in uno studio clinico, sebbene sia stata messa a confronto la loro efficacia e tollerabilità mediante un'analisi longitudinale dei registri di malattia. Il nostro studio parte da questi presupposti per valutare in base alla nostra pratica clinica quale strategia di escalation sia preferibile, andando quindi ad analizzare il profilo rischio/beneficio di questi due farmaci nella nostra coorte di pazienti.

Sclerosi Multipla: scenario immunopatogenetico

Introduzione

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia infiammatoria autoimmune del sistema nervoso centrale (SNC) ad eziologia sconosciuta e caratterizzata da demielinizzazione e vari gradi di perdita assonale. La malattia colpisce prevalentemente le giovani donne (da 20 a 40 anni di età) ed è una delle maggiori cause di disabilità nei giovani adulti. Il numero totale di pazienti colpiti da SM si attesta su circa 1,3 milioni, ma poiché alcuni Paesi non dispongono di registri di malattia questo dato è probabilmente sottostimato. In Italia l'incidenza si attesta su 113 casi su 100 mila abitanti; il numero totale dei malati è circa 68 mila con un totale di 1800 nuovi casi ogni anno. Particolarmente colpita è la Sardegna con un tasso d'incidenza maggiore rispetto alla media nazionale. In Europa i paesi che presentano un'incidenza maggiore sono Danimarca (227 casi ogni 100 mila abitanti) seguita da Svezia, Ungheria, Regno Unito. Nel mondo la maggior parte dei paesi africani non può fornire informazioni tuttavia per quelle che si hanno vi è una bassa incidenza (da 5 a 20 casi per 100 mila abitanti); in Russia si ha un'incidenza di 50 casi su 100 mila abitanti, simile a quella che si riscontra in Turchia e Iran; in Australia e Nuova Zelanda si ha un'incidenza di meno di 100 casi per 100 mila abitanti; in America i paesi più a nord come Stati Uniti e Canada hanno l'incidenza maggiore con 135 e 291 casi per 100 mila abitanti rispettivamente (<http://www.epicentro.iss.it/problemi/sclerosi/epid.asp>). L'incidenza della SM quindi aumenta man mano che ci si allontana dall'equatore e si va verso l'emisfero boreale, andando cioè verso zone a minor esposizione solare e questo ha fatto ipotizzare un ruolo eziologico del deficit di vitamina D oltre ad un possibile ruolo genetico (Williams et al. 1995; Compston and Coles 2008; Ascherio e Munger 2007). Tuttavia dal punto di vista

eziologico è una malattia multifattoriale, con un'interazione tra fattori genetici e ambientali che determina una risposta autoimmune aberrante (Bruck e Stadelmann 2005). I trigger attualmente chiamati in causa, oltre al deficit di vitamina D, sono l'infezione da EBV (Epstein Barr virus) e il fumo (Ascherio e Munger 2007; Wingerchuk et al 2012). Alcuni recenti studi riportano un possibile ruolo della dieta ad alto contenuto di sodio (Farez et al 2015). A sostegno dell'impatto dei fattori ambientali vi è la prova che un soggetto nato in una zona a bassa incidenza di SM, se entro i 16 anni migra in una zona ad alta incidenza assume il rischio di sviluppare la malattia pari ai nativi. Tuttavia anche se non si tratta di una patologia ereditaria c'è un'importante componente genetica di suscettibilità evidenziata da cluster di casi di SM in alcune famiglie. Il rischio di SM tra parenti di primo grado di pazienti con SM è 10-50 volte più alto della popolazione generale; la concordanza nei gemelli monozigoti è circa un terzo (Kantarci et al 2008). Gli studi di linkage hanno messo in evidenza vari loci genetici come fattori di rischio, con le maggiori evidenze a carico del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) HLA DR15/DQ6 (Barcellos et al. 2003; Sawcer et al. 2011). Più recentemente è stato identificato come potenziale fattore di rischio anche il gene del recettore alfa dell'interleuchina 2 e dell'interleuchina 7 (IL2RA e IL7RA) (Hafler et al. 2007; Sawcer et al. 2011).

Immunopatogenesi

La patogenesi dell'SM è costituita da un attacco immune contro gli antigeni del SNC mediante i linfociti T CD4+ reattivi verso la mielina con un possibile contributo dei linfociti B. La maggior parte delle conoscenze sull'immunopatogenesi dell'SM deriva dagli studi effettuati sull'encefalite autoimmune sperimentale (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), modello animale dell'infiammazione demielinizzante che viene indotta con l'immunizzazione periferica mediante componenti mielinici. L'EAE ha in se molte delle caratteristiche istologiche dell'SM inclusi attiva demielinizzazione, perdita oligodendrocitica e assonale (Gold et al 2006). L'esordio dell'SM è conseguente alla perdita della tolleranza immunitaria verso la propria mielina e altri antigeni del SNC, con la persistente attivazione di cellule T autoreattive (Selter et al 2013). In un individuo suscettibile questa perdita di autotolleranza può essere scatenata da un agente ambientale, presumibilmente infettivo come un virus. L'infezione può essere scatenata direttamente attivando i linfociti T oppure mediante il rilascio di autoantigeni da parte di cellule danneggiate che attivano le cellule T per una cross-reattività tra proteine endogene (es. proteina basica della mielina) e proteine patogene dell'agente esogeno (antigene virale o batterico), processo noto come molecular mimicry (O'Connor et al. 2001). Una volta attivati contro la mielina i linfociti T possono migrare attraverso la barriera ematoencefalica (BEE) con una tras migrazione mediata dall'interazione tra l'antigene VLA-4 (Very Late Antigen 4) espresso dai linfociti T e le molecole di adesione VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) espresse sui capillari endoteliali. Tale processo è facilitato dall'espressione e up-regolazione di varie molecole di adesione, chemochine e metalloproteasi (MMPs) (Yong et al. 2004; Gold and Wolinsky 2011). Questi processi sono coadiuvati dal formarsi di manicotti perivascolari, in particolare perivenulari, costituiti da linfociti T, monociti/macrofagi e d'altra parte cellule dendritiche e linfociti B. Nell'EAE e nell'SM le molecole di adesione intercellulari CAM-1(ICAM-1), vascolari

CAM-1 (VCAM-1) e attivate dai leucociti (ALCAM) sono upregolate nell'endotelio vascolare; in questo processo è fondamentale il reclutamento linfocitario che continua ad essere presente durante la fase attiva delle lesioni. Il primo stadio del reclutamento coinvolge le forze di taglio imposte dal torrente circolatorio e comporta la temporanea cattura dei leucociti circolanti mediante le molecole di adesione di superficie. In molti tessuti questo primo step è mediato dall' L-selectina, espressa sulla maggior parte dei leucociti, e dalle E- e P- selectine espresse sulle cellule endoteliali. Attraverso questa precoce interazione si ha la formazione di una associazione temporanea per cui i leucociti iniziano a rotolare lungo la parete vasale nella direzione del flusso. L'espressione delle chemochine linfoidi CCL19/ELC e CCL21/SLC sembra avere un ruolo importante nel propagarsi della neuroinfiammazione. Si ha così un richiamo dei linfociti che coinvolge i tessuti linfoidi secondari con conseguente migrazione dei T linfociti nel SNC come nei processi di immunosorveglianza e l'instaurarsi di infiammazione cronica. In condizioni omeostatiche CCL19 è espresso alla BEE nell'uomo e nel ratto e viene upregolato nell'SM e nell'EAE. Il CCL19 può mediare l'attivazione delle cellule T e delle APC che esprimono il CCR7. Inoltre le cellule endoteliali encefaliche umane in vitro esprimono livelli particolarmente alti di CXCL10 e CXCL8; queste possono contribuire alla risposta prevalentemente Th1 nell'SM (Yu et al 2002; Hausler et al 2002; Kitai et al 2000; Alt et al 2002; Schlereth et al 2012; Columba-Cabezas et al 2003).

Una volta entrati nel SNC i linfociti T autoreattivi, si incontrano con i peptidi autoantigenici del parenchima cerebrale nel contesto di MHC di classe II espressi da APC (antigen presenting cells) quali cellule dendritiche, macrofagi e cellule B dando così il via ad una cascata infiammatoria ricca di citochine, chemochine, reclutamento di altre cellule infiammatorie compresi altri linfociti T, monociti, linfociti B e attivazione persistente di microglia e macrofagi; tutti contribuiscono al danno della mielina (Hemmer et al. 2002; Frohman et al. 2006; Inglese 2006). L'infiammazione locale così come la

demielinizzazione risulta nell'esposizione di ulteriori antigeni mielinici, target addizionale per le cellule T autoreattive; questo fenomeno si chiama "spreading di epitopi" (Miller et al 1997). L'attivazione della microglia risulta poi in una infiammazione persistente anche in assenza di ulteriori infiltrazioni di cellule infiammatorie. L'osservazione sui modelli animali ci suggerisce che i CD4+ T helper 1 (Th 1) che rilasciano citochine proinfiammatorie come interferon gamma, interleuchina 2 (IL 2) e tumor necrosis factor alfa (TNFa) sono i giocatori chiave dell'intero processo anche se una qualche importanza la assumono anche i CD4+ T helper 17 che secernono interleuchina 17 (IL 17) (O'Connor et al. 2001; Selter and Hemmer 2013). I Th2 che secernono interleuchina 4, 5 e 10 hanno un ruolo regolatorio limitando l'insulto da parte delle cellule Th1 (Tzartos et al 2008). Il paradigma Th1/Th2 è più evidente nell'EAE; nell'SM ne abbiamo l'evidenza indiretta mediante le terapie che shiftano il profilo delle citochine da Th1 verso Th2. I T CD8+ sono coinvolti probabilmente nel danno assonale mediante lesione ai neuroni e agli oligodendrociti che esprimono il complesso antigene/MHC classe I (Batoulis et al. 2010). Il contributo delle cellule B alla patogenesi dell'SM (producendo autoanticorpi e presentando l'antigene alle cellule T) è stato recentemente riconosciuto ed è supportato dall'eterogeneità delle lesioni, dalla presenza dell'infiammazione meningeale e dalle strutture simil-follicolari adiacenti alle lesioni corticali subpiali oltre che dal successo delle terapie immuni che bersagliano le cellule B (O'Connor et al. 2001; Batoulis et al. 2010; Naismith et al. 2010). Un'ulteriore prova è la presenza delle bande oligoclonali nel liquor nelle fasi precoci di malattia; rappresentano anticorpi sintetizzati da cellule B aggregate che popolano le meningi e il parenchima cerebrale. Il target antigenico di questi anticorpi è ancora ignoto, sebbene sia stato dimostrato che reagiscono contro la sostanza bianca dei pazienti con SM (Obermeier et al 2011).

Sebbene la demielinizzazione sia il contrassegno fondamentale di questa patologia, il danno assonale precoce e la perdita assonale sono altrettanto presenti e portano a

progressione della disabilità (Trapp et al. 1998). L'esatto meccanismo di danno mielinico e assonale non è stato completamente chiarito, ma è verosimile che includa sia il danno diretto, alla mielina e agli assoni, mediante i linfociti T CD4+ e CD8+, microglia/macrofagi, anticorpi e complemento ma anche citochine proinfiammatorie come IL1 β , TNFa, ossido nitrico e MMPs (Lucchinetti et al. 2000; Hemmer et al. 2002; Gold and Wolinsky 2011). Anche gli infiltrati infiammatori meningeali associati alle lesioni corticali subpiali possono contribuire all'infiammazione corticale e alla disabilità.

Si sono osservati nei modelli sperimentali 4 tipi di processi che determinano demielinizzazione; il tipo I è mediato da cellule T e la demielinizzazione è data direttamente dai macrofagi o dalle loro tossine, il tipo II coinvolge sia le cellule T che gli anticorpi ed è il tipo più comunemente osservato; il danno in questo caso è dato direttamente dagli anticorpi o dal complemento. Il tipo III è correlato all'oligodendropatia tardiva, dove avvengono cambiamenti degenerativi e il termine ultimo è l'apoptosi. Il tipo IV risulta in un danno oligodendrocitico primario seguito da secondaria demielinizzazione (Siriam et al 2011).

Il concetto di reazione autoimmune contro la mielina mediante risposta immunitaria adattativa verso auto-antigeni come spiegazione etiologica integrale è stato messo in crisi da alcune osservazioni tra cui l'evidenza che negli eventi precoci dell'SM si ha perdita di oligodendrociti e mielina con assenza di cellule B o T a suggerire che siano coinvolti altri agenti dell'immunità oltre ai linfociti (Barnett e Prineas 2004; Marik et al 2007; Henderson et al 2009). Un'altra evidenza è che grandi aree di perdita mielinica si riscontrano nelle vie motorie e sensoriali attribuendo questa perdita all'azione di cellule immunitarie infiltranti (Trapp et al 2008; Bø et al 2009) oppure il riscontro di infiltrati cellulari B e T in pazienti con oligodendropatia di tipo III e in rari casi di sclerosi concentrica di Balò. Inoltre nei pazienti che ricevono trapianto autologo di midollo osseo sono stati trovate lesioni demielinizzanti espansive con poche o nessuna cellula T, suggerendo un processo

intrinseco patologico in queste lesioni. Interessante è anche che l'infiammazione si focalizza in placche specifiche e non interessa l'intera sostanza bianca.

In accordo con queste evidenze assume un ruolo importante il sistema immunitario innato sia nell'inizio che nella progressione dell'SM, attivando la funzione effettrice di cellule T e B in modo simile a quanto succede quando è coinvolto un agente patogeno (Weiner et al 2008; Sospedra e Martin et al 2005; Gandhi et al 2010). Tra i componenti dell'immunità innata sono importanti i recettori della famiglia Toll-like e NOD-like, le proteine Heat-shock, le cellule natural killer, alcune interleuchine, le mastocellule, i fagociti mononucleati; inoltre hanno un'importanza anche le cellule TH17 e i neutrofilii.

I ligandi dei recettori della famiglia Toll-like (TLR) sono deputati allo switch di classe in risposta ad un agente patogeno scegliendo tra una risposta T cellulare dipendente e una T indipendente mediata da anticorpi; è stato imputato anche un loro ruolo in patologie autoimmuni come SM e EAE (Reynolds et al. 2012; Marta et al 2008; Zhang 2009). In queste agirebbero alcuni ligandi endogeni capaci di indurre un segnale Toll-like. La famiglia dei TLR è una famiglia di recettori del sistema immunitario localizzata sia alla superficie cellulare che negli endosomi di diversi tipi cellulari, sia immunitari che non immunitari, la cui attivazione avviene per la maggior parte grazie a macrofagi e altre APC come cellule dendritiche e cellule B (Dorner et al 2009). Inoltre i TLR sono coinvolti nel riconoscimento di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs) che portano all'attivazione trascrizionale dei geni che codificano per citochine, chemochine e molecole costimolatrici che di conseguenza attivano la risposta immune innata (Galdiero et al 2004; Akira et al 2003). I TLR hanno inoltre importanti funzioni anche fuori dal sistema immunitario; in particolare possono inibire la differenziazione cellulare di vari tipi cellulari (es. da cellule mesenchimali a osteogeniche, adipogeniche e condrogeniche oppure intervengono nella differenziazione neurogenica ippocampale). I TLR di tipo 2, poi, hanno un'importanza fondamentale perché regolano la rimielinizzazione, mediando un effetto

repressivo di maturazione dei precursori degli oligodendrociti (OPC). I TLR di tipo 9 sono localizzati sulle cellule B e cellule dendritiche plasmocitoidi (pDC) e riconoscono il DNA virale negli endosomi precoci nelle prime fasi dell'infezione virale (Liu et al 2005). La partecipazione di TLR 2 e 9 è stata identificata nella risposta all'infezione verso vari virus come Herpes Simplex 1 e 2, Citomegalovirus, Epatite C, Epstein Barr, Varicella Zoster (Bieback et al 2002; Compton et al 2003; Dolganiuc et al 2004). L'attivazione di TLR 2 è seguita dalla produzione di citochine infiammatorie incluse IL-6, IL-8 e TNF alfa. Inoltre l'induzione di INF- α dall'HSV coinvolge TLR-9 (Rizzo et al 2012). Durante la patogenesi dell'SM nei modelli animali il TLR-9 riconosce il DNA dei primi endosomi virali e d'altra parte l'attivazione delle APC attraverso TLR-9 e CD40 capovolge la tolleranza verso gli antigeni della mielina e rompe la resistenza allo sviluppo di EAE (Prinz et al 2006). I TLR di tipo 3 hanno invece la capacità di sopprimere la recidiva di demielinizzazione nell'EAE e di innescare la risposta neuroprotettiva negli astrociti, mentre nei controlli sani induce la crescita degli assoni e dei progenitori cellulari neuronali, suggerendo un ruolo addizionale di TLR3 nel SNC e nell'SM (Wolf et al 2007). Quindi TLR di tipo 2, 7 e 9 mediano la

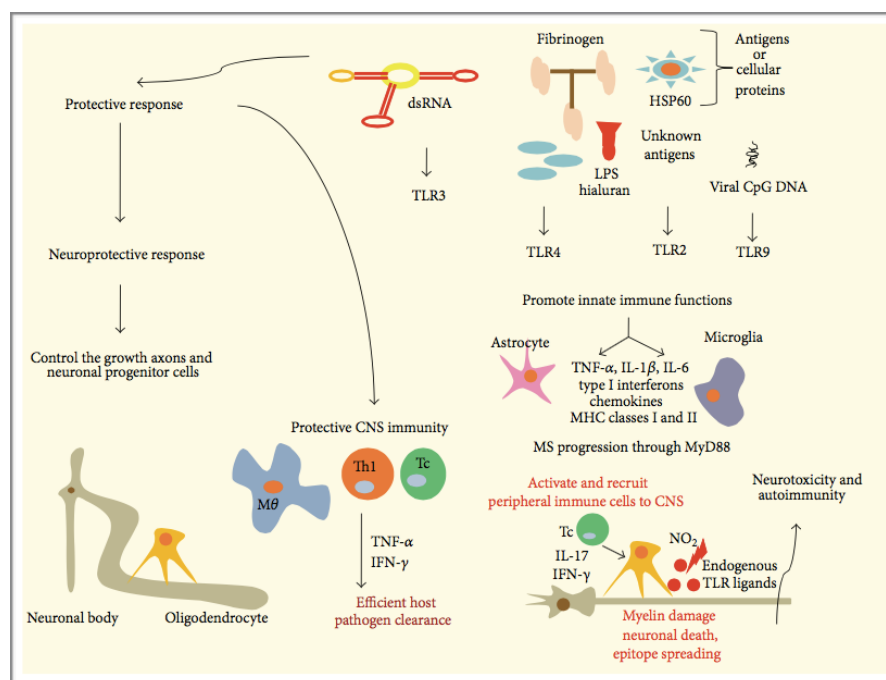


Fig.1 Ruolo del sistema immunitario innato nella patogenesi dell'SM. (Hernández-Pedro et al 2013)

progressione dell'SM mentre il tipo 3 protegge dalla malattia mediante attivazione del sistema immunitario innato (Marta et al 2009). In aggiunta i TLR di tipo 7 sono stati recentemente implicati nelle malattie anticorpo-mediate come l'SM, stimolando la maturazione e differenziazione dei linfociti B verso la produzione di immunoglobuline (Ig). Recentemente è stato dimostrato che nei pazienti con SM si ha una ridotta produzione di IgM e IgG indotta da TLR-7; questo può correlare con un peggioramento della malattia (Zhang et al 2009, Giacomini et al 2013). La modulazione di TLR-7 potrebbe essere un potenziale target terapeutico per la sua capacità di bloccare il profilo umorale della malattia (Fig.1).

Oltre ai TLR è stata individuata un'altra classe di molecole note come recettori NOD-like (dominio di legame dei nucleotidi, contenete ripetizioni ricche di leucina, NLR). In modo simile ai TLR, anche i NLR riconoscono molecole derivate dai patogeni e sono coinvolte in prima linea durante le infezioni, andando a riconoscere pattern molecolari di stress cellulare in risposta all'infezione, ma rispetto ai TLR, i NLR sono sensibili a segnali diversi come ad esempio radicali dell'ossigeno, ultravioletti B (UVB) e bassi livelli di K^+ intracellulari (Franchi et al 2006; Shaw et al 2010; Shaw et al 2011; Zaki et al 2011). Le proteine associate ai NLR (NLRP3, NLRP1 e NLRC4 così come la più recentemente scoperta HIN-200 AIM2) sono attivate dai pattern molecolari associati ai patogeni risultando nel reclutamento di proteine adattatrici degli inflammasomi e procaspasi-1 (Rizzo et al 2012). L'inflammasoma è stato identificato nel 2002 come un complesso di segnali auto-oligomerizzanti e attivanti la caspasi-1; da allora ne sono stati identificati 3 tipi che dipendono dal tipo di proteine NLR coinvolte nel suo assemblaggio. Gli inflammasomi associati a NLRP tipo 1 e 3 sono espressi nei linfociti T e B; l'inflammasoma NLRP1 è inoltre espresso nei neuroni piramidali e negli oligodendrociti, ma non nelle cellule microgliali o astrocitarie. I fattori che determinano l'attivazione dell'inflammasoma includono le heat shock protein (HSP), gli agenti esogeni induttori di

stress (asbesto, silice e allume), gli agenti endogeni di distress metabolico (ATP, acido urico, fibronectina, disfunzioni mitocondriali) e fattori correlati all'obesità (acidi grassi, ceramidi, specie reattive dell'ossigeno e iperglicemia). Questi complessi multiproteici attivano la caspasi-1 che di conseguenza determina secrezione di IL1 beta e IL18; l'inflammasoma media anche altri processi come l'autofagia e la morte cellulare. Le citochine IL1 beta e IL18 mostrano simile struttura, meccanismo di azione, vie di trasduzione del segnale ed effetto proinfiammatorio inducendo cambiamenti nella BEE in senso permeabilizzante per il trasporto di sostanze e l'infiltrazione delle cellule immuni nell'encefalo. Evidenze circa l'attivazione dell'inflammasoma nell'SM sono scarse ma studi clinici hanno identificato un ruolo importante delle citochine inflammasoma-derivate nella patogenesi dell'SM. Ad esempio alcuni polimorfismi del gene per l'IL1 beta e per l'antagonista IL1R sono dimostrati essere associati con la gravità di malattia (De Jong et al 2002; Schrijver et al 1999). Un'altra evidenza deriva dall'osservazione che l'interferone beta (INF- β), farmaco importante nello scenario terapeutico dell'SM, attenua il decorso di malattia modulando l'attivazione dell'inflammasoma e la conseguente produzione di IL1.

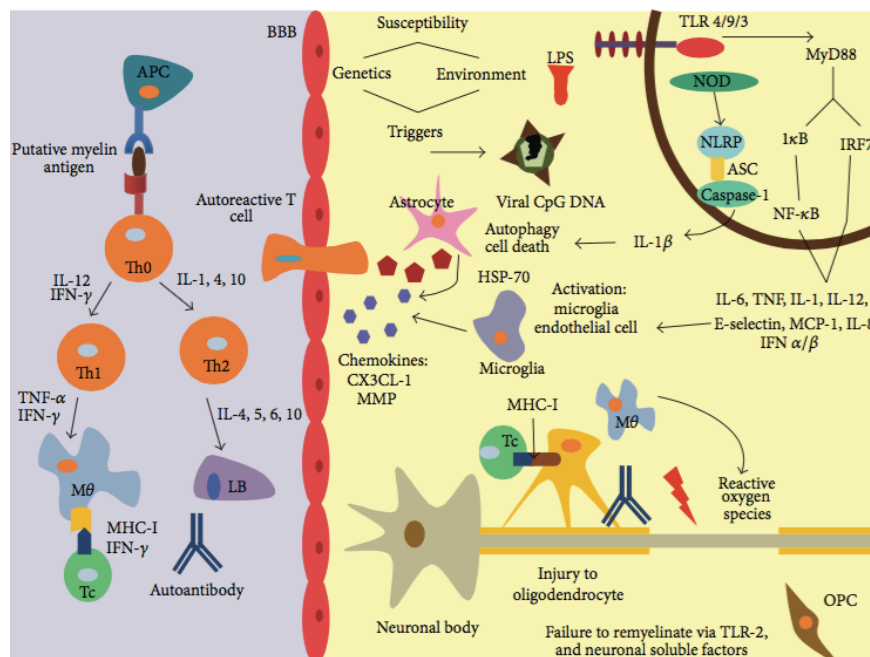


Fig.2 Immunopatogenesi dell'SM. (Hernández-Pedro et al 2013)

In particolare l'INF β reprime potentemente l'attivazione degli inflammasomi con NLRP tipo 1 e 3, sopprimendo la secrezione di IL1 caspasi dipendente; l'effetto inibitorio di INF β è mediato da cellule del sistema immune innato, come macrofagi e cellule dendritiche che inibiscono la risposta dei Th 17 attraverso l'IL-27. Fig. 2

Altra famiglia di proteine coinvolte sono le HSP (heat shock protein), che esercitano funzioni immunomodulanti verso uno stimolo stressogeno (es. deprivazione di nutrienti, irradiazione, ipossia, stress ossidativo...). Hanno un ruolo nell'accrescere la risposta immunitaria mediante attività di chaperone poiché una volta formati i complessi HSP-antigene è permessa l'attivazione di molecole di MHC di classe I stimulate da linfociti T citotossici. Nel sistema immunitario innato l'HSP agisce come uno stimolatore immunitario riconosciuto dai TLR; quindi le HSP possono sviluppare la risposta immunitaria dopo che è avvenuto il danno cellulare (Yokota et al 2003). Un meccanismo alternativo per cui la risposta immune innata viene stimolata dalle HSP è l'attivazione della maturazione delle APC mediante l'interazione con TLR2, TLR4 e CD40; questi complessi stimolerebbero la risposta cellulare T CD4+ seguita dall'attivazione della risposta immune mediante le molecole del complesso MHC di classe II (Olson et al 2004). Una HSP che ha un ruolo cruciale è l'HSP 70 che agisce come un chemoattrattivo che innesca l'effetto citotossico delle cellule natural killer (NK) mediandone l'interazione con CD94. L'HSP 70 porta all'attivazione della trascrizione del fattore NF-KB nei monociti, macrofagi e cellule dendritiche; questa attivazione porta all'induzione di produzione di citochine proinfiammatorie (IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF, and GM-CSF), secrezione di chemochine, produzione di ossido nitrico dai macrofagi, espressione di CD83, CD86 e CD40 così come di MHC di classe II sulle cellule dendritiche e migrazione di queste cellule verso i linfonodi drenanti, innesco della risposta immune adattativa (Mansilla et al 2012). Queste

evidenze dimostrano che le HSP possono portare dalla risposta immune innata iniziale alla sua perpetrazione nell'SM.

Le cellule NK possono avere un ruolo nella regolazione dell'SM e dell'EAE, sebbene la loro importanza rimanga tutt'ora non chiara. Alcuni studi suggeriscono che le NK favoriscano l'SM mediante attività citolitica, produzione di citochine, interazione con APC e cellule B e T, mentre un altro studio indica che il blocco dell'ingresso delle NK nel SNC risulta in esacerbazione della malattia (Shi et al 2011, Hao et al 2010). E' stato associato l'incremento dell'attività delle cellule NK con l'aumento del rischio di sviluppare lesioni attive nell'SM-RR; durante i periodi di remissione le cellule NK producono IL5 fattore che le lega alla risposta Th2 e suggerisce che possono competere con le cellule Th1 patogeniche. Inoltre i livelli di CD95 più alti negli stessi pazienti dimostravano un ruolo protettivo di questa citochina verso la morte cellulare mediata da cellule NK nell'SM. Durante le ricadute di SM l'espressione dell'mRNA di IL5 e CD95 da parte delle NK era significativamente ridotto. In accordo a questi dati si può immaginare che i cambiamenti funzionali delle NK possono avere un ruolo chiave nell'innescare le riesacerbazioni cliniche nell'SM indipendentemente dalle cellule T (Takahashi 2001).

Le interleuchine IL2 e IL7 sono dimostrate essere associate con la regolazione dell'autoimmunità e con i modelli animali di EAE; l'IL2 è stata associata con la regolazione della proliferazione cellulare T, sopravvivenza e differenziazione di effettori (Th1/Th2). La sua azione consiste nel mantenimento della tolleranza T linfocitaria periferica per cui si pensa che la compromissione dell'attività regolatoria T cellulare sia dovuta ad una mancanza dell'IL2 (Le Campion et al 2012). Il segnale mediato dall'IL7 è cruciale per la proliferazione e sopravvivenza dei linfociti T negli umani e nei modelli animali (Puel et al 1998). Alcuni studi dimostrano come alti livelli di IL7 possano predire una maggior responsività all'INF β . L'IL7 da sola o in combinazione con IL12 può

promuovere la differenziazione cellulare dei Th1. Quindi il blocco di IL7 o IL-7Ra può essere una potenziale strategia terapeutica per trattare SM.

I neutrofili sono essenziali per contenere e bonificare dagli agenti infettivi, ma per il loro potenziale istotossico indiscriminato sono finemente regolati da un meccanismo che coinvolge un “priming” prima di una piena attivazione (Koedel et al 2009). I neutrofili possono essere innescati da un ampio range di molecole che includono citochine proinfiammatorie come TNF alfa, fattore attivante le piastrine (PAF), INF-gamma, fattore di stimolazione di colonie granulocito-macrofagiche (GM-CSF), IL-6 e IL-8 (Colotta et al 1992, Kettritz et al 1998). Nei pazienti SMRR durante le ricadute è stata riscontrata una correlazione tra alta conta dei neutrofili e up-regolazione di GCS e CXCR1 così come inibizione dell’apoptosi e induzione di risposta infiammatoria. I neutrofili dei pazienti SMRR non sono solo più abbondanti nei pazienti SM rispetto ai controlli ma esprimono un livello maggiore di TLR2, CD43, FPR1 e CXCR11 fatto che supporta l’ipotesi che i neutrofili nell’SMRR siano stimolati dall’infiammazione cronica (Kurt-Jones et al 2002; Hayashi et al 2003). Un più alto rilascio di elastasi e catepsina G dai neutrofili innescati può contribuire alla patogenesi dell’SM, non solo mediante danno diretto dei tessuti, ma anche mediante potenziamento dell’attivazione T cellulare (Tani et al 2001). Inoltre i granuli dei neutrofili contengono anche le metalloproteasi di matrice (MMP-9) che partecipano alla compromissione della BEE e sono incrementati durante le ricadute (Gidday et al 2005).

Le mastocellule sono componenti del sistema immunitario innato che discendono da progenitori ematopoietici multipotenti e sono caratterizzate per alta espressione sulla loro superficie del recettore tiroxina chinasi c-kit (CD117) e il recettore ad alta affinità Fc per le IgE utile per la loro attivazione (Galli et al 2011). Il cross-linking del recettore Fc con un antigene multivalente induce l’aggregazione di due o più molecole con recettore Fc e attiva il segnale intracellulare che porta alla degranolazione e alla sintesi di nuovi mediatori. I

granuli contengono amine biogeniche (istamine e solo nei topi serotonina), proteoglicani (eparina e condroitinsolfato), serina-proteasi (triptasi, chimasi e carbossipeptidasi), citochine (come TNF alfa) e fattori di crescita (come il fattore di crescita vascolare endoteliale tipo a VEGFa) (Galli et al 2008). Le mastocellule nel SNC possono ritrovarsi in localizzazioni perivascolari più specificamente del lato leptomeningeale della BEE, che fa pensare ad un loro possibile contributo nel regolare il traffico di cellule immuni attraverso la BEE. Alcune evidenze che supportano il ruolo delle mastocellule in SM sono il fatto che sono state ritrovate nelle lesioni demielinizzanti, talvolta associate con gli infiltrati immuni nelle aree perivascolari, ma anche nel parenchima encefalico e si riscontrano più frequentemente nelle lesioni croniche piuttosto che nelle lesioni acute (Orr et al 1988; Secor et al 2000; Theoharides et al 1990). Inoltre le proteine mieliniche come la proteina basica della mielina (MBP) possono attivare le mastocellule nel ratto mediante l'interazione con i recettori degli scavenger (Brenner et al 1994; Medic et al 2008). Infine la concentrazione di triptasi delle mastocellule è stata riscontrata a livelli significativamente più alti nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SM (Rozniecki et al 1995).

Il sistema dei fagociti mononucleati comprende la linea di cellule ematopoietiche derivate dai loro progenitori del midollo osseo. Questi progenitori mieloidi si differenziano a formare i monociti circolanti e quindi mediante attivazione entrano nei tessuti a divenire macrofagi residenti. La microglia è il principale effettore del sistema immune innato che risiede nel SNC; ha un ruolo centrale nell'inizio della risposta infiammatoria acuta e nella bonifica del tessuto danneggiato fino alla cicatrizzazione. Durante le malattie infiammatorie, come l'SM, i monociti sono ripetutamente richiamati dalla periferia a rinforzare la reazione infiammatoria locale nel SNC. Nell'SM i macrofagi agiscono come APC perpetrando la diffusione di epitopi su cellule T che attraversano l'encefalo passando la barriera ematoencefalica (Hume et al 2006). Nella sostanza bianca normale si ha una

bassa espressione di MHC di classe II che viene up-regolata dopo un danno o una reazione immune originata in compartimenti sistemici o nell'ambiente locale. Bassi livelli di endotossine circolanti possono innescare l'espressione di MHC di classe II sui macrofagi perivascolari, questo fatto ci fa ipotizzare il perché le infezioni possono essere correlate alle ricadute. L'inizio di uno stato immunocompetente di APC per la microglia innesca una cascata di cellule immuni, specialmente cellule T neuro-specifiche, propagazione e risoluzione di lesioni infiammatorie (Jack et al 2005).

Le cellule Th17 sono caratterizzate dalla produzione di un distinto profilo di citochine effettrici che includono IL17A, IL-17F, IL-6, IL-9, IL-21, IL-22, IL-23, IL-26, e TNF α ; queste hanno un ruolo centrale nel SNC per indurre infiammazione caratterizzata da richiamo di neutrofilo nel SNC e perdita mielinica (Iwakura e Ishigame 2006; Hofstetter et al 2005). Le cellule T che producono IL 17 (CD4+ o CD8+) sono state riscontrate in SM in fase acuta o cronica. Nella fase preclinica di malattia le Th17 sono state riscontrate tra le cellule mononucleate del sangue periferico ma non nel SNC. Inoltre le cellule Th17 sono state riscontrate con livello significativamente più alto nel liquido cerebrospinale di pazienti con SMRR durante ricadute, rispetto agli stessi pazienti durante remissione o rispetto ad altri pazienti con altra patologia neurologica (Brucklacher-Waldert et al 2009). Il complesso di produzione di IL17 correla con il numero di placche attive viste con la RMN e con la severità dell'SM (Hedegaard et al 2008; Matusevicius et al 1999). Le cellule T infiltranti e le cellule gliali all'interno del SNC inducono la produzione di IL17 esercitando una funzione patogena mediante l'innescamento della microglia; perciò l'esposizione a cellule microgliali porta a incrementare la produzione di IL6, MIP2, Ossido nitrico, fattori neurotonici e molecole di adesione. Infine l'azione di IL1b e IL23 incentiva la produzione di IL17 nella microglia e il rilascio di metalloproteinasi (MMP3) che distruggono la BEE e reclutano neutrofilo al sito di infiammazione. L'incremento dell'attività di proteasi permette

il richiamo di un grande numero di monociti e macrofagi che portano a danno mielinico e assonale cronico (Kawanokuchi et al 2008; Park et al 2005; Vojdani et al 2011).

Le terapie immunomodulanti e immunosoppressive vanno ad incidere sull'immunità adattativa ma non inibiscono quella innata, cioè non sono capaci di influire su cellule microgliali, macrofagi e cellule dendritiche, responsabili della progressione di malattia.

Riassumendo, l'autoimmunità mediata dalle cellule T autoreattive attiva il sistema immunitario innato (barriera epiteliale, recettori associati a pattern di patogeni di tipo toll-like) come prima linea di difesa dell'ospite, elicitando la tolleranza immunitaria. E' stato dimostrato che in molte vie il sistema immunitario innato (TLR 7, 3, 9, neutrofilii, macrofagi) offre l'interfaccia alla risposta adattativa non solo regolando il danno cellulare ma anche permettendo che le cellule T CD4+ autoreattive reagiscano contro gli oligodendrociti. Al fine di interrompere la cascata infiammatoria bisognerebbe tendere a inibire il trigger iniziale del sistema immunitario innato (Hernández-Pedro et al 2013).

Presentazione clinica e diagnosi

I sintomi e segni clinici di SM sono variabili e risultano nel coinvolgimento di vie sensitive, motorie, visive e di tronco-encefalo. La maggior parte dei pazienti presenta un decorso iniziale caratterizzato da episodi recidivanti-remittenti di sintomi neurologici nuovi o ricorrenti. Il primo evento clinico in questi pazienti è denominato sindrome clinicamente isolata (CIS) se non viene corroborato da una disseminazione spaziale (DIS) e temporale (DIT) all'RMN. La presenza di lesioni sottotensoriali o al midollo spinale in questi pazienti è il fattore predittivo più importante di conversione futura a SM clinicamente definita (Filippi et al. 1994). La presenza di positività di bande oligoclonali all'esame del liquor può avere un valore prognostico addizionale in pazienti con CIS e con lesioni compatibili all'RMN (Miller et al. 2005; Awad et al. 2010). L'esame del liquor (positivo nell'85% circa dei pazienti con SM) così come l'esecuzione di potenziali evocati sono di aiuto, ma vengono considerati solo come collaterali per la diagnosi. Una parte dei pazienti con SMRR (25-40%) sviluppa un decorso secondariamente progressivo dopo circa 20 anni dalla diagnosi con accumulo di disabilità progressivamente ingravescente e assenza o solo sporadiche ricadute (Lublin and Reingold 1996). Il decorso primariamente progressivo (10-15% dei pazienti) è definito dall'accumulo progressivo di disabilità dall'esordio con nessuna o minime ricadute e tipicamente è caratterizzato da una mielopatia progressiva con un'età più avanzata all'esordio e coinvolgente per la maggioranza uomini (Miller e Leary 2007). Esiste inoltre la forma progressiva recidivante caratterizzata da progressione dall'esordio ma con vere e proprie ricadute con recupero totale o parziale; è a tutti gli effetti malattia progressiva ma ha in se attività di malattia (Lublin et al. 2014). I criteri diagnostici utilizzati oggi sono i criteri di McDonald proposti nel 2001, rivisti nel 2005 e più recentemente nel 2011 (Polman et al. 2011). Si basano sull'evidenza di DIS e temporale DIT utilizzando la clinica o i dati di RMN. In breve si può dire che questi criteri per effettuare diagnosi di SM richiedono la presenza di almeno 2

attacchi o obiettività clinica/radiologica di almeno 2 lesioni o evidenza clinica obiettiva di 1 lesione con storia clinica di un attacco precedente. Con un attacco clinico la DIT può essere evidenziata dalla presenza simultanea alla RMN di lesioni captanti e non captanti il mezzo di contrasto o dalla presenza di nuove lesioni ad una seconda RMN effettuata in un qualsiasi tempo dopo l'esordio. La DIS invece consiste nell'evidenza di almeno una lesione in almeno due regioni caratteristiche (periventricolare, sottocorticale, sottotentoriale e midollo spinale). I criteri per SM primariamente progressiva includono un anno di progressione clinica più due dei seguenti criteri: riscontro di DIS nell'encefalo, DIS nel midollo spinale (almeno 2 lesioni in T2 nel midollo), bande oligoclonali positive o elevato index di IgG. In ogni caso è necessario effettuare diagnosi differenziale (neurite ottica/neuropatia infiammatoria, neuromielite ottica, mielopatia ischemica o genetica, demielinizzazione infiammatoria idiopatica, postvirale, patologie reumatologiche, infettive, sarcoidosi, CADASIL) (Tab1).

Esistono poi delle varianti cliniche molto meno comuni della SM che si presentano con caratteristiche cliniche e radiologiche atipiche; queste includono la sclerosi concentrica di Balò e la malattia di Marburg. Il segno radiologico che le caratterizza è la presenza di lesioni di SM tumefattive: grandi più di 2 cm di diametro associate ad effetto massa, edema e ring-enhancement. Anche la clinica è peculiare con sintomi che dipendono dalla localizzazione delle lesioni ma che includono afasia, agnosia, crisi epilettiche, deficit del campo visivo, sintomi non tipicamente riscontrabili in CIS o SM (Lucchinetti et al. 2008). La malattia di Marburg e la sclerosi concentrica di Balò sono caratterizzate da una rapida e fulminante evoluzione clinica con prognosi infausta. La variante di Marburg è caratterizzata da segni radiologici di lesioni demielinizzanti tumefattive nella sostanza bianca profonda; dal punto di vista anatomopatologico le lesioni sono simili a quelle di SM ma sono più distruttive e hanno più infiltrati infiammatori (Karussis 2014). Invece i cambiamenti patologici della Sclerosi concentrica di Balò sono unici e consistono in

alternate bande di tessuto normalmente mielinizzato e demielinizzato; questo pattern è stato descritto come risultante da insulto ipossico (Stadelmann et al. 2005)

Criteri diagnostici di McDonald per la Sclerosi Multipla: revisione del 2010	
Presentazione clinica	Ulteriori elementi necessari per la diagnosi
≥ 2 attacchi; evidenza clinica obiettiva di ≥2 lesioni o di 1 lesione con evidenza attendibile di un precedente attacco	Nessuno
≥ 2 attacchi; evidenza clinica obiettiva di 1 lesione	Disseminazione spaziale, dimostrata da: ≥1 lesione in T2 in almeno 2 delle 4 regioni tipiche della SM (periventricolare, juxtacorticale, sottotentoriale, midollare); oppure aspettare un ulteriore attacco clinico indicante una diversa regione del SNC
1 attacco; evidenza clinica obiettiva di ≥2 lesioni	Disseminazione temporale, dimostrata da: contemporanea presenza in qualunque momento di lesioni asintomatiche sia assunti che non assunti Gd; oppure una nuova lesione in T2 e/o assunte Gd alla RM di follow-up, senza badare al tempo trascorso da una RM di riferimento; oppure aspettare un secondo attacco clinico
1 attacco; evidenza clinica obiettiva di 1 lesione (CIS)	Disseminazione spaziale e temporale, dimostrata da: ≥1 lesione in T2 in almeno 2 delle 4 regioni tipiche della SM (periventricolare, juxtacorticale, sottotentoriale, midollare); oppure aspettare un ulteriore attacco clinico indicante una diversa regione del SNC; contemporanea presenza in qualunque momento di lesioni asintomatiche assunti che non assunti Gd; oppure una nuova lesione in T2 e/o assunte Gd alla RM di follow-up, senza badare al tempo trascorso da una RM di riferimento; oppure aspettare un secondo attacco clinico
Progressione neurologica insidiosa suggestiva di SM CP-I	Un anno di progressione della malattia (determinata retrospettivamente o prospettivamente) più 2 su 3 dei seguenti criteri: 1. Evidenza di disseminazione spaziale nel cervello sulla base di ≥1 lesione in T2 in almeno 2 delle 4 regioni tipiche della SM (periventricolare, juxtacorticale, sottotentoriale, midollare); 2. Evidenza di disseminazione spaziale nel midollo spinale sulla base di ≥2 lesioni in T2 a livello midollare; 3. Liquor positivo (evidenza di bande oligoclonali e/o indice di IgG elevato)
Se i criteri sono soddisfatti e non ci sono migliori spiegazioni per la presentazione clinica, la diagnosi è di “SM”; se c’è il sospetto, ma i criteri non sono pienamente rispettati, la diagnosi è di “possibile SM”; se durante la valutazione emerge un’altra diagnosi che spiega meglio la presentazione clinica, la diagnosi è di “non SM”	

Tab.1 Criteri diagnostici di Sclerosi Multipla. (Polman et al 2011)

Sclerosi Multipla: scenario terapeutico

Le terapie a disposizione

Prima del 1993 il trattamento dell'SM aveva limitate opzioni per controllare la malattia. La terapia infatti consisteva solo nel trattare in acuto le riaccerbazioni con i corticosteroidi e non si avevano trattamenti per modificare il decorso della malattia, fatta eccezione per alcuni farmaci immunosoppressori. Tra questi i più utilizzati erano Mitoxantrone (diidrossiantracenedione, MTX, antineoplastico con funzione di soppressione dei linfociti T e B e con effetto collaterale di cardiotoxicità), Azatioprina (AZA) e Ciclofosfamide, farmaci a cui oggi è riservato solo un ruolo marginale poiché diverse terapie di modulazione e di soppressione immunitaria hanno dimostrato un impatto più favorevole sull'attività infiammatoria della SM.

Nei primi anni 90 furono immesse in commercio le terapie iniettabili **Interferoni** (INF) beta 1a (**AVONEX**® e **REBIF**®) e 1b (**BETAFERON**®, **EXTAVIA**®) e il **Glatiramer acetato** (**GA**), (**COPAXONE**®) per ridurre l'attività di malattia. Gli interferoni sono proteine endogene coinvolte nella risposta immune contro agenti virali e batterici; i beta interferoni svolgono molteplici azioni incluse la stabilizzazione di BEE limitando l'entrata di cellule T nel SNC e la modulazione delle azioni dei linfociti T e B, alterando l'espressione di citochine (Yong et al. 1998; Dhib-Jalbut 2002). Esistono varie formulazioni di interferoni ma tutte sono iniettabili e mostrano la medesima efficacia; sono considerate di prima linea in pazienti con SMRR e CIS (Rudick et al. 1997). Gli effetti collaterali dell'interferone sono la sindrome flu-like, leucopenia e anemia, reazione al sito d'iniezione. Il Glatiramer acetato o copolimero è un complesso di 4 aminoacidi che mimano la proteina basica della mielina (MBP), uno degli autoantigeni target per le cellule T. La sua efficacia è paragonabile a quella degli interferoni e i suoi effetti collaterali sono

reazione al sito d'iniezione, reazione post-iniezione (flushing, fame d'aria, palpitazioni pochi minuti dopo l'iniezione a rapida e spontanea risoluzione) e raramente lipodistrofia con l'uso prolungato.

In una revisione dei dati ottenuti nell'ambito di studi di fase III (multicentrici randomizzati, in doppio cieco e controllati con placebo, di valutazione dell'efficacia delle terapie di immunomodulazione sui parametri di misura fisici, infiammatori) non sono state rilevate differenze sostanziali tra i diversi immunomodulanti negli effetti sulle ricadute, che sono risultate ridotte di circa il 30% con tutti i trattamenti, mentre solo alcuni dei preparati di IFN hanno mostrato anche un beneficio significativo sulla progressione della disabilità. Questi sono stati i trattamenti in uso per gli ultimi 20 anni e sono ancora considerati validi come terapia di prima linea per la SM-RR. I pazienti che presentano una ripresa dell'attività di malattia con le terapie di prima linea beneficiano di un passaggio a terapie con maggiore efficacia mentre un passaggio ciclico tra le terapie di prima linea è accettato solo per ragioni di safety e tollerabilità oppure in caso di presenza di anticorpi neutralizzanti (Prosperini et al., 2011, Kappos et al., 2005; Sorensen et al., 2003). Molte nuove terapie sono state immesse in commercio a partire dal 2010 andando ad espandere le opzioni di trattamento, utilizzando vie più maneggevoli di somministrazione e offrendo un miglioramento in termini di riduzione di ricadute.

Tra queste nel 2006 è stato approvato **Natalizumab (300 mg e.v. ogni 4 settimane, TYSABRI ®)** in Europa per pazienti adulti con SM-RR con alta attività di malattia nonostante terapia con INF beta o GA oppure che presentano una malattia rapidamente evolutiva. Natalizumab è un anticorpo monoclonale che si lega all'alfa 4 integrina, componente principale delle molecole di adesione sulle cellule immuni; così facendo interferisce con la trasmigrazione di queste cellule nel SNC (Coyle et al 2010). L'efficacia di Natalizumab è stata dimostrata negli studi AFFIRM (Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis) studio di fase III placebo/controllo e

SENTINEL (Safety and Efficacy of Natalizumab in Combination with Interferon Beta-1a in Patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis) (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Nel primo studio Natalizumab ha ridotto significativamente il tasso di ricadute, la progressione di disabilità a 3 e 6 mesi, il numero di lesioni GDp in T1 e la comparsa di nuove lesioni in T2 alla RMN (Polman et al., 2006). Invece lo studio SENTINEL ha messo in evidenza come Natalizumab in associazione con INF beta1a intramuscolo risultava in una maggiore riduzione dell'ARR rispetto al solo INF (Rudick et al., 2006). I dati preliminari a 5 anni dello studio TOP (TYSABRI Observational Program), della durata complessiva di 10 anni, hanno confermato l'effetto robusto di Natalizumab su ARR e progressione di disabilità nel post-marketing (Butzkueven et al., 2014). Un grande numero di studi osservazionali ha provato l'effetto benefico di Natalizumab nei pazienti con risposta subottimale a INF beta o GA (Río et al., 2012; Belachew et al., 2011; Castillo-Trivino et al., 2011; Prosperini et al., 2012; Putzki et al., 2010; Putzki et al., 2009; Putzki et al., 2010) suggerendo che Natalizumab è una valida opzione di switch. Per quanto riguarda la sicurezza la problematica principale riguarda il rischio di PML (Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva): a dicembre 2014 erano stati riportati 517 casi di PML associata a Natalizumab su un totale di 4.132.600 pazienti esposti con una mortalità del 23% (Multiple Sclerosis Research, 2014). Inoltre i dati di safety sono scarsi oltre i sei anni di esposizione. (O'Connor et al., 2014). I fattori di rischio per lo sviluppo di PML sono la positività degli anticorpi anti-JCV (John Cunningham virus), la precedente esposizione verso immunosoppressori e la prolungata esposizione a Natalizumab (> 24 mesi) (Bloomgren et al., 2012). Quindi l'uso di Natalizumab è raccomandato nei pazienti che non presentano anticorpi anti-JCV: questi pazienti dovranno poi essere testati nuovamente per gli anticorpi ogni 6 mesi per il rischio di sieroconversione. (Outteryck et al., 2013; Gorelik et al., 2010). Inoltre frequenti RMN sono raccomandate per avere segni precoci e subclinici di PML che possano essere associati ad un outcome migliore (Nicholas

et al., 2014). Alcuni studi hanno dimostrato come una precoce sospensione di Natalizumab possa associarsi ad un rebound dell'attività di malattia che complica il management del paziente che sospende questo farmaco (Planas et al., 2014); questo tuttavia è un dato controverso perché non è stato confermato in altri studi i quali riportano solo un ritorno all'attività di malattia preesistente (Fernández, 2013).

Nel settembre 2010 poi è stato approvato dall'FDA il primo trattamento orale per l'SMRR: **Fingolimod (0,5 mg)**, (**GILENYA**® disponibile in Italia da ottobre 2011) che agisce sul recettore della sfingosina 1-fosfato (S1P1) e blocca la fuoriuscita dei linfociti dai linfonodi, riducendo così nella circolazione periferica il numero dei linfociti, effettori iniziali della cascata infiammatoria associata alla distruzione della mielina. Evidenze precliniche inoltre hanno suggerito un suo ruolo diretto sul SNC (Chun and Hartung, 2010). In Europa questo farmaco è stato approvato per pazienti con SM-RR che mostrano un'alta attività di malattia nonostante terapia con almeno un farmaco disease-modifying (DMT) o che hanno una SM rapidamente evolutiva. Fingolimod è stato approvato sulla base di 2 studi randomizzati in doppio cieco: FREEDOMS (FTY720 Research Evaluating Effects of Daily Oral therapy in Multiple Sclerosis) e TRANSFORMS (Trial Assessing Injectable Interferon versus FTY720 Oral in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis) (Kappos et al. 2010, Cohen et al. 2010). Nel primo studio si è evidenziato come il Fingolimod 0,5 mg/die avesse un più basso tasso annualizzato di ricadute (ARR) a 12 mesi rispetto al placebo e nel secondo rispetto a INF beta 1a. In particolare l'ARR si è ridotta del 73,4% comparato con INF beta 1a e del 67,4% se comparato al placebo (Agius et al. 2014). Solo lo studio FREEDOMS ha riportato un miglioramento con Fingolimod in termini di riduzione del rischio di progressione di disabilità. Entrambi i trial hanno riscontrato un miglioramento statisticamente significativo alla RMN in termini di cambiamenti in volume cerebrale, allargamento di lesioni in T2 e lesioni gadolinio positive. Lo studio FREEDOMS II, uno studio su larga scala, in doppio cieco, randomizzato placebo/controllo, era simile per

caratteristiche al trial FREEDOMS ma la popolazione aveva un'età media più alta, una più lunga durata di malattia e più pazienti avevano già ricevuto un precedente trattamento con un altro disease modifying (DMT). I risultati sono stati simili a quelli dello studio FREEDOMS con una riduzione dell'ARR statisticamente significativa se comparata a placebo; inoltre è stato dimostrato miglioramento statisticamente significativo in termini di RMN. (Calabresi et al. 2014). Lo studio TRANSFORMS ha dimostrato che il Fingolimod è valido come switch terapeutico precoce, infatti passando da un'INF-beta1a i.m. a Fingolimod si osservava un effetto benefico sull'ARR e sull'attività in RMN (Khatri et al., 2011). Questo effetto positivo è stato confermato dall'evidenza nell'utilizzo post-marketing: i dati ottenuti dal Registro MS-Base (Multiple Sclerosis Database) hanno mostrato una riduzione significativa dell'ARR e migliori outcome di disabilità se i pazienti passavano a Fingolimod piuttosto che ad un altro DMT iniettabile (Jokubaitis et al., 2014; He et al., 2015). Nello studio osservazionale PANGAEA (Post-Authorization Non-interventional German sAfty of GilEnyA in RRMS patients) nella pratica clinica tedesca si sono ottenuti gli stessi risultati (Ziemssen et al., 2014). Negli studi sopramenzionati si valutava inoltre il profilo di sicurezza: gli eventi avversi più comunemente riportati erano bradicardia, disturbi della conduzione atrio-ventricolare, ridotta conta linfocitaria periferica, incremento delle transaminasi, edema maculare retinico e infezioni (herpes zoster). Nello studio TRANSFORMS si erano verificate due morti in pazienti che assumevano Fingolimod 1,25 mg: una per infezione da varicella zoster disseminata e una per encefalite da herpes simplex. A causa della bradicardia e del blocco atrioventricolare, causate dall'effetto di blocco del recettore S1P1 sui miotici cardiaci e che da un effetto simile all'effetto vagale, la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa devono essere monitorizzate per 6 ore dopo aver assunto la prima dose, in aggiunta ad un ECG al basale e a fine monitoraggio. L'effetto è tipicamente transiente per l'internalizzazione/desensibilizzazione del recettore S1P1. In uno studio di fase III in aperto la bradicardia si è

verificata nello 0,6% dei pazienti ed era più frequente in coloro che assumevano anche beta-bloccanti e bloccanti del canale del calcio (3,3%) (Gold R et al, 2014). Nella maggior parte dei pazienti gli eventi erano asintomatici e tutti avevano recuperato senza l'utilizzo di terapie. I pazienti con patologie cardiache preesistenti tendevano ad avere un blocco atrioventricolare di secondo grado Mobitz 1. La pressione arteriosa tendeva ad essere più alta nel primo mese e a stabilizzarsi successivamente. Per il rischio di herpes zoster le persone che non hanno storia di varicella o non sono vaccinate devono dosare gli anticorpi anti-VZV ed eventualmente effettuare il vaccino, post-ponendo l'inizio della terapia di almeno un mese. Sono stati riportati tre casi di PML in pazienti in terapia con Fingolimod senza precedente esposizione a Natalizumab, tuttavia la relazione causale tra Fingolimod e il verificarsi di PML in questi pazienti rimane di incerta interpretazione, ma resta aperta la possibilità che seppur raramente possa verificarsi.

Nel settembre 2012 è stato approvato dall'FDA un secondo trattamento orale per la SM: **Teriflunomide (14 mg/die, AUBAGIO®**, disponibile in Italia da agosto 2014), metabolita attivo della leflunomide, farmaco di trattamento già in uso per l'artrite reumatoide. Il farmaco va ad inibire la diidroorotato deidrogenasi, enzima responsabile della sintesi delle pirimidine. Attraverso l'inibizione di questo enzima la teriflunomide altera la produzione di acidi nucleici necessaria per la proliferazione dei linfociti attivati e coinvolti nella cascata infiammatoria responsabile della distruzione della mielina. Questo farmaco è stato approvato dall'FDA in base ai risultati di uno studio clinico di fase tre, randomizzato, in doppio cieco, intitolato TEMSO (Teriflunomide Multiple Sclerosis Oral Trial). In aggiunta sono stati presi in considerazione per l'approvazione uno studio di fase II randomizzato, in doppio cieco, placebo-controllo e 2 piccoli studi randomizzati, in doppio cieco, in add on. Nello studio TEMSO sono stati randomizzati 1088 pazienti a ricevere teriflunomide 7 mg/die, o teriflunomide 14 mg/die per 108 settimane. Il primo end-point di efficacia era l'ARR. Entrambi i dosaggi di teriflunomide si sono dimostrati superiori al placebo nel

ridurre la relapse-rate del 31,2% per il gruppo di 7 mg/die e del 31,5% per il 14 mg/die. Entrambi i gruppi di trattamento con teriflunomide si sono dimostrati superiori al placebo nel ridurre la progressione di disabilità e nel miglioramento di vari parametri di RMN inclusi il volume totale delle lesioni e le lesioni gadolinio positive. I risultati dello studio TEMSO sono stati confermati nello studio TOWER (Teriflunomide Oral in People with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis) dove si è riscontrata una riduzione dell'ARR del 22,3% per il 7 mg/die e del 36,3% per il 14 mg/die. Solo per il dosaggio di 14 mg/die si è riscontrato un miglioramento nel tempo in termini di accumulo di disabilità. (Confavreux et al 2014; Miller et al. 2014). Lo studio TOPIC ha valutato il time to relapse in pazienti con CIS trattati con Teriflunomide, ottenendo una riduzione del 42,6 % per il 14 mg/die e del 37,2 % per il 7 mg/die (Miller et al. 2014). Lo studio TENERE ha invece comparato Teriflunomide nei due dosaggi con INF beta 1a 44 mg /3 vv a settimana, non riscontrando alcuna differenza statisticamente significativa in termini di ARR e tempo di fallimento (ricaduta o sospensione del farmaco) (Vermeersch et al, 2014). In tutti gli studi clinici è stato valutato il profilo di tollerabilità e sono stati riportati i seguenti eventi avversi: cefalea (18%), aumento di ALT (13%), diarrea (13%), alopecia (10%). La causa più comune di sospensione è stata l'incremento delle ALT che si è registrata nel 3,3% per il 7 mg/die e nel 2,6 % per il 14 mg/die. Pertanto il monitoraggio degli enzimi epatici è raccomandato al basale e poi mensilmente per i primi 6 mesi poi ogni 6 mesi. Non sono stati riportati tumori maligni o malattie linfoproliferative sebbene i trial non siano durati abbastanza a lungo per escludere del tutto questo rischio. E' stata riportata una morte per sepsi da *Klbsiella pneumoniae* in un paziente che assumeva Teriflunomide a 14 mg/die. Altre due morti si sono verificate nelle braccia di trattamento con Teriflunomide ma non erano correlate al trattamento. Altri eventi avversi associati con teriflunomide includono neuropatia periferica (1,1%-1,9%), ipertensione (3,1%-4,3%) e rash cutaneo. La Teriflunomide ha un effetto potenzialmente teratogeno per la sua attività di inibizione della sintesi degli acidi nucleici

per cui la contraccezione è fortemente raccomandata sia nelle donne che negli uomini poiché stato riscontrato il farmaco anche nel liquido seminale. Le pazienti che vanno incontro ad una gravidanza devono effettuare una rapida eliminazione del farmaco con la colestiramina per ridurre il rischio di complicazioni fetali e malformazioni.

Nel marzo 2013 è stato approvato dall'FDA il **Dimetilfumarato (240 mg x 2/die, TECFIDERA®**, disponibile in Italia con rimborsabilità da gennaio 2015), noto anche come DMF o BG12, il cui meccanismo d'azione non è completamente delineato: è noto che il DMF e il suo metabolita attivo (monometilfumarato o MMF) attiverebbero la via del fattore nucleare 2 (nrf2) che è coinvolto nella risposta della cellula allo stress ossidativo. Il MMF è un agonista recettoriale dell'acido nicotinico. Sulla base del suo meccanismo d'azione il DMF potrebbe avere proprietà neuroprotettive per i neuroni e potrebbe inoltre modulare la risposta immune. L'approvazione del DMF è stata basata su un piccolo studio di fase 2 e su due studi più ampi placebo/controllo di fase 3 CONFIRM (Comparator and an Oral Fumarate in RRMS) e DEFINE (Determination of the Efficacy and Safety of Oral Fumarate in RRMS). In questi studi il DMF ha ridotto in maniera significativa (di circa il 45%) l'ARR su un periodo di 2 anni e dimostrato un miglioramento significativo degli endpoint di RMN comparato a placebo (Fox et al. 2012; Gold et al. 2012). Sebbene nello studio CONFIRM fosse preso in considerazione il GA come farmaco comparatore il trial non era disegnato per dimostrare una superiorità o non inferiorità del DMF rispetto al GA. Nello studio DEFINE il tasso di progressione di disabilità era significativamente migliorato con il DMF bigiornaliero, risultato non evidenziato nello studio CONFIRM. Per quanto riguarda il profilo di sicurezza dagli studi è emerso che i più comuni effetti collaterali includono flushing (40%), nausea (12%), dolore addominale (18%) e diarrea (14%). Il flushing di solito si autolimita permanendo circa per una settimana e può essere prevenuto assumendo DMF con il cibo o premedicando il paziente con aspirina. Anche gli effetti collaterali gastrointestinali di solito sono autolimitanti, durando circa 2-4 settimane dopo

aver iniziato il DMF. Altre reazioni avverse comuni includono linfopenia e elevazione delle transaminasi. Per il rischio di linfopenia è raccomandato il controllo della formula leucocitaria prima dell'inizio del trattamento e poi annualmente. Negli studi l'incremento delle AST è stato riscontrato nel 4% della popolazione, principalmente nei primi 6 mesi di terapia. Nel novembre 2014 l'FDA ha comunicato una morte in DMF per PML, in una paziente con severa linfopenia; altre due con le stesse caratteristiche hanno fatto seguito. Quindi il monitoraggio programmato del livello dei linfociti è uno strumento utile per evidenziare quei pazienti a più alto rischio di PML. Inoltre sono state resi noti altri 4 casi di PML in pazienti trattati con altre forme di acido fumarico. La safety di questo farmaco è ancora oggetto di studio sebbene attualmente siano stati trattati più di 100000 pazienti.

Nel febbraio 2014 è stato approvato dall'FDA (non ancora disponibile in Italia) il **Glatiramer Acetato (GA) ad alto dosaggio** che offre un minor numero di somministrazioni (tre volte a settimana anziché giornaliera). La nuova formulazione è simile a quella del dosaggio tradizionale essendo costituita da una catena amionocidica che mima la proteina basica della mielina. Il GA funziona come un bersaglio alternativo allo strato della mielina per l'attacco delle cellule immunitarie, in più funziona in modo multifattoriale come un immunomodulante nel deviare l'attivazione dei T-helper dal tipo 1 (risposta infiammatoria immunomediata) al tipo 2 (risposta T-helper cellulare). (Yong et al. 2002). Nei trial che hanno studiato la nuova formulazione non si sono evidenziate differenze statisticamente significative negli outcome primari (34% di riduzione dell'ARR, 45% di riduzione di nuove lesioni in T2 alla RMN), così come sul profilo di tollerabilità (la reazione al sito di iniezione consistendo in eritema, prurito e dolore rimane l'effetto più comune).

Nell'agosto 2014 è stato approvato dall'FDA l' **Interferone beta 1a PEGILATO (PLEGRIDY ®)** per la SMRR, sottoforma di iniezione sottocutanea di 125 mg ogni 2 settimane. L'INF pegilato ha la stessa farmacodinamica dell'INF beta 1a ma a causa della

pegilazione ha diverse proprietà farmacocinetiche (l'INF beta 1a è attaccato in modo covalente all'alfa-amino gruppo N terminale al glicole polietilenico). L'efficacia e la tollerabilità del PEG-interferon è stata stabilita nello studio ADVANCE, studio placebo/controllo randomizzato in doppio cieco, con una riduzione statisticamente significativa dell'ARR, della disabilità e delle lesioni in T2. Gli eventi avversi più comunemente riportati sono eritema al sito d'iniezione (59%), flu-like (50%), febbre (41%), cefalea (41%), mialgie (19%) e dolore al sito d'iniezione (14%) e si sono verificati con una frequenza simile tra i due gruppi.

Nel novembre 2014 è stato approvato dall'FDA **Alemtuzumab (LEMTRADA®)**, disponibile in Italia con rimborsabilità da aprile 2015), anticorpo monoclonale umanizzato che lega il CD52 su linfociti e monociti, riducendo prontamente queste due popolazioni dalla circolazione mediante una citolisi cellulo-mediata anticorpo-dipendente, una citolisi mediata da complemento e una induzione di apoptosi (Freedman et al., 2013) e portando così a ridurre la patogenesi della risposta infiammatoria dell'SM. Una volta somministrato questo farmaco rimane all'interno del torrente circolatorio e dello spazio interstiziale e ha un volume di distribuzione di 14 L. E' generalmente eliminato completamente dal corpo entro 30 giorni dal trattamento e ha una emivita media di due settimane. La dose standard è 12 mg/die per 5 giorni consecutivi, seguita 12 mesi dopo da 12 mg/die per 3 giorni consecutivi. La sua approvazione si è basata su 1 studio di fase 2 e 2 studi clinici randomizzati CARE-MS I e CARE-MS II (Comparison of Alemtuzumab and Rebif Efficacy in Multiple Sclerosis) (Cohen et al 2012, Coles et al 2012). In questi studi i pazienti che ricevevano Alemtuzumab avevano una riduzione dell'ARR tra il 47 e il 55% rispetto all'INF beta 1 a. Un miglioramento in termini di progressione di disabilità a sei mesi è stato osservato nel CARE-MS II ma non nel CARE-MS I, sebbene una conferma di progressione di disabilità a tre mesi non fosse riportata da nessuno dei due trial. (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2012). L'approvazione di questo farmaco è stata ritardata per il suo

profilo di safety: gli eventi avversi più comunemente riportati erano sintomi legati all'infusione tra cui rash, cefalea, sintomi similinfluenzali e meno frequentemente transitoria ricorrenza di sintomi pregressi di SM (Genzyme Therapeutics Ltd, 2014; Coles 2013). I più comuni eventi avversi consistono in trombocitopenia idiopatica e patologie autoimmuni della tiroide che possono insorgere mesi o anni dopo rispetto al trattamento. Quindi il trattamento richiede un monitoraggio stretto che include emocromo e ormoni tiroidei e un alto livello di vigilanza da parte del medico e del paziente. Inoltre per le riportate reazioni associate all'infusione, si raccomanda che i pazienti siano premedicati con corticosteroidi nei 3 giorni precedenti ciascun ciclo di trattamento; in aggiunta è da prendere in considerazione l'uso di antistaminici e antipiretici. La profilassi antivirale con Aciclovir 200 mg x 2/die viene effettuata durante il trattamento e per almeno due mesi dopo il completamento del ciclo. Alemtuzumab è stato indicato come trattamento di prima linea in pazienti con con SM ad alta attività di malattia, ma viene più comunemente utilizzato come terapia di seconda o terza linea nella pratica clinica. (Fig. 3)

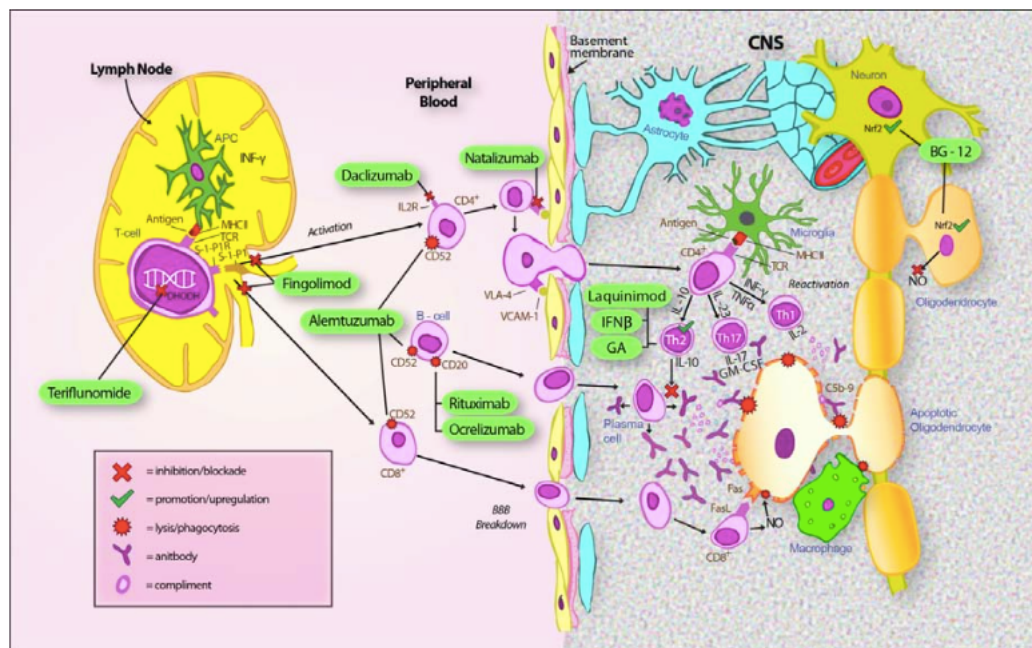


Fig 3: Schematica rappresentazione della fisiopatologia della Sclerosi Multipla con i punti di intervento dei vari farmaci.(Buzzard et al 2012)

Il rischio di PML

La leucoencefalopatia multifocale progressiva è una malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale che porta a morte o a gravi disabilità. E' caratterizzata dalla distruzione degli oligodendrociti che producono mielina e si riscontra nei pazienti immunocompromessi. In particolare si ritrova in pazienti con deficit dell'immunità cellulare, inclusi pazienti con HIV, patologie ematologiche o in terapia con immunosoppressori. Dal 1980 al 2008 è stata responsabile del 4-5 % delle morti in pazienti HIV. Il virus JC (John Cunningham) è l'agente etiologico e il suo genoma codifica per 6 geni tra cui quelli per antigeni T, proteine capsidiche e altri geni regolatori. La presenza di JCV è frequente nel tratto urinario di individui sani e immunocompromessi, ma quando lo si riscontra in sangue e liquor di pazienti con PML ha una forma mutata con inserzioni e duplicazioni. L'ipotesi attualmente più accettata è che la PML avvenga come conseguenza di una riattivazione del virus JC latente nei reni, portando ad una viremia e alla conseguente invasione del SNC. Questo però è un aspetto controverso poiché in alcuni individui sani è stato riscontrato il JCV nell'encefalo così come in individui con PML non è stata riscontrata alcuna viremia (Nali et al 2014).

Il rischio di PML è sicuramente aumentato nei pazienti in terapia con Natalizumab, tuttavia recentemente sono stati riportati tre casi di PML in pazienti trattati con Fingolimod e tre in pazienti trattati con DMF, senza storia di precedente esposizione a Natalizumab. Il primo caso di PML in Fingolimod è stato riportato nel 2013: si trattava di un paziente di 49 anni in terapia con Fingolimod da 4 anni; il paziente aveva una storia di malattia di 5 anni ed era stato trattato in precedenza con Interferon beta 1 a (Rebif®) per 10 mesi oltre a brevi cicli di corticosteroidi prima e durante il Fingolimod. All'epoca l'azienda produttrice rese noto che approssimativamente 71000 pazienti erano in trattamento e non furono pubblicate raccomandazioni particolari in merito da parte degli organi di farmacovigilanza. Poi un secondo caso si è verificato con un paziente di 54 anni che assumeva fingolimod da circa 2

anni e mezzo; era stato trattato in precedenza con INF beta 1 b per 11 anni insieme a mesalazina per colite ulcerosa negli ultimi 4 anni. Un terzo caso è stato reso noto pochi mesi fa in un paziente che aveva una storia di cancro del colon retto trattato con chemioterapia e radioterapia e di malattia di Crohn. La casa produttrice ha affermato che più di 125.000 pazienti sono stati trattati con fingolimod e che 2400.00 pazienti/anno sono stati coinvolti tra trial clinici e post-marketing e quindi che rimane un alto profilo di rischio/beneficio a favore di questo farmaco. Per quanto riguarda DMF invece si trattava di pazienti con una conta linfocitaria bassissima per un lungo periodo di tempo; l'EMA ha quindi pubblicato in merito a questo farmaco nuove raccomandazioni. Per DMF si parla comunque di 112.000 pazienti-anno e 135.000 pazienti esposti (Rosenkranz T et al 2015). Se per Natalizumab il meccanismo d'azione, con la riduzione dell'immunosorveglianza nel SNC, pare in parte spiegare l'aumento dell'incidenza di PML, per Fingolimod e DMF il meccanismo d'azione non sembra spiegare l'aumento del rischio. A questo punto è importante capire se i dati appena esposti definiscano o meno un rischio significativamente aumentato anche con questi due farmaci. A questo proposito è stato messo a punto un normografo che consentirà al clinico di interpretare i dati che divengono mano a mano disponibili: il normografo mostra infatti la relazione tra numero di PML osservate (sulle Y) e il numero di pazienti-anno osservati (sulle X) (Van Schependom J et al 2015). Esaminando i casi di PML presenti al momento con Fingolimod e DMF, confrontando il rischio con quello di una popolazione di controllo (dove la PML ha un'incidenza di 3 casi per milione di persone) non si può stabilire un aumento significativo del rischio di PML con questi due farmaci. Da considerare che il rischio di PML con Natalizumab è stato stabilito con il passare del tempo (aumento dell'incidenza su lungo periodo di trattamento) al momento non possiamo stabilire che un'esposizione a Fingolimod e DMF prolungata nel tempo non porti ad un incremento del rischio anche per questi due farmaci.

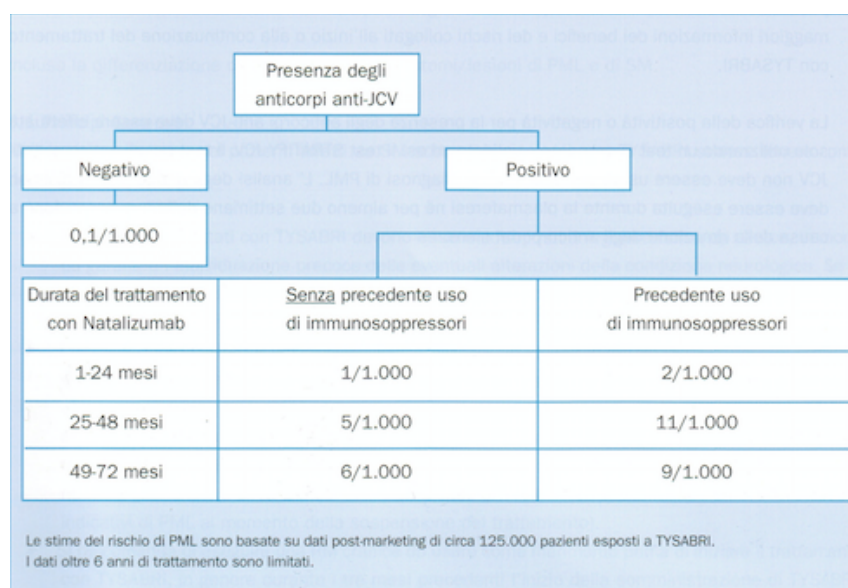
Per quanto riguarda Natalizumab i casi di PML sono drasticamente aumentati da 42 casi nel 2010, a 372 casi a giugno 2013, fino a 566 casi a giugno 2015 (Honice JM et al 2015)

Index result	PML risk estimates per 1000 patients (no prior IS use)		
	1-24 months (95% CI)	25-48 months (95% CI)	49-72 months (95% CI)
≤0.9	0.1 (0-0.41)	0.3 (0.04-1.13)	0.4 (0.01-2.15)
≤1.1	0.1 (0-0.34)	0.7 (0.21-1.53)	0.7 (0.08-2.34)
≤1.3	0.1 (0.01-0.39)	1.0 (0.48-1.98)	1.2 (0.31-2.94)
≤1.5	0.1 (0.03-0.42)	1.2 (0.64-2.15)	1.3 (0.41-2.96)
>1.5	1.0 (0.64-1.41)	8.1 (6.64-9.8)	8.5 (6.22-11.38)

PML risk estimates for anti-JCV antibody index thresholds were calculated based on the current PML risk stratification algorithm (from September 2012) and predicted probabilities shown in Table 1 for the population at or below that particular index (0.9-1.5) and for the population above an index of 1.5. For index thresholds below 0.9, patient numbers were insufficient to allow for calculation of risk estimates.

Tab 2. Index anticorpale anti-JCV. (Plavina et al 2014)

per cui il rischio globale di PML è stimato essere 3,96 per 1000 pazienti. La presenza di anticorpi versus JCV è un fattore di rischio per lo sviluppo di PML: recentemente questo rischio viene ulteriormente stratificato mediante il calcolo dell'index (livello anticorpale). Un index >1,5 indica positività con un rischio di 1 su 1000 di sviluppo di PML, mentre un valore inferiore attesta un rischio di 0,1 su 1000 (Tab 2). Il rischio aumenta se i pazienti hanno una lunga durata di trattamento con un picco oltre i 24 mesi di 5 per 1000. Se poi si



Tab 3. Stratificazione del Rischio di PML. (Linee guida Tysabri versione 14, maggio 2015)

ha una storia precedente di esposizione a immunosoppressori il rischio arriva a 11 su 1000 (JCV positivi con esposizione tra 25 e 48 mesi) (Tab 3).

La mortalità per PML in Natalizumab si attesta intorno al 22%, significativamente inferiore rispetto alla mortalità per PML nei pazienti HIV (40-50%). Coloro che sopravvivono riportano disabilità significative nel 90% dei casi. La presentazione clinica è eterogenea e può includere deficit neurologici focali o non focali che riguardano il comportamento, la sfera motoria, il linguaggio e le funzioni visive. I deficit cognitivi sono i più comuni. I sintomi precoci sono subdoli e mimano una riesacerbazione di sclerosi multipla, i sintomi tardivi possono essere diagnosticati erroneamente come ictus o crisi epilettiche (le crisi sono riportate in un 20% dei pazienti con PML). Quindi la PML nei pazienti che assumono Natalizumab va presa in considerazione al presentarsi di un nuovo sintomo neurologico qualsiasi. La diagnosi si pone combinando la clinica con il riscontro di segni tipici alla RMN e con il riscontro del DNA del JCV nel liquor dei pazienti (la PCR per il DNA del JCV ha sensibilità 80% e specificità 90%, una negatività del liquor non esclude la diagnosi poiché la carica virale può essere bassa e molti test non si positivizzano se la carica virale è inferiore a 200 copie/mL). La RMN resta lo strumento più utile per la diagnosi: la PML si manifesta come una o più iperintensità in T2/Flair nella sostanza bianca (SB) con distribuzione periferica, bilaterale ma asimmetrica. Le lesioni variano di forma, dimensioni e si accrescono fino a divenire confluenti quando la malattia progredisce. Classicamente le lesioni coinvolgono le fibre a U in quasi tutti i casi; questo coinvolgimento sottocorticale porta al formarsi di un orletto periferico tra la superficie delle lesioni e la corteccia sovrastante mentre il bordo più profondo resta maldefinito (Fig 4). Il coinvolgimento della corteccia sovrastante, mentre originariamente era considerato raro è stato sempre più frequentemente riportato. Essendo la malattia tipicamente periferica la SB periventricolare è di solito risparmiata. Nelle immagini T1 pesate la SB diviene mano a mano ipointensa, mentre nelle immagini pesate in T2 le lesioni si presentano con aspetto microcistico o

granulare. Un riscontro più raro, che avviene più frequentemente nelle fasi precoci è il cosiddetto “milky-way” sign: puntiformi iperintensità visibili in FLAIR (Gerevini S. et al 2015). Il coinvolgimento della corteccia è presente in circa l’83% dei casi. A livello sopratentoriale riguarda principalmente i lobi parietali, occipitali e frontali, può infiltrare il

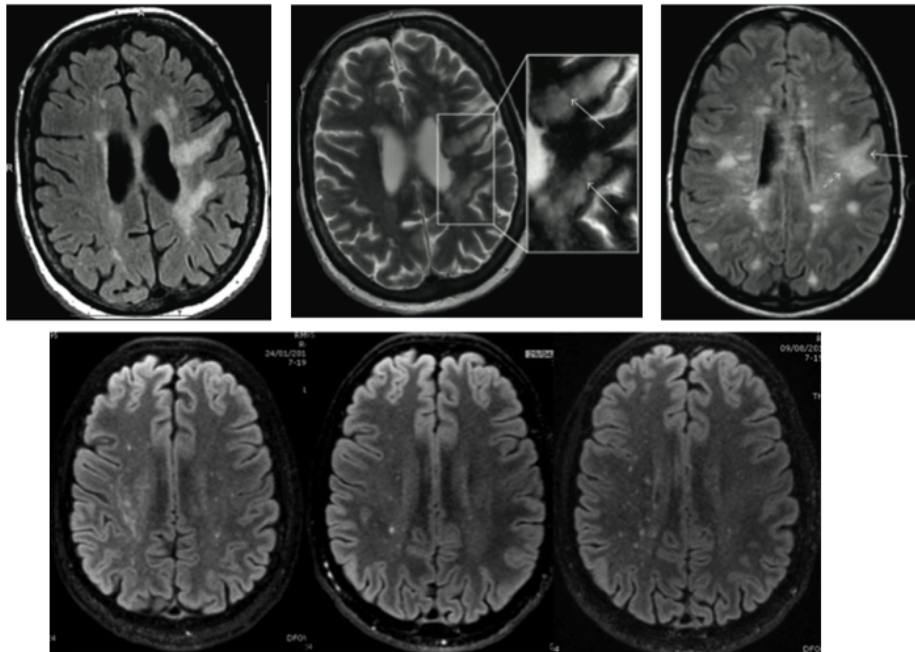


Fig 4: Caratteristiche RMN di PML (in senso orario) bordo maldefinito, aspetto microcistico, flair coinvolgimento fibre a U, milky-way sign

corpo calloso. Frequentemente c’è coinvolgimento della fossa posteriore, in particolare del cervelletto e dei peduncoli cerebellari medi. I nervi ottici e il midollo spinale sono risparmiati. La captazione di contrasto nella PML da natalizumab è maggiore rispetto a quanto non si verifichi nella PML da HIV; il pattern di captazione è variabile può essere lineare, nodulare o periferico e in alcuni casi ha un pattern perivascolare. Una volta diagnosticata la malattia l’unica cosa che si può fare è sospendere il trattamento; vi sono poi controversie riguardo l’uso di plasmateresi per rimuovere rapidamente il farmaco dall’organismo in modo da rendere di nuovo l’individuo immunocompetente. Infatti alcuni sostengono che la plasmateresi sia un modo di accelerare il verificarsi della Sindrome da Immunoricostruzione (IRIS): risposta immune esaltata verso l’agente virale che porta a danno mediato dall’infezione a neuroni infetti e non infetti. L’IRIS si può verificare

anche in assenza di plasmateresi, in questo caso avviene più tardivamente. La terapia per l'IRIS consiste in corticosteroidi ad alto dosaggio per ridurre la cascata infiammatoria.

Nuovi farmaci in studio

Tra i farmaci di prossima approvazione vi sono altri 3 anticorpi monoclonali: Daclizumab, Ocrelizumab e Rituximab. Il Daclizumab è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato contro il CD25 che ha ricevuto l'approvazione nel 1997 per la prevenzione del rigetto di trapianto renale. Il farmaco si lega e blocca la subunità alfa del recettore dell'IL2 ad alta affinità (CD25), molecola di membrana espressa sulla superficie delle cellule T attivate; bloccando il CD25 blocca l'espansione delle cellule T risultando in soppressione dell'infiammazione. Daclizumab inoltre causa l'espansione delle cellule NK CD56, che inibiscono la sopravvivenza delle cellule T CD4+ attivate. E' stato associato con un miglioramento dei parametri di RMN come misura dell'attività di malattia (78% di riduzione delle lesioni captanti in uno studio di fase II), riduzione del tasso di ricadute (di circa il 50%) e progressione di disabilità. Generalmente è ben tollerato, può causare infezioni banali delle alte vie aeree, nasofaringiti e infezioni dal tratto urinario. Un paziente in uno studio di fase II è stato ricoverato per infezione cutanea ed è deceduto per le complicanze di un ascesso muscolare non diagnosticato.

L'Ocrelizumab è un'immunoglobulina umanizzata anti CD20 espressa sui linfociti B. In uno studio randomizzato placebo/controllo di fase II Ocrelizumab (600 o 2000 mg ev al giorno 1 e 15 di due cicli distanti circa 6 mesi) ha ridotto il numero di nuove lesioni Gdp alla RMN, così come ha ridotto L'ARR. Negli studi in corso non sono stati riportati eventi avversi seri, mentre in studi per il LES (Lupus eritematoso sistemico) e per l'AR (artrite reumatoide) si erano verificati e avevano portato ad interruzione degli stessi.

Il Rituximab invece è un anticorpo monoclonale umano/murino chimerico che va anch'esso a legare il CD20 espresso sui linfociti B. In uno studio randomizzato di fase II placebo/controllo Rituximab (1000 mg al giorno 1 e 15) ha ottenuto una riduzione delle

ricadute e delle lesioni Gdp. Gli effetti collaterali sono cefalea, nausea, prurito, iperpiressia, fatica, irritazione faringea e dolore faringo-laringeo.

Tra gli orali ancora in studio vi è Laquinimod, un chinolone carbossiamidico che agisce modulando la risposta immune infiammatoria e interferendo con il traffico cellulare; può avere inoltre effetti neuroprotettivi. Agisce inibendo la migrazione nel SNC riducendo la responsività del VLA-4 alle chemochine L21 (CCL21) prodotte dai linfociti T e dalle cellule endoteliali nel SNC infiammato; inoltre shifta il profilo di citochine verso un profilo Th2/Th3, riduce l'entrata delle cellule T autoreattive nel SNC e sopprime la presentazione dell'antigene da parte delle molecole MHC di classe II. Inoltre favorisce la secrezione del fattore neurotrofico brain-derived (BDNF) esercitando un possibile ruolo neuroprotettivo. Negli studi clinici laquinimod (0,3 o 0,6 mg/die) è stato associato con riduzione dei parametri clinici e di RMN. Gli effetti collaterali più comunemente riportati sono stati incremento degli enzimi epatici, dei livelli di fibrinogeno, infezioni respiratorie, cefalea, insonnia, nausea e vomito, vertigini, artiglia, diarrea, tosse, dolori muscolari. Sono in corso studi di fase 3 (Tanasesku et al 2014).

La decisione terapeutica

Come abbiamo visto al momento sono disponibili diverse terapie immunomodulanti e immunosoppressive in grado di modificare il decorso della SMRR. Al contrario, l'effetto di queste terapie sul decorso dei fenotipi progressivi di SM è scarso o quantomeno modesto. La scelta tra le diverse opzioni terapeutiche disponibili per il trattamento della SM può porre comunque dei problemi per l'elevata variabilità delle manifestazioni e del decorso clinico. Oltre alla scelta del tipo di farmaco, è oggi oggetto di discussione anche quando decidere di iniziare o cambiare un trattamento e in base a quali parametri soglia di attività di malattia.

Considerando il complesso dei processi patologici che sottostanno all'SM e l'eterogeneità clinica, sono stati messi a punto dei parametri per determinare l'attività di malattia. Attualmente solo ricadute, progressione della disabilità e attività alla RMN, ma non la perdita di volume cerebrale (BVL brain volume loss) sono outcome comunemente usati nella routine clinica. Per la progressione di disabilità l'utilizzo della scala EDSS può non essere molto sensibile poiché si focalizza sulle capacità di deambulazione e manca di una valutazione complessiva e adeguata dello stato cognitivo e delle capacità visive (Balcer, 2001). Inoltre misurare il BVL può catturare cambiamenti patologici subdoli che non sono evidenziati dagli altri tre parametri comunemente utilizzati; infatti la BVL inizia nelle fasi precoci di malattia ed è stata correlata con disabilità e disturbi cognitivi (De Stefano et al., 2014; Amato et al., 2012; De Stefano et al., 2010) ed è considerato inoltre come marker di neurodegenerazione (Popescu et al., 2013; Filippi et al., 2013). Il parametro di NEDA (no evidence of disease activity) è definito come nessuna ricaduta, nessuna progressione in base all'EDSS, non nuove lesioni all'RMN (T1 gdp e/o lesioni attive in T2) (Havrdová et al., 2009; Giovannoni et al., 2011). Quando si cerca di ottimizzare o definire un trattamento bisogna considerare tutti i parametri a disposizione: ricadute, lesioni all'RMN, la progressione di disabilità e il BVL. In aggiunta è da valutare il profilo di rischio/efficacia

dei farmaci disponibili. Quindi sono da considerare come terapia nei pazienti naive INF beta pegilato e non, GA; anche Teriflunomide e DMF sono considerati terapia di prima linea tuttavia si tratta di immunosoppressori e il loro profilo di rischio merita da parte del medico un'attenzione ulteriore. Fingolimod, Natalizumab e Alemtuzumab sono riservati ai pazienti con malattia attiva nonostante le terapie di prima linea. Far passare un paziente precocemente ad un trattamento di alta efficacia può cambiare veramente il decorso di malattia e consentire un controllo a lungo termine; d'altra parte maggior efficacia significa maggiori rischi e quindi la necessità di controllo più attento da parte del medico, senza considerare che non si hanno dati di sicurezza a lungo termine per i farmaci di seconda linea. (Fig 5. Algoritmo terapeutico)

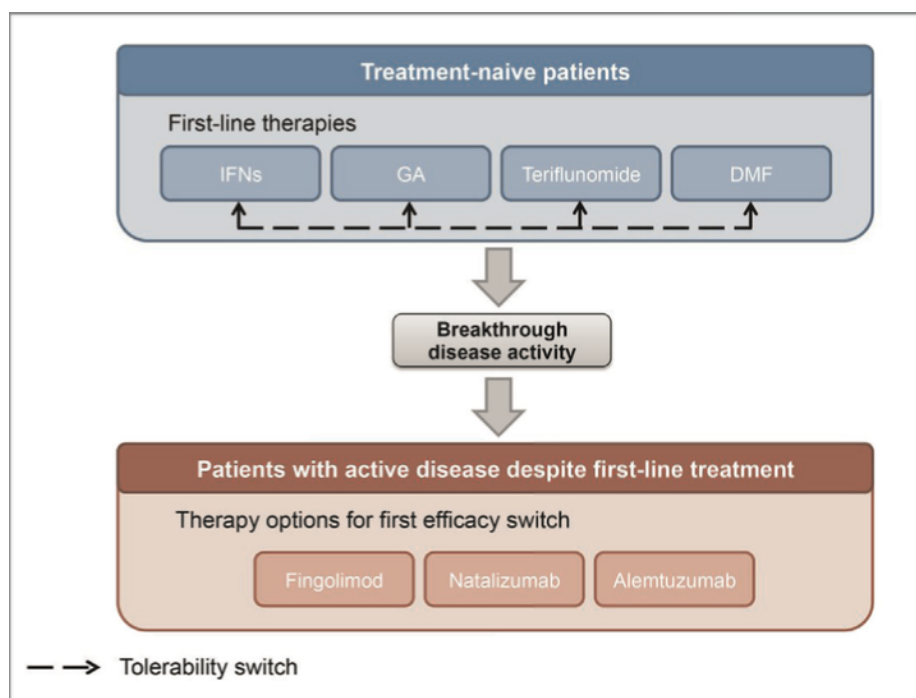


Fig. 5. Algoritmo terapeutico. (Ziemssen et al 2015)

Sequestro linfocitario versus cross-trafficking blockade

Razionale dello studio

L'obiettivo di questo studio osservazionale è quello di comparare le variabili al basale, di risposta terapeutica e di tollerabilità tra pazienti con SMRR afferenti all'ambulatorio per le malattie demielinizzanti trattati con natalizumab e con fingolimod.

Metodi

Nello studio sono stati inclusi pazienti con SMRR afferenti all'ambulatorio per le malattie demielinizzanti della Clinica Neurologica dell'AOUP trattati con Tysabri® o Gilenya®. Natalizumab è stato disponibile al nostro centro a partire dal giugno 2008, mentre fingolimod è stato impiegato al nostro centro a partire da giugno 2011 nell'ambito di studi clinici e prescritto poi dall'aprile 2012. I dati sono stati raccolti fino a settembre 2015 considerando i pazienti che avevano intrapreso natalizumab o fingolimod tra giugno 2008 e febbraio 2015. I criteri di inclusione erano avere diagnosi di Sclerosi Multipla in base alla revisione del 2010 dei criteri di McDonald (Polman et al. 2011) anche in accordo con i criteri di prescrivibilità posti dall'AIFA per questi due farmaci. In aggiunta come previsto dai criteri di prescrizione/rimborsabilità di entrambe le terapie era richiesto un fallimento della terapia di prima linea (per inefficacia o eventi avversi) o una elevata attività di malattia per i pazienti naive. La scelta dell'uno o dell'altro farmaco, una volta disponibili entrambi, è stata effettuata sulla base delle caratteristiche di malattia, sulla presenza o meno degli anticorpi anti-JCV, tenendo conto anche della preferenza del singolo paziente. Le variabili cliniche e demografiche sono state raccolte e registrate in cartelle cliniche e sui registri per Tysabri® e Gilenya®. Al baseline sono state analizzate le seguenti variabili: genere, età, durata di malattia, numero di farmaci DMT (disease modifying treatment) utilizzati, numero di ricadute nell'anno precedente al passaggio a seconda linea, numero di nuove lesioni in RMN nelle sequenze T2 e lesioni Gadolinio positive (Gdp) nell'anno

precedente al passaggio a seconda linea, EDSS score valutato nel mese precedente l'inizio della seconda linea. L'efficacia e la sicurezza di entrambi i farmaci sono stati valutati considerando il numero di ricadute nel primo anno di trattamento e nell'intero periodo di trattamento, l'annualized relapse rate (tasso di ricadute per anno di trattamento, ARR), l'EDSS score ogni sei mesi, il numero di nuove lesioni nel primo anno, il numero di nuove lesioni in T2 e lesioni Gdp; per il rischio infettivo è stata valutata la conta dei globuli bianchi e la formula leucocitaria al basale e ogni sei mesi, considerando come normale range per i leucociti $4,50-10 \cdot 10^3/uL$, per i linfociti $0,9-5 \cdot 10^3/uL$, per i neutrofilo $1,8-7,5 \cdot 10^3/uL$, per i monociti $0,1-1,0 \cdot 10^3/uL$, per i basofili $0-0,1 \cdot 10^3/uL$ e per gli eosinofili $0-0,7 \cdot 10^3/uL$. E' stata poi valutata l'incidenza di episodi infettivi (opportunistici e non) calcolata come il numero di infezioni per gruppo di trattamento diviso per il tempo cumulativo di esposizione in mesi in ciascun gruppo. La proporzione di pazienti con infezioni è stata poi categorizzata in base alla media dei linfociti. Per il rischio cardiovascolare di Fingolimod sono stati valutati inoltre i valori di pressione arteriosa (PA) e di frequenza cardiaca nelle sei ore di monitoraggio previste dall'AIFA alla prima somministrazione e l'eventuale riscontro di ipertensione arteriosa nei mesi a seguire. Per ricaduta si è considerato un disturbo neurologico soggettivamente riportato dal paziente e oggettivamente confermato alla valutazione clinica, della durata di almeno 24 ore in assenza di infezioni o di altre condizioni associate ad un aumento della temperatura corporea. I dati di RMN sono stati raccolti al basale e ogni sei mesi, con macchinario a 1,5 tesla; la presenza di nuove lesioni durante il trattamento è stata determinata dalla comparsa durante la terapia di lesioni in T2 e/o in FLAIR confrontando con l'RMN disponibile al basale.

Analisi statistica

Le variabili quantitative sono state riportate come media \pm deviazione standard. Per la comparazione tra i due gruppi per le variabili parametriche distribuite normalmente è stato utilizzato il test ANOVA, mentre per le variabili che non sono distribuite normalmente è stato applicato il test di Mann-Whitney. Per le variabili categoriche sono stati applicati il test di Fisher e il χ^2 . La formula leucocitaria e i dati di sicurezza sono stati riassunti solo mediante statistica descrittiva. La progressione della disabilità è stata definita come l'incremento di ≥ 0.5 punti all'EDSS confermato a sei mesi. L'attività all'RMN è stata definita come la presenza di ≥ 1 nuove lesioni in T2 o in T1 Gdp alle RMN di follow-up. La significatività statistica è stata fissata ad un alfa <0.05 (a due code). Le analisi sono state effettuate utilizzando SPSS.

Risultati

Da giugno 2008 sono stati trattati 15 pazienti con Natalizumab e 40 pazienti con Fingolimod. Tre pazienti in terapia con Natalizumab hanno sospeso la terapia: una paziente JCV positiva ha sospeso la terapia dopo 24 mesi per l'incremento del rischio di PML, una ha interrotto per progressione della malattia nonostante la terapia e una ha sospeso per insorgenza di PML dopo 4 anni dall'inizio. Nessuno dei pazienti in terapia con fingolimod ha sospeso la terapia. (Tab 4. Caratteristiche al baseline).

Dei 40 pazienti che hanno intrapreso fingolimod l'ultimo DMT utilizzato era INF beta 1 a in 17 pazienti (42%), INF beta 1b in 12 pazienti (30%), GA in 11 pazienti (27,5%). Dei 15 pazienti che hanno intrapreso natalizumab l'ultimo DMT utilizzato era INF beta 1 a in 7 pazienti (46,6%), INF beta 1b in 5 pazienti (33,3%), GA in 3 pazienti (20%). Tutti i pazienti hanno effettuato una RMN prima dell'inizio della terapia di seconda linea con

Tab 4. Caratteristiche dei soggetti in studio all'inizio di Natalizumab o Fingolimod

	Tutti i soggetti (n = 55)	Natalizumab (n = 15)	Fingolimod (n = 40)	p
Sesso F/M	33/22	11/4	22/18	0,354 ✖
Anni (media ± DS)	40,47 ± 9,67	39,13 ± 8,36	40,98 ± 10,17	0,534 ♣
Durata di malattia in anni (media ± DS)	11,8 ± 5,80	11,60 ± 4,59	11,9 ± 6,24	0,877 ♣
Ricadute l'anno precedente (media ± DS)	1,02 ± 0,82	1,40 ± 0,63	0,87 ± 0,85	0,035 ♣
Punteggio EDSS (mediana e range)	3.0 (1-8)	2.5 (1-6)	3.0 (1-8)	0,493 *
Numero totale nuove lesioni alla RMN (media ± DS)	4,25 ± 3,53	6,0 ± 4,23	3,60 ± 3,04	0,034 *
Numero lesioni Gdp alla RMN (media ± DS)	1,11 ± 2,27	2,53 ± 3,74	0,58 ± 1,01	0,002 *
Lesioni Gadolinio + alla RMN				
PRESENTI	23 (41,8%)	11 (73,3%)	12 (30%)	0,004 ✖
ASSENTI	32 (52,8%)	4 (26,6%)	28 (70%)	
Precedente utilizzo di DMT				
1	28 (50,9%)	6 (40%)	22 (55%)	0,375 ✖
≥ 2	27 (49,1%)	9 (60%)	18 (45%)	
*Mann Whitney ♣ test Fisher. ✖ test del χ^2				

riscontro di lesioni Gdp in 11 pazienti del gruppo che poi ha intrapreso Natalizumab (73,3%) e in 12 pazienti del gruppo che poi ha intrapreso Gilenya (30%), differenza significativa tra i due gruppi al basale (p = 0.004). Anche il confronto dei due gruppi in base al numero di lesioni Gdp (p = 0,002) e di nuove lesioni T2 l'anno precedente l'inizio della seconda linea (p = 0,034) è risultato statisticamente significativo in favore di una maggiore attività radiologica nel gruppo che poi ha intrapreso natalizumab. Altra significatività al basale (p = 0,035) riguarda il numero di ricadute l'anno precedente l'inizio

della terapia di seconda linea con una media di $1,40 \pm 0,63$ per il gruppo natalizumab e di $0,87 \pm 0,85$ nel gruppo fingolimod.

Tutti i pazienti hanno effettuato una RMN ogni 6 mesi dopo l'inizio della terapia di seconda linea, senza significative differenze tra i due gruppi per quanto riguarda il numero

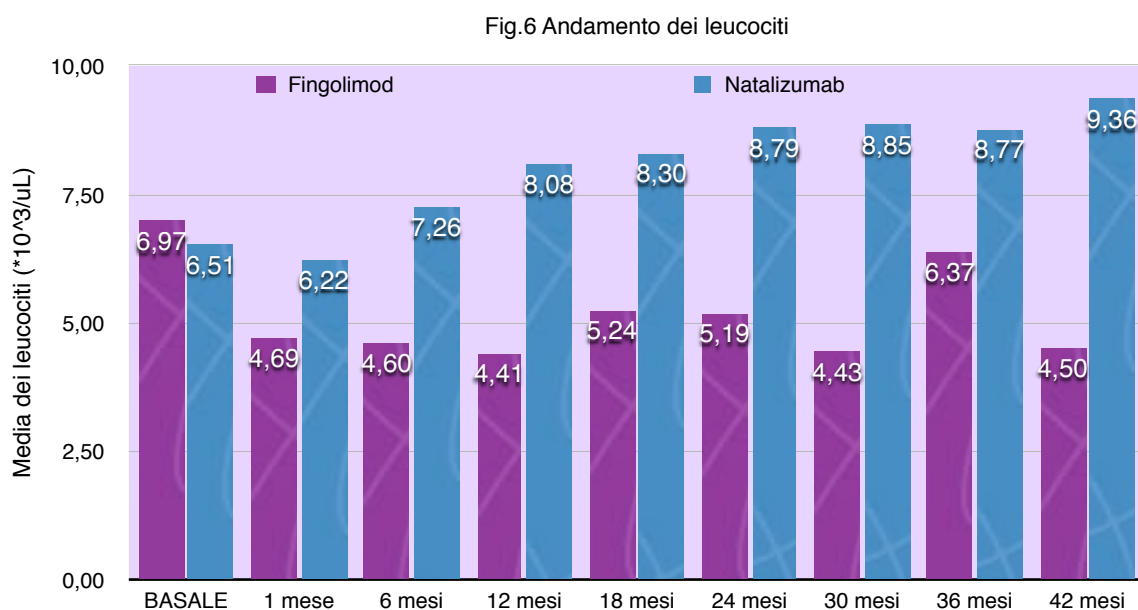
	Tutti i soggetti (n = 55)	Natalizumab (n = 15)	Fingolimod (n = 40)	p
Durata del trattamento in mesi (media \pm DS)	36 \pm 20	56 \pm 21	28 \pm 13	< 0,001 *
Tasso annualizzato di ricadute (ARR) (media \pm DS)	0,11 \pm 0,28	0,05 \pm 0,08	0,13 \pm 0,33	0,917 *
Numero di ricadute (media \pm DS)	0,33 \pm 0,77	0,27 \pm 0,46	0,35 \pm 0,86	0,658 *
Numero lesioni gdp (media \pm DS)	0,11 \pm 0,50	0,07 \pm 0,26	0,13 \pm 0,56	0,848 *
Numero nuove lesioni RMN nel primo anno	0,51 \pm 1,14	0,53 \pm 1,06	0,50 \pm 1,18	0,656 *
Numero nuove lesioni in T2 (media \pm DS)	0,85 \pm 1,45	1,33 \pm 1,40	0,68 \pm 1,44	0,049 *
Progressione EDSS (mediana e range)				
6 mesi	3.0 (1-7,5)	2.5 (1-6)	3.0 (1-7)	0,435 *
12 mesi	3.0 (1-7,5)	3.0 (1-6)	3.0 (1-7)	0,375 *
24 mesi	3.0 (1-7,5)	3.0 (1-6)	3.0 (1-7)	0,701 *
36 mesi	3.5 (1-7)	3.5 (1-7)	2.5 (1-6)	0,771 *
48 mesi	3.5 (1-7)	3.5 (1-7)	2.5 (1-6)	0,609 *
Progressione EDSS (\geq 0,5 punti mantenuto a 6 mesi)				
si	13 (23,6 %)	7 (46,6 %)	6 (15 %)	0,014 \boxtimes
no	42 (76,3 %)	8 (53,3 %)	34 (85 %)	
*Mann Whitney \boxtimes test del χ^2				

Tab.5 Caratteristiche dei due gruppi dopo l'inizio delle terapie di seconda linea.

di lesioni Gdp riscontrate nel tempo e per il numero di nuove lesioni nel primo anno di trattamento. E' risultato invece al limite della significatività (p= 0,049) il confronto dei due

gruppi per il numero di nuove lesioni in T2 su tutto il periodo con una media di $1,33 \pm 1,40$ per natalizumab e di $0,68 \pm 1,44$ per fingolimod. Non si è osservata invece differenza statisticamente significativa per quanto riguarda il tasso annualizzato di ricadute e il numero di ricadute su tutto il periodo di osservazione. Per quanto riguarda la progressione misurata con l'EDSS non si sono osservate differenze statisticamente significative confrontando la mediana dei punteggi a intervalli predefiniti; si è trovata invece significatività ($p = 0,014$) in favore di fingolimod andando a confrontare la progressione nei due gruppi su tutto il periodo in base ad un cut off stabilito come aumento di almeno 0.5 punti all' EDSS mantenuto a 6 mesi di osservazione (Tab 5. Caratteristiche dopo l'inizio del farmaco di seconda linea).

Andando a valutare il livello di leucociti e la formula leucocitaria si è osservato che importanti differenze si avevano fin dal primo mese di trattamento con una riduzione del livello dei leucociti del 32,7%, da un valore baseline di $6,97 \cdot 10^3/uL$ ad un valore di 4,69



*10³/uL nel gruppo fingolimod, a fronte di una quasi stabilità nel gruppo natalizumab. La media dei leucociti nel gruppo fingolimod è rimasta stabilmente lievemente ridotta con un valore medio a 30 mesi di 4,43 *10³/uL (-36,4 % rispetto al basale), mentre nel gruppo natalizumab si è osservata una tendenza all'incremento con un valore medio a 30 mesi di 8,85 *10³/uL (+ 35,92 % rispetto al basale) (Fig. 6). I linfociti sono tuttavia la sottopopolazione dove si è osservata la differenza maggiore tra i due farmaci: nel gruppo fingolimod infatti dopo un mese di trattamento si è verificata una riduzione del 71,91 % dei linfociti che da 2,03 *10³/uL si sono attestati su un valore di 0,57 *10³/uL e vi sono rimasti stabilmente durante il trattamento cronico con riscontro a 30 mesi di un valore medio identico a quello del primo mese. Di pari passo i linfociti nel gruppo natalizumab hanno seguito un andamento crescente con riscontro a 30 mesi di un valore medio di 3,49 *10³/uL (+ 62,32% rispetto al basale) (Fig. 7). I neutrofili hanno mostrato una riduzione nel gruppo fingolimod del 18,9 % ad un mese passando da 4,27 *10³/uL al basale a 3,46 *10³/uL; come per i linfociti la riduzione è rimasta stabile nel tempo con riscontro a 30 mesi di un valore di 3,60*10³/uL (-15,6% rispetto al basale). Nel gruppo natalizumab si è osservata una lieve iniziale riduzione del 17,2 % da 3,78 *10³/uL a 3,13 *10³/uL seguita da un andamento fluttuante con riscontro a 30 mesi di un valore medio di 4,30 *10³/uL (+13,7% rispetto al basale) (Fig. 8). I monociti hanno mostrato un andamento pressoché stabile nel tempo nei pazienti in trattamento con fingolimod con un riscontro a 30 mesi di 0,48 *10³/uL (-14 % rispetto al basale), viceversa hanno mostrato un andamento

Fig.7 Andamento dei linfociti

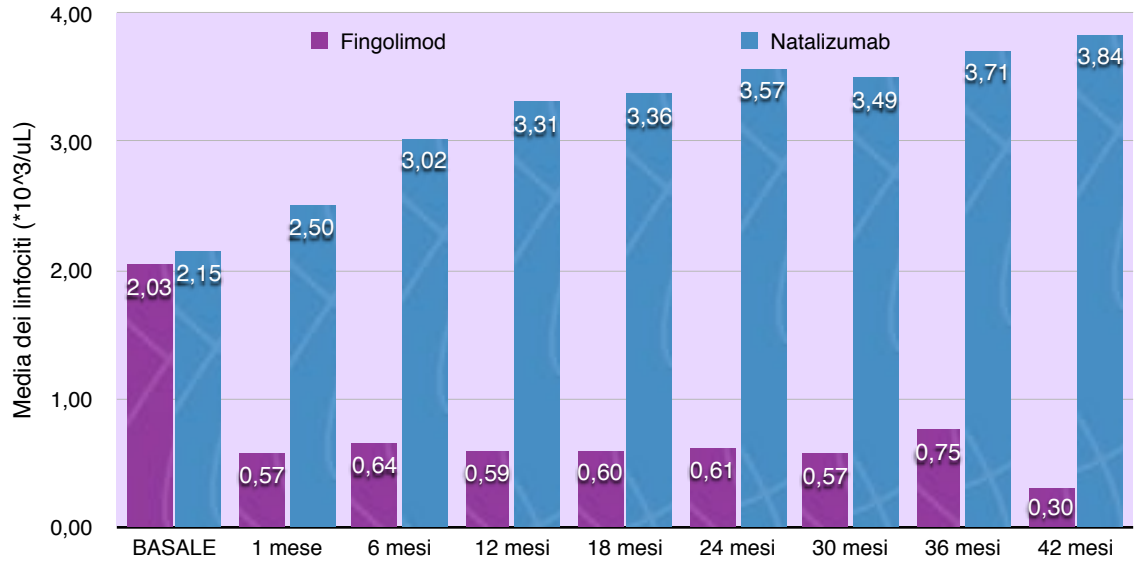


Fig. 8 Andamento dei neutrofili

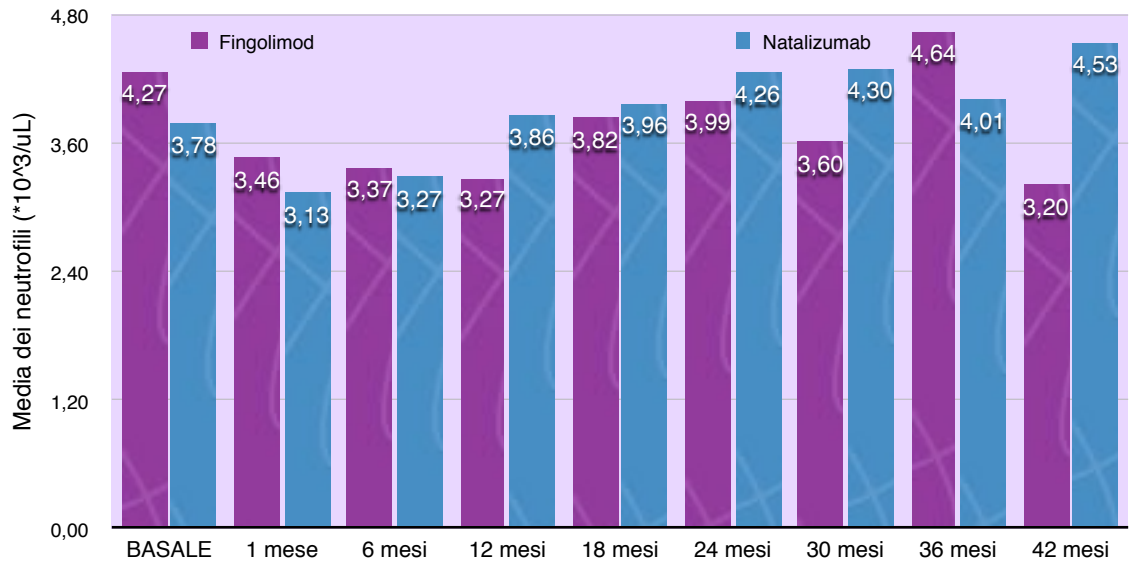


Fig. 9 Andamento dei monociti

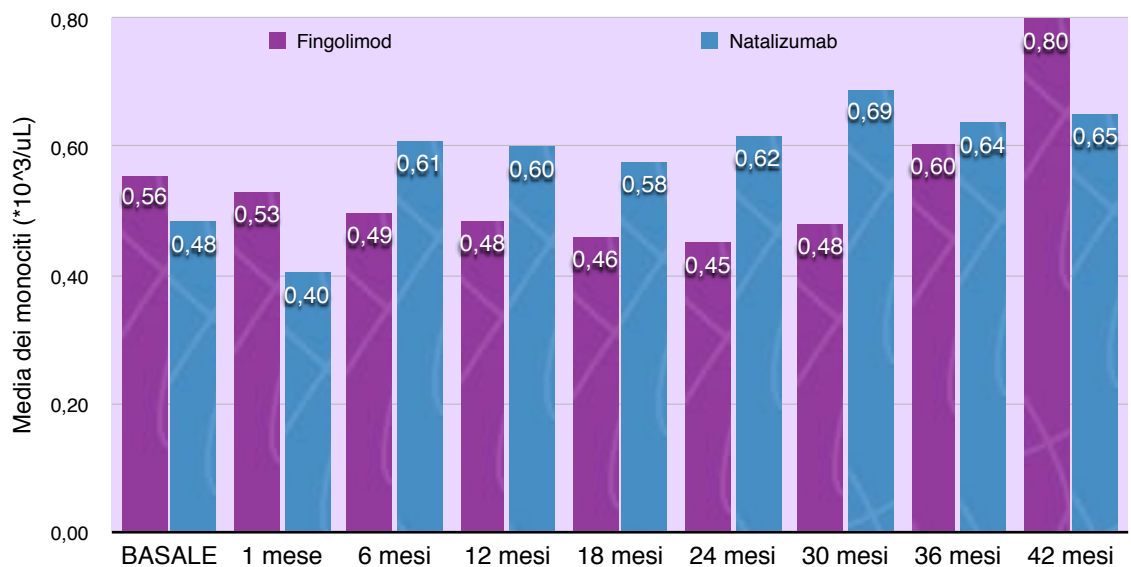


Fig. 10 Andamento degli eosinofili

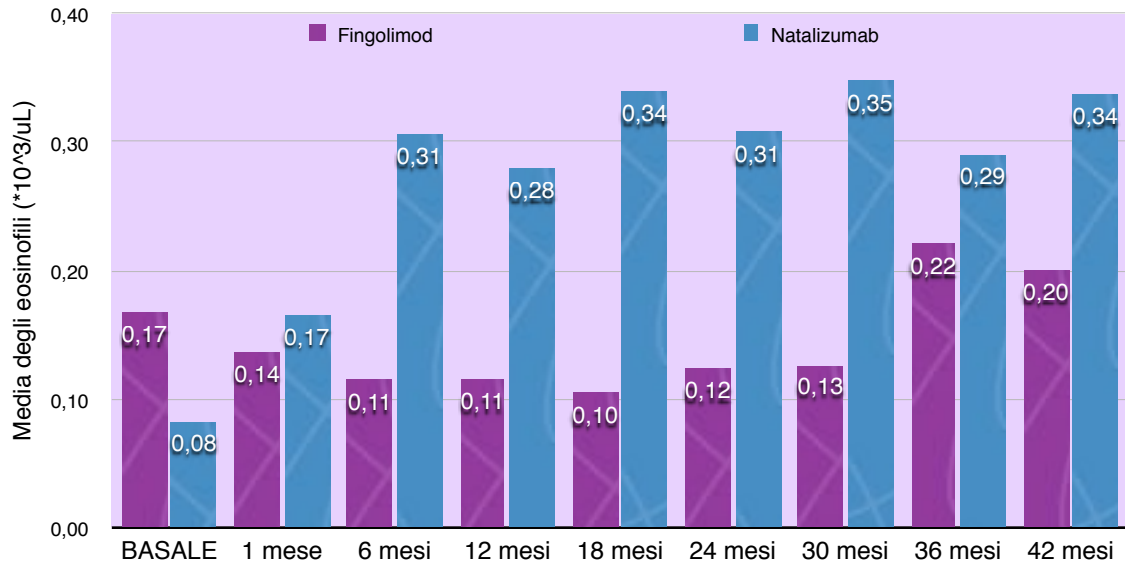
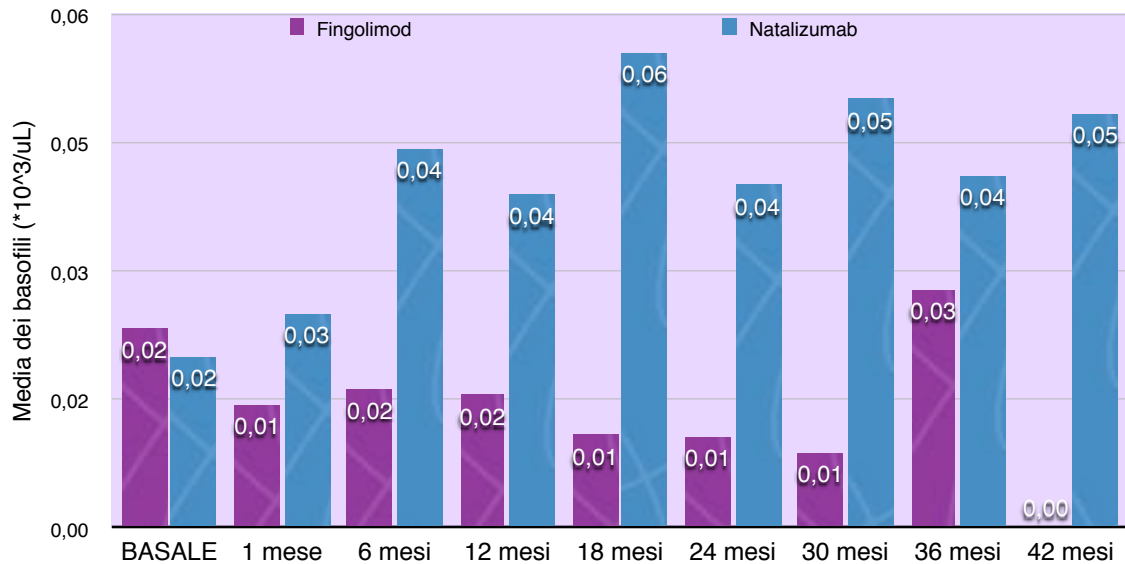


Fig. 11 Andamento dei basofili



crecente nei pazienti in terapia con natalizumab con riscontro a 30 mesi di $0,69 \cdot 10^3/uL$

(+43,75% rispetto al basale) (Fig.9). Basofili e eosinofili hanno mostrato un andamento analogo (Fig. 10 e 11).

E' stato riscontrato un incremento di episodi infettivi in 5 (12,5%) pazienti in terapia con fingolimod e in 8 (53,3%) pazienti in terapia con natalizumab; andando a valutare il tasso di incidenza delle infezioni per paziente/anno tra i due gruppi si è osservato un tasso di 0,018 nel gruppo fingolimod e 0,016 nel gruppo natalizumab (Fig. 12). Andando poi a

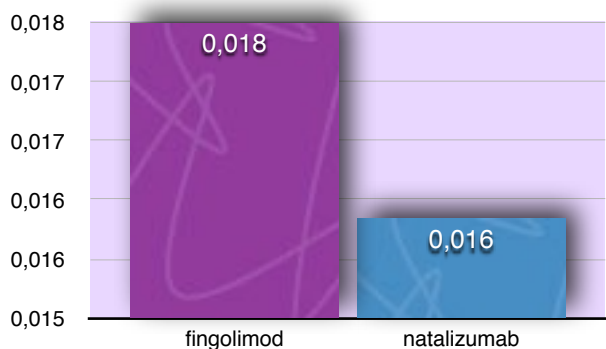


Fig. 12 TASSO DI INFEZIONI PER PAZIENTE/ANNO

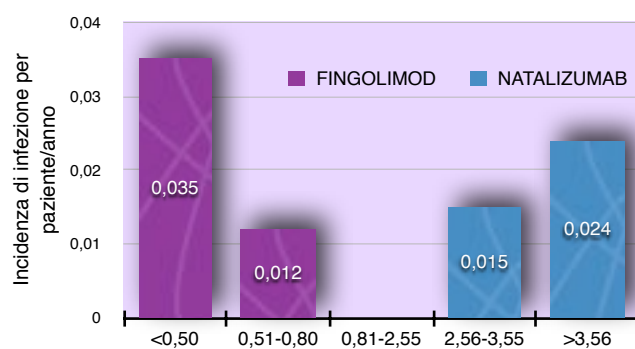


Fig. 13 Media della conta linfocitaria (*10³/uL)

valutare il tasso di infezioni per paziente/anno suddivisa per livello di linfociti si è osservata una maggiore incidenza nei pazienti con conta linfocitaria più bassa (< 800 linfociti /mm³) nel gruppo fingolimod e con conta linfocitaria più alta nel gruppo natalizumab; non si sono osservati episodi infettivi in nessuno dei due gruppi per valori intermedi di linfociti (tra 0,81 e 2,55 *10³/uL) (Fig. 13). Inoltre i pazienti del gruppo fingolimod che hanno riportato incremento delle infezioni avevano avuto un calo dei linfociti rispetto al basale più importante rispetto agli altri pazienti in trattamento con lo stesso farmaco (intorno al 60% in meno). Le infezioni riportate in entrambi i gruppi riguardavano per lo più le vie urinarie (8 episodi nel gruppo fingolimod e 10 nel gruppo natalizumab) e le alte vie respiratorie (2 episodi nel gruppo fingolimod e 3 episodi nel

Episodi infettivi	FINGOLIMOD	NATALIZUMAB
Alte vie respiratorie	2 (11,1%)	3 (21%)
Urinarie	8 (44,4%)	10 (71%)
Vaginale (candida albicans)	8 (44,4%)	0
Otite media	0	1 (7,1%)

Tab. 6 Episodi infettivi

gruppo natalizumab); nel gruppo fingolimod inoltre venivano riportati 8 episodi di infezione vaginale da candida albicans e nel gruppo natalizumab 1 episodio di otite media (Tab. 6).

Altri eventi avversi riportati nel gruppo fingolimod sono stati dimagrimento di 8-10 Kg (due pazienti, 5%), ipertensione arteriosa (4 pazienti, 10%), melanoma in situ (1 paziente, 2,5%) mentre nel gruppo natalizumab si è verificato un modesto incremento dell'amilasi pancreatica (1 paziente, 6,6%) e anemia sideropenica (1 paziente, 6,6%). Natalizumab è stato sospeso da una paziente per sospetto radiologico di PML, confermato successivamente da ripetute analisi del liquor per il dosaggio del JCV DNA mediante PCR. La paziente, di 46 anni, era stata trattata con Natalizumab per 45 mesi al riscontro dei segni radiologici precoci di PML e non era stata trattata mai in precedenza con immunosoppressori, ma aveva effettuato terapia con GA dal 2007 al 2010. Era stata testata per gli anticorpi anti-JCV ed era risultata positiva ad agosto 2011, dopo un anno dall'inizio del Tysabri, appena reso disponibile il test per il dosaggio degli anticorpi. Dopo la sospensione del farmaco la paziente è stata trattata con 2 sedute di plasmaferesi; il deterioramento prevalentemente cognitivo e del linguaggio è progredito di pari passo con l'instaurarsi della sindrome da immunoricostruzione (IRIS) che si è risolta dopo alcuni mesi lasciando importanti sequele neurologiche. Tutti i pazienti in terapia hanno effettuato il dosaggio degli anticorpi anti JCV e sono risultati positivi fatta eccezione per 5 pazienti (33,3%); tra i pazienti JCV positivi solo una paziente ha deciso di sospendere la terapia, gli

altri hanno proseguito e sono oltre la 24° somministrazione fatta eccezione per una paziente che è alla 16° somministrazione.

Per quanto riguarda gli effetti cardiologici di Fingolimod, gli eventi avversi riportati durante il monitoraggio cardiaco di 6 ore alla prima somministrazione sono stati riscontro di QTc borderline (presente già in due pazienti al basale, comparso in 2 pazienti durante il monitoraggio e presente in 3 pazienti all'ecg finale), bradicardia sinusale (3 pazienti durante il monitoraggio e 5 pazienti all'ecg finale), extrasistolia ventricolare (2 pazienti

	ecg basale	monitoraggio sei ore	ecg finale	prolungamento ecg
qtc borderline	2 (5%)	2 (5%)	3 (7,5%)	0
bradicardia sinusale	0	3 (7,5%)	5 (12,5%)	2 (5%)
extrasistolia ventricolare	0	0	2 (5%)	0
blocco destro parziale	1 (2,5%)	0	2 (5%)	0

Tab.7 Monitoraggio cardiologico di Fingolimod

all'eco finale), blocco destro parziale (1 paziente al basale, 2 pazienti all'ecg finale). Tutte le lievi anomalie riportate avvenivano in pazienti asintomatici. Il monitoraggio è stato prolungato in 2 pazienti (5%) che presentavano bradicardia sinusale all'ecg finale; l'osservazione è stata prolungata di circa 2 ore fino a che il ritmo cardiaco è tornato normale, senza effettuare alcun intervento terapeutico (Tab.7). Il monitoraggio di pressione arteriosa ha evidenziato una riduzione media di circa il 5% per la PA sistolica e del 6% per la PA diastolica nelle 6 ore; la frequenza cardiaca media ha raggiunto il nadir alla 3° ora

	basale	1° ora	2° ora	3° ora	4° ora	5° ora	6° ora
Pa sistolica, mmHg (media ± DS)	118,02 ± 12,71	114,68 ± 14,54	114,29 ± 15,17	115,21 ± 14,64	112,92 ± 14,71	113,95 ± 14,55	111,39 ± 13,49
Pa diastolica, mmHg (media ± DS)	74,71 ± 10,19	72,58 ± 10,88	71,08 ± 10,07	73,26 ± 15,26	70,53 ± 11,52	70,05 ± 10,90	67,53 ± 9,66
Frequenza cardiaca, bpm (media ± DS)	74,92 ± 9,17	72,18 ± 8,55	70,39 ± 7,93	68,00 ± 8,87	67,03 ± 7,24	68,05 ± 10,69	65,68 ± 7,70

Tab.8 Monitoraggio di pressione e frequenza cardiaca

mantenendosi poi su un valore ridotto del 10% rispetto al basale (circa 7 bpm). La frequenza cardiaca più bassa osservata è stata di 46 bpm in una paziente che aveva una bradicardia costituzionale (FC basale 55 bpm); il riscontro è avvenuto alla 3° ora, asintomatico, ed è rientrato senza interventi farmacologici alla fine delle 6 ore (Tab.8).

Discussione

Il presente studio osservazionale ha confrontato la risposta a natalizumab e a fingolimod in una popolazione di pazienti con SM-RR trattati presso il nostro centro. Le caratteristiche al baseline erano simili nei due gruppi nonostante la diversa numerosità dei campioni: questa è stata data dal fatto che nel paziente JCV positivo al basale spesso è stata effettuata la scelta di intraprendere terapia con fingolimod per motivi di sicurezza. Viceversa il gruppo dei pazienti che ha intrapreso natalizumab aveva una maggiore relapse rate e una maggiore attività radiologica di malattia al basale, poiché nella scelta si è tenuto conto della maggiore efficacia di questo farmaco dimostrata negli studi clinici. Il punteggio EDSS al basale era simile nei due gruppi mentre la durata di trattamento maggiore nel gruppo natalizumab.

Le analisi di efficacia, tenuto di conto di queste differenze al basale, non hanno mostrato differenze statisticamente significative per quanto riguarda il numero grezzo di ricadute nell'intero periodo e il tasso annualizzato di ricadute; anche negli endpoint di RMN non vi è stata differenza statisticamente significativa, fatta eccezione per il numero di nuove lesioni in T2 al limite della significatività in favore di fingolimod. Questa differenza può essere spiegata dalla maggiore attività radiologica al basale nel gruppo natalizumab. Questi dati suggeriscono nella nostra popolazione un'efficacia pressoché equivalente per i due farmaci. Per quanto riguarda la progressione di malattia non vi è stata differenza significativa tra i due gruppi considerando il punteggio EDSS a intervalli di 6 mesi, mentre

valutando la progressione nell'intero periodo si è ottenuta una maggiore progressione nel gruppo natalizumab. Questo può essere in parte spiegato dal fatto che questo gruppo di pazienti è stato osservato per un periodo di tempo maggiore. In ogni caso la progressione è stata scarsa in entrambi i gruppi.

Nel nostro studio la sospensione dei due farmaci per eventi avversi è stata molto bassa per il gruppo natalizumab e nulla per il gruppo fingolimod. Il monitoraggio stretto per complicanze infettive, in particolare per PML, resta di primaria importanza, specialmente nei pazienti che assumono natalizumab da più di 24 mesi e sono positivi per dosaggio anticorpale anti-JCV. Esclusa la PML gli episodi infettivi si sono verificati con un tasso di incidenza per paziente/anno lievemente maggiore per fingolimod come aspettato dalla linfopenia indotta dal suo meccanismo di azione. Infatti la riduzione dei linfociti attorno al 70%, stabile nel tempo, si uniforma alla riduzione riportata da altri studi clinici osservazionali, così come la seppur minore riduzione dei neutrofilii e la conseguente riduzione dei leucociti totali del 30% circa (Francis et al 2014). Tuttavia nel nostro studio, analogamente a quanto avviene nelle casistiche ricavate dagli studi clinici registrativi di Fingolimod, a dispetto della marcata riduzione di linfociti non si sono osservati eventi infettivi di grado severo così come non ci sono state importanti infezioni opportunistiche. Questo può essere spiegato dal fatto che la conta cellulare circolante non costituisce l'intero corpo linfocitario e quindi una riduzione di questa non implica perdita totale della funzione. Infatti se da una parte i linfociti T naive e i linfociti T di memoria centrale sono

trattenuti nei linfonodi, i linfociti T memoria effettori (che mancano della componente CCR7 legata da fingolimod) sono risparmiati. Questi sono linfociti T che entrano nei tessuti ad esercitare da soli reazione infiammatoria o citotossica essendo essi stessi degli effettori e costituendo grossa parte dell'immunosorveglianza. Un'altra spiegazione potrebbe essere che sebbene fingolimod blocchi la gran parte dei linfociti nei linfonodi la loro funzione rimanga intatta come dimostrato succedere in alcuni modelli di infezione virale in vivo di coriomeningite linfocitica (Mehring et al 2008).

Uno studio clinico di confronto tra profilo immunitario nel sangue periferico e nel liquor di pazienti in terapia con fingolimod o natalizumab ha riscontrato che i pazienti in fingolimod avevano una ridotta percentuale di cellule B nel sangue periferico rispetto ai pazienti con SM non in terapia o ai pazienti in terapia con natalizumab; questo a fronte di un'alta frazione di cellule B nel liquor (l'inverso di quanto succede ai pazienti in terapia con Natalizumab, i quali hanno una più bassa frazione di linfociti B nel liquor.) I pazienti in terapia con Fingolimod nel medesimo studio mostravano anche ridotti valori di plasmablasti nel sangue periferico mentre avevano un più alto valore di cellule NK e di monociti rispetto a pazienti in trattamento con altri DMT. Quest'ultimo dato non è stato riprodotto nella nostra piccola casistica. Anche nel liquor di pazienti in terapia con fingolimod la percentuale dei monociti e di cellule NK è stata dimostrata essere elevata se comparata a pazienti SM non trattati. Natalizumab non ha mostrato influenza sulle cellule NK (Kowarik et al 2011). Nel medesimo studio clinico è stata inoltre valutata la risposta

anticorpale ad herpes simplex dato il pregresso riscontro di un'encefalite erpetica in una paziente in terapia con fingolimod. Il DNA virale non è stato riscontrato in nessuno dei pazienti testati così come nessuno mostrava evidenza di sintesi intratecale di anticorpi specifici anti HSV.

L'analisi effettuata nella nostra casistica dimostra come l'impatto della bassa conta linfocitaria sul rischio infettivo sia limitato anche nel lungo periodo di esposizione a fingolimod. In altri studi clinici è stato dimostrato come fingolimod cambi in maniera significativa anche la distribuzione delle cellule immunitarie nel liquido cerebrospinale con una riduzione delle cellule T CD4+ e un incremento delle cellule T CD8+. L'impatto del fingolimod sui CD4+ è meno pronunciato sul liquor piuttosto che nel sangue periferico dove tutti i pazienti hanno inversione del rapporto CD4+/CD8+ (viceversa natalizumab non ha impatto sul rapporto CD4/CD8 nel sangue periferico e lo inverte nel liquor). Inoltre nel liquido cerebrospinale non sono modificati dal farmaco i livelli di IgG e la sintesi intratecale (Kowarik et al 2011). Per le sottopopolazioni dei linfociti B mentre le cellule B naive superano le cellule B memoria nel sangue periferico, nel liquido cerebrospinale c'è netta prevalenza del pool delle cellule memoria. E' possibile che fingolimod effettui un intrappolamento preferenziale delle cellule B naive nei linfonodi. In alternativa l'accumulo di fingolimod nel SNC può avere un impatto sulla fuoriuscita delle cellule B dal compartimento, sebbene non sia mai stato provato. Quindi poiché i cambiamenti nel liquido cerebrospinale non sono profondamente differenti da quelli provocati da

natalizumab è stata ipotizzata una compromissione del sistema immune nel SNC anche con fingolimod. Per i rari casi di marcata linfopenia ci sono studi che consigliano di ridurre il dosaggio di fingolimod diradando le somministrazioni per aumentarne la tollerabilità senza perdere totalmente l'efficacia del farmaco (Tanaka et al.2015). Inoltre è stato osservato in un altro studio clinico che i pazienti con conta linfocitaria più bassa al basale e con basso BMI sono a più alto rischio di sviluppare marcata linfopenia (Warnke et al, 2014).

L'analisi delle sottopopolazioni leucocitarie nel gruppo natalizumab della presente casistica ha mostrato un significativo incremento dei linfociti, reperto già osservato in precedenti studi clinici con questo farmaco (Koudriavsteva et al 2014; Harrer et al 2012). L'effetto immunitario sui linfociti T, cellule natural killer (NK) e linfociti B persiste nel lungo periodo indicando che l'efficacia di natalizumab può essere correlata con un incremento stabile dei linfociti, soprattutto di tipo B, insieme ad un aumento del rapporto CD4/CD8.

L'origine di questi linfociti, sebbene l'azione di natalizumab su diverse popolazioni del sistema immune rimanga tuttora non chiara, (Wipfler et al. 2011; Krumbholz et al. 2008; Putzki et al 2010; Skarica et al 2011) può derivare direttamente dal midollo osseo o da pool di cellule periferiche. Di fatto data la scarsità di leucociti nel SNC rispetto a quelli in periferia e il minor contributo dato dalle cellule B della zona marginale e B memoria a comporre l'insieme dei linfociti del SNC, è improbabile che la ridotta migrazione dei linfociti al suo interno e la ridotta ritenzione di linfociti B nella milza possa significativamente influire sulla conta cellulare periferica. L'incremento più significativo a

carico dei linfociti B rispetto ai T, inoltre, suggerisce un ruolo primario del midollo osseo: infatti è stato dimostrato in uno studio clinico che i linfociti T e B di nuova produzione aumentano significativamente nel sangue periferico di pazienti trattati per 6 e 12 mesi con Natalizumab (Zanotti et al 2012), a significare che il farmaco influisce sul rilascio dai siti produttori. Questo può avere implicazioni per lo sviluppo di PML come dimostrato dal case report di una paziente che è andata incontro a PML e che aveva un deficit immune a fronte di un incremento dei linfociti B neoprodotti. (Sottini et al 2012). Su questa scia possono essere interpretati anche i nostri dati di aumento di episodi infettivi nel gruppo natalizumab con più alto livello di linfociti, considerando che è stato dimostrato negli studi sopraccitati l'aumento di linfociti B neo-prodotti a fronte di una riduzione dell'eterogeneità dei linfociti T e delle immunoglobuline.

Nel gruppo fingolimod sono da considerare anche gli effetti cardiologici del farmaco sebbene nella nostra popolazione non vi siano stati eventi avversi seri; il monitoraggio è stato infatti prolungato solo in due pazienti per bradicardia sinusale che è poi rientrata autonomamente nell'arco di 2 ore. I nostri dati sono uniformi a quanto riscontrato dagli studi clinici di fase tre che riportano una transitoria riduzione della frequenza cardiaca dopo 4-5 ore dalla prima somministrazione con una massima riduzione di 8-11 bpm e infrequenti bradicardia sinusale (0,6% negli studi di fase 3 e nulla nel nostro campione) e blocco atrioventricolare di II grado (0,2% negli studi di fase 3 e nulla nel nostro campione) (Di Marco et al 2014). Anche gli studi post-marketing ricalcano la casistica appena

descritta, infatti in una coorte di 212 pazienti osservati alla prima assunzione di fingolimod si aveva una riduzione della frequenza cardiaca alla VI ora di circa 9,5 bpm, solo 1 individuo ha riportato un blocco atrioventricolare di secondo grado (Paolicelli et al 2014). Nello stesso studio, come nella nostra più piccola casistica, è stato osservato un incremento a lungo termine della pressione arteriosa in 5 soggetti.

Non esistono al momento studi randomizzati che comparino direttamente natalizumab e fingolimod per efficacia e tollerabilità. I dati disponibili derivano da case-reports e studi osservazionali che confrontano i due farmaci in maniera retrospettiva. Una recente metanalisi di tutti i farmaci disease modifying per la SM-RR basata sui dati provenienti da trial di fase III placebo-controllo ha concluso che fingolimod è il farmaco più efficace in termini di libertà da ricadute ad un anno (Del Santo et al 2012). Un altro recente studio retrospettivo ha comparato il miglioramento clinico di 190 pazienti con SM-RR trattati con fingolimod e 237 con natalizumab: nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata in termini di ricadute e progressione di malattia in un periodo di osservazione di 12 mesi (Braume et al 2013). Tuttavia in questa analisi erano stati esclusi i pazienti trattati per meno di 12 mesi ed è plausibile che una parte di questi soggetti avesse smesso natalizumab o fingolimod per inefficacia nel primo anno di trattamento. Inoltre lo studio non prendeva in considerazione dati di RMN. Anche nella casistica americana rivista retrospettivamente mediante analisi del database del registro farmacologico è stata osservata un'efficacia simile dei due farmaci considerando soltanto il parametro ricadute. (Bergvall et al 2014).

Viceversa un altro recente studio clinico osservazionale su più piccoli campioni ha mostrato una maggiore riduzione del rischio di ricadute nei pazienti in terapia con natalizumab (57 pazienti) rispetto a quelli in terapia con fingolimod (30 pazienti), senza però differenze significative in termini di EDSS e di RMN. (Gajofatto et al. 2014). Anche in questa casistica si è verificata una PML con importanti sequelae nel gruppo natalizumab in una paziente con anticorpi anti JCV, in terapia da più di 24 mesi e con precedente utilizzo di immunosoppressori. In un altro studio osservazionale si è osservato retrospettivamente i pazienti che erano passati a terapia con fingolimod (36 pazienti) o natalizumab (69 pazienti) in base alla presenza o meno di anticorpi anti JCV considerando che questa scelta potesse equivalere ad una sorta di randomizzazione. (Caruthers et al 2014). In questo studio si è osservata una differenza significativa in favore di natalizumab per quanto riguarda il tempo di prima ricaduta e il tempo verso un nuovo evento infiammatorio (ricaduta o lesione Gdp alla RMN), se si effettuava un'analisi aggiustata per variabili confondenti. Questo studio ha mostrato anche un tasso maggiore di sospensione per natalizumab (36,2%) che per fingolimod (22,2%); ciò si aveva per un maggior tasso di conversione a JCV di quanto fosse aspettato (11,6%) e per lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti. Per cui si poteva concludere che se da una parte si ottiene una superiorità di efficacia di natalizumab dall'altra parte i pazienti che intraprendono fingolimod più probabilmente riusciranno a portare avanti la terapia. Ancor più recentemente è stato effettuato uno studio di confronto tra natalizumab e fingolimod utilizzando MSBase

(registro internazionale di outcome di malattia) ed effettuando una quasi-randomizzazione mediante il propensity score matching; sono stati valutati 578 pazienti suddivisi in 407 per natalizumab e 171 per fingolimod con riscontro di una riduzione maggiore dell'ARR nel gruppo natalizumab rispetto al gruppo fingolimod e di una regressione di disabilità mantenuta nel gruppo natalizumab comparato al gruppo fingolimod (Kalincik et al 2015).

Tuttavia anche questo studio non ha preso in considerazione i dati di RMN.

Dal punto di vista gestionale una volta sospeso natalizumab per l'aumento del rischio di PML il farmaco più frequentemente scelto per efficacia al momento è fingolimod. Ci sono studi osservazionali che valutano il passaggio terapeutico da natalizumab a fingolimod, riportando in genere una riattivazione di malattia dopo lo switch (Rinaldi et al 2012; Daelman et al 2012). E' stato ipotizzato che un inizio precoce di fingolimod (ad esempio prima della fine dei tre mesi che sono raccomandati come intervallo di wash-out) potrebbe prevenire il verificarsi di ricadute (Havla et al. 2013; De Seze et al. 2013). Questo approccio tuttavia è poco utilizzato per il rischio di PML che i pazienti provenienti da natalizumab si portano dietro grazie al proseguo dell'immunosoppressione nelle immediate vicinanze della sospensione.

Infine in una recente metanalisi effettuata utilizzando il registro Cochrane per la sclerosi multipla sono stati messi a confronto tutti i farmaci immunomodulanti e immunosoppressori per questa malattia con la conclusione che in termini di efficacia sulle ricadute natalizumab e fingolimod assieme ad alemtuzumab e mitoxantrone superano gli

altri farmaci disponibili, mentre solo natalizumab mostra un vantaggio sulla progressione di disabilità (Tramacere et al 2015).

I risultati del presente studio vanno presi con cautela essendo piccolo il campione, in assenza di randomizzazione e non essendo condotto in cieco il che porta ad un bias di selezione dei pazienti. Inoltre essendo uno studio retrospettivo non è stato definito un protocollo standardizzato di RMN. Le differenze dei due gruppi al baseline possono aver influenzato i profili di efficacia ma non il profilo di tollerabilità che evidenzia un più basso rischio di infezioni opportunistiche con fingolimod.

Questo, come tutti gli studi post-marketing, con i limiti sopradescritti, porta importanti informazioni sulla sicurezza, tollerabilità, aderenza e risposta terapeutica che può essere poi la base per disegnare trial clinici randomizzati di confronto, strumento più affidabile per la comparazione di efficacia di differenti farmaci.

Conclusione

Con il crescente numero di terapie a disposizione per l'SM-RR c'è un grande bisogno di evidenze provenienti da una diretta comparazione dei farmaci per consentire una scelta più consapevole. Il presente studio evidenzia come nella nostra reale pratica clinica non si sia riscontrato un vantaggio significativo in termini di efficacia per uno dei due farmaci così come non si è verificato un incremento del tasso di infezioni significativamente diverso per le due terapie. Il verificarsi di PML tuttavia, evento avverso grave, assume un peso importante e di conseguenza la presenza o meno degli anticorpi anti-JCV al momento diviene l'ago della bilancia per decidere quale farmaco utilizzare.

Bibliografia

Agius M, Meng X, Chin P, et al. Fingolimod therapy in early multiple sclerosis: an efficacy analysis of the TRANS- FORMS and FREEDOMS studies by time since first symptom. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20:446–451.

Akira S. and Sato S., “Toll-like receptors and their signaling mechanisms,” 2003. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol. 35, no. 9, pp. 555–562.

Alt C., Laschinger M. e Engelhardt B., “Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis,” 2002. *European Journal of Immunology*, vol. 32, no. 8, pp. 2133–2144.

Amato M.P., Hakiki B., Goretti B., et al., Association of MRI metrics and cognitive impairment in radiologically isolated syndromes. 2012. *Neurology* 78, 309–314.

Ascherio A. e Munger K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. 2007. *Ann. Neurol.* 61:504–513.

Ascherio A., Munger K. L. e Simon K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. 2010. *Lancet Neurol.* 9:599–612.

Awad A., Hemmer B., Hartung H. P., Kieseier B., Bennett J. L. e Stuve O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. 2010. *J. Neuroimmunol.* 219:1–7.

Balcer L.J., Clinical outcome measures for research in multiple sclerosis. 2001. *J. Neuroophthalmol.* 21, 296–301.

Barcellos L. F., Oksenberg J. R., Begovich A. B., Martin E. R., Schmidt S., Vittinghoff E., et al. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. 2003. *Am. J. Hum. Genet.* 72:710–716.

Barnett M. H. e Prineas J. W., “Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion,” 2004. *Annals of Neurology*, vol. 55, no. 4, pp. 458–468.

Batoulis H., Addicks K. e Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. 2010. *Annals Anat.* 192:179–193.

Belachew S., Phan-Ba R., Bartholomé E., et al., Natalizumab induces a rapid improvement of disability status and ambulation after failure of previous therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. 2011. *Eur. J. Neurol.* 18, 240–245.

Bergvall N., Lahoz R., Reynolds T., & Korn J. R. Healthcare resource use and relapses with fingolimod versus natalizumab for treating multiple sclerosis: a retrospective US claims database analysis. 2014. *Current Medical Research & Opinion*, 30(8), 1461-1471.

Bernard C.C., de Rosbo N.K., Immunopathological recognition of autoantigens in multiple sclerosis. 1991 *Acta Neurol. (Napoli)*, 13, 171–178.

Bieback K., Lien E., Klagge I. M. et al., “Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor 2 signaling,” 2002. *Journal of Virology*, vol. 76, no. 17, pp. 8729–8736.

Bloomgren G., Richman S., Hotermans C., et al., Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. 2012. *N. Engl. J. Med.* 366, 1870–1880.

Bø L., “The histopathology of grey matter demyelination in multiple sclerosis,” 2009. *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 120, no. 189, pp. 51–57.

Braune S, Lang M, Bergmann A; NTC Study Group: Second line use of Fingolimod is as effective as Natalizumab in a German out-patient RRMS-cohort. *J Neurol* 2013;260:2981–2985, Epub ahead of print.

Brenner D., Soffer M., Shalit, e Levi-Schaffer F., “Mast cells in experimental allergic encephalomyelitis: characterization, distribution in the CNS and in vitro activation by myelin basic protein and neuropeptides,” 1994. *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 122, no. 2, pp. 210–213.

Bruck W. and Stadelmann C. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. 2005. *Curr. Opin. Neurol.* 18:221–224.

Brucklacher-Waldert V., Stuermer K., Kolster M., Wolthausen J. e Tolosa E., “Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis,” 2009. *Brain*, vol. 132, no. 12, pp. 3329–3341.

Butzkueven H., Kappos L., Pellegrini F., et al., Efficacy and safety of natalizumab in multiple sclerosis: interim observational programme results. 2014. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 1190–1197.

Calabresi PA, Radue EW, Goodin D, et al. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:545–556.

Castillo-Trivino T., Mowry E.M., Gajofatto A., et al., Switching multiple sclerosis patients with breakthrough disease to second-line therapy. 2011. *PLoS One* 6, e16664. [ù](#)

Chun J., Hartung H.P., Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. 2010. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 91–101.

Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl. J Med.* 2010;362:402–415.

Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, et al. Alemtuzumab versus interferon beta-1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;380:1819–1828.

Coles AJ, Fox E, Vladic A, et al. Alemtuzumab more effective than interferon beta-1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology*. 2012;78:1069–1078.

Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;380:1829–1839.

Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S. e Mantovani A., “Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products,” *Blood*, vol. 80, no. 8, pp. 2012–2020, 1992.

Columba-Cabezas S., Serafini B., Ambrosini E. e Aloisi F., “Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation,” 2003. *Brain Pathology*, vol. 13, no. 1, pp. 38–51.

Compston, A., and A. Coles. Multiple sclerosis. 2008. *Lancet* 372:1502–1517.

Compton T., Kurt-Jones E. A., Boehme K. W. et al., “Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2,” 2003. *Journal of Virology*, vol. 77, no. 8, pp. 4588–4596.

Confavreux C, O’Connor P, Comi G, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2014;13:247–256.

Coyle P.K., The role of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. 2010. *Am. J. Manag. Care*. 16 (Suppl. 6), S164–S170.

Daelman L, Maitrot A, Maarouf A, Chaunu MP, Papeix C, Tourbah A: Severe multiple sclerosis reactivation under fingolimod 3 months after natalizumab withdrawal. 2012 *Mult Scler* 18:1647–1649.

De Jong B. A., Huizinga T. W., Bollen E. L. et al., “Production of IL-1beta and IL-1Ra as risk factors for susceptibility and progression of relapse-onset multiple sclerosis,” 2002. *Journal of Neuroimmunology*, vol.126,no.1-2,pp.172–179.

De Seze J, Ongagna JC, Collongues N, et al: Reduction of the washout time between natalizumab and fingolimod. 2013 *Mult Scler* 19:1248.

De Stefano N., Airas L., Grigoriadis N., et al., Clinical relevance of brain volume measures in multiple sclerosis. 2014. *CNS Drugs* 28, 147–156.

De Stefano N., Giorgio A., Battaglini M., et al., Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. 2010. *Neurology* 74, 1868–1876.

De Stefano N., Sprenger T., Freedman M.S., et al., Including threshold rates of brain volume loss in the definition of disease activity-free in multiple sclerosis using fingolimod phase 3 data. 2014. *ACTRIMS-ECTRIMS*, P290.

Del Santo F, Maratea D, Fadda V, Trippoli S, Messori A: Treatments for relapsing-remitting multiple sclerosis: summarising current information by network meta-analysis. 2012 *Eur J Clin Pharmacol* 68:441–448.

Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. 2002. *Neurology* 58: S3–S9.

DiMarco J. P., O'Connor P., Cohen J. A., Reder A. T., Zhang-Auberson L., Tang D., ... & Kappos L.. Fingolimod treatment initiation experience: cardiac and Holter electrocardiogram findings from three phase 3 studies. 2012 *Multiple Sclerosis Journal* (Vol. 18, pp. 227-228).

Dolganiuc A., Oak S., Kodys K. et al., “Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation,” 2004. *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5, pp.1513–1524.

Dorner M., Brandt S., Tinguely M. et al., “Plasma cell toll- like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production,” 2009. *Immunology*, vol. 128, no. 4, pp. 573–579.

Farez M. F., Fiol M. P., Gaitan M. I., Quintana F. J., e Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. 2015. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86:26–31.

FDA Drug Safety Communication: FDA investigating rare brain infection in patient taking Gilenya (fingolimod). <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm366529.htm>. Accessed December 30, 2014.

Fernández O., Best practice in the use of natalizumab in multiple sclerosis. 2013. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 6, 69–79.

Filippi M., Horsfield M. A., Morrissey S. P., MacManus D. G., Rudge P., McDonald W. I., et al. Quantitative brain MRI lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. 1994. *Neurology* 44:635–641.

Filippi M., Preziosa P., Copetti M., et al., Gray matter damage predicts the accumulation of disability 13 years later in MS. 2013. *Neurology* 81, 1759–1767.

Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367:1087–1097.

Franchi L., McDonald C., Kanneganti T.-D., Amer A., and Nunez G., “Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense,” 2006. *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 6, pp. 3507–3513.

Francis G., Kappos L., O'Connor P., Collins W., Tang D., Mercier F., & Cohen J. A. Temporal profile of lymphocyte counts and relationship with infections with fingolimod therapy. 2013 *Multiple Sclerosis Journal*, 1352458513500551.

Freedman M.S., Kaplan J.M., Markovic-Plese S., Insights into the Mechanisms of the Therapeutic Efficacy of Alemtuzumab in Multiple Sclerosis. 2013. *J. Clin. Cell Immunol.* 4, 1000152.

Fritz J. H. and Girardin S. E., "How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals," 2005. *Journal of Endotoxin Research*, vol. 11, no. 6, pp. 390–394.

Gaide O. and Hoffman H. M., "Insight into the inflammasome and caspase-activating mechanisms," 2008. *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 4, no. 1, pp. 61–77.

Gajofatto A., Bianchi M. R., Deotto L., & Benedetti M. D. Are Natalizumab and Fingolimod Analogous Second-Line Options for the Treatment of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis? A Clinical Practice Observational Study. 2014 *European neurology*, 72(3-4), 173-180

Galdiero M., Galdiero M., Finamore E. et al., "Haemophilus influenzae porin induces toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages," 2004. *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 2, pp. 1204–1209.

Galli S. J., Borregaard N. e Wynn T. A., "Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils," 2011. *Nature Immunology*, vol. 12, no. 11, pp. 1035–1044.

Galli S. J., Tsai M. e Piliponsky A. M. "The development of allergic inflammation," 2008. *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 445–454.

Gandhi R., Laroni A., and Weiner H. L., "Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis," 2010. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 221, no. 1-2, pp. 7–14.

Garg N. e Smith T. W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. (2015). *Brain and behavior*, 5(9).

Gerevini S, Caliendo G., Cava M., Capra R., De Rossi N., Falini A., Cosottini M. "Natalizumab related PML: atypical neuroradiological findings." 1970 European Congress of Radiology 2015.

Giacomini E., Severa M., Rizzo F. et al., "IFN- β therapy modulates B-cell and monocyte crosstalk via TLR7 in multiple sclerosis patients," 2013. *European Journal of Immunology*, vol. 43, no. 7, pp. 1963–1972.

Gidday J. M., Gasche Y. G., Copin J.-C. et al., "Leukocyte- derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Aug; 289(2):H558-68. Epub 2005 Mar 11.

Giovannoni G., Cook S., Rammohan K., et al., Sustained disease-activity-free status in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with cladribine tablets in the CLARITY study: a post-hoc and subgroup analysis. 2011. *Lancet Neurol*. 10, 329–337.

Gold R, Comi G, Palace J, Siever A, Gottschalk R, Bijarnia M, et al. Assessment of cardiac safety during fingolimod treatment initiation in a real-world relapsing multiple sclerosis population: a phase 3b, open- label study. 2014 *J Neurol*;261:267-276.

Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367:1098–1107.

Gold R. e Wolinsky J. S. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. 2011. *Acta Neurol. Scand*. 124:75–84.

Gold R., Linington C., and Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. 2006. *Brain* 129:1953–1971.

Gorelik L., Lerner M., Bixler S., et al., Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. 2010. *Ann. Neurol.* 68, 295–303.

Hafler D. A., Compston A., Sawcer S., Lander E. S., Daly M. J., De Jager P. L., et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome wide study. 2007. *N. Engl. J. Med.* 357:851–862.

Halle A., Hornung V., Petzold G. C. et al., “The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β ,” 2008. *Nature Immunology*, vol. 9, no. 8, pp. 857–865.

Hao J., Liu R., Piao W. et al., “Central nervous system (CNS)- resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology,” 2010. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 207, no. 9, pp. 1907–1921.

Harrer A., Pilz G., Einhaeupl M., Oppermann K., Hitzl W., Wipfler P., ... & Kraus J. Lymphocyte subsets show different response patterns to in vivo bound natalizumab--a flow cytometric study on patients with multiple sclerosis. 2012. *PloS one*, 7(2).

Hausler K. G., Prinz M., Nolte C. et al., “Interferon-beta differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages,” 2002. *European Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 11, pp. 2113–2122.

Havla J, Tackenberg B, Hellwig K, et al: Fingolimod reduces recurrence of disease activity after natalizumab withdrawal in multiple sclerosis. 2013 *J Neurol* 260:1382–1387.

Havrdová E., Galetta S., Hutchinson M., et al., Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. 2009. *Lancet Neurol.* 8, 254–260.

Havrdová E., Kappos L., Cohen J.A., et al., Clinical and magnetic resonance imaging outcomes in subgroups of patients with highly active relapsing–remitting multiple sclerosis treated with fingolimod (FTY720): results from the FREEDOMS and TRANSFORMS phase 3 studies. 2011. *ACTRIMS-ECTRIMS*, P473.

Hayashi F., Means T. K. e Luster A. D., “Toll-like receptors stimulate human neutrophil function,” 2003. *Blood*, vol. 102, no. 7, pp. 2660–2669.

He A., Spelman T., Jokubaitis V., et al., Comparison of switch to fingolimod or interferon beta/glatiramer acetate in active multiple sclerosis. *J. Am. Med. Assoc. Neurol.* 2015. 72, 405–413

Hedegaard C. J., Krakauer M., Bendtzen K., Lund H., Sellebjerg F. e Nielsen C. H., “T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis,” 2008. *Immunology*, vol. 125, no. 2, pp. 161–169.

Hemmer B., Archelos J.J. e Hartung H.P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. 2002. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:291–301.

Henderson A. P. D., Barnett M. H., Parratt J. D. E. e Prineas J. W., “Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions,” 2009. *Annals of Neurology*, vol. 66, no. 6, pp. 739–753.

Hernández-Pedro N., Espinosa-Ramirez Y., De la Cruz G., Pineda V. P., Sotelo, J.. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. 2013 *Clinical and Developmental Immunology*.

Hofstetter H. H., Ibrahim S. M., Koczan D. et al., "Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis," 2005. *Cellular Immunology*, vol. 237, no. 2, pp. 123–130.

Honce J M., Nagae L, and Nyberg E. "Neuroimaging of Natalizumab Complications in Multiple Sclerosis: PML and Other Associated Entities." *Multiple sclerosis international* 2015 (2015).

Hornung V., Bauernfeind F., Halle A. et al., "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization," 2008. *Nature Immunology*, vol. 9, no. 8, pp. 847–856.

<http://www.epicentro.iss.it/problemi/sclerosi/epid.asp> (accesso effettuato a settembre 2015)

Hume D. A., "The mononuclear phagocyte system," 2006. *Current Opinion in Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 49–53.

Iwakura Y. e Ishigame H., "The IL-23/IL-17 axis in inflammation," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 5, pp. 1218–1222, 2006.

Jack C., Ruffini F., Bar-Or A., and Antel J. P., "Microglia and multiple sclerosis," 2005. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 81, no. 3, pp. 363–373.

Jokubaitis V.G., Li V., Kalincik T., et al., Fingolimod after natalizumab and the risk of short-term relapse. 2014. *Neurology* 82, 1204–1211

Kalincik T., Horakova D., Spelman T., Jokubaitis V., Trojano M., Lugaresi A., ... & Butzkueven H. Switch to natalizumab versus fingolimod in active relapsing–remitting multiple sclerosis. 2015 *Annals of neurology*, 77(3), 425–435.

Kantarci O. H. Genetics and natural history of multiple sclerosis. 2008. *Semin. Neurol.* 28:7–16.

Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;362:387–401.

Kappos L., Clanet M., Sandberg-Wollheim M., et al., Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. *Neurology* 2005. 65, 40–47.

Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. 2014. *J. Autoimmun.* 48–49:134–142.

Kawanokuchi J., Shimizu K., Nitta A. et al., “Production and functions of IL-17 in microglia,” 2008. *Journal of Neuroimmunology*, vol.194,no.1-2,pp.54–61.

Kettritz R., L. Gaido M., Haller H., Luft F. C., Jennette C. J., and Falk R. J., “Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of human neutrophils,” 1998. *Kidney International*, vol. 53, no. 1, pp. 84–91.

Kitai R., Zhao M.-L., Zhang N., Hua L. L., Lee S. C., “Role of MIP-1 and RANTES in HIV-1 infection of microglia: inhibition of infection and induction by IFN,” 2000. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 110, no. 1-2, pp. 230–239.

Koedel T., Frankenberg S., Kirschnek et al., “Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis,” 2009. *PLoS Pathogens*, vol.5,no.5

Koudriavtseva T., Sbardella E., Trento E., Bordignon V., D'Agosto G., & Cordiali-Fei P. Long-term follow-up of peripheral lymphocyte subsets in a cohort of multiple sclerosis patients treated with natalizumab. 2014. *Clinical & Experimental Immunology*, 176(3), 320-326.

Kowarik M. C., Pellkofer H. L., Cepok S., Korn T., Kumpfel T., Buck D., ... & Hemmer B. Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. 2011. *Neurology*, 76(14), 1214-1221.

Krumbholz M, Meinl I, Kümpfel T, Hohlfeld R, Meinl E. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. 2008 *Neurology*; 71:1350–4.

Kurt-Jones E. A., Mandell L., Whitney C. et al., “Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils,” 2002. *Blood*, vol. 100, no. 5, pp. 1860–1868.

Le Campion A., Pommier A., Delpoux et al., “IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4+ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution,” 2012. *Journal of Immunology*, vol. 189, no. 7, pp. 3339–3346.

Liu Y.-J., “IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors,” 2005. *Annual Review of Immunology*, vol. 23, pp. 275–306.

Long-Term Safety and Efficacy Extension Study of Oral BG12 Monotherapy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. Clinical Trial NCT00835770. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00835770?term=dimethylpfumarate&rank=16>. Accessed December 20, 2014.

Lublin F. D. e Reingold S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. 1996. *Neurology* 46:907–911.

Lublin F. D., Reingold S. C., Cohen J. A., Cutter G. R., Sørensen P. S., Thompson A. J. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. 2014. *Neurology* 83:278–286.

Lucchinetti C. F., Gavrilova R. H., Metz I., Parisi J. E., Scheithauer B. W., Weigand S., et al. Clinical and radiographic spectrum of pathologically confirmed tumefactive multiple sclerosis. 2008. *Brain* 131:1759–1775

Lucchinetti C., Bruck W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M. e Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. 2000. *Ann. Neurol.* 47:707–717.

Mansilla M. J., Montalban X. e Espejo C., “Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis,” 2012. *Molecular Medicine*, vol. 18, pp. 1018–1028.

Marik C., Felts P. A., Bauer J., Lassmann H. e Smith K. J., “Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity?” 2007. *Brain*, vol. 130, no. 11, pp. 2800–2815.

Marta M., “Toll-like receptors in multiple sclerosis mouse experimental models,” 2009. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1173, pp. 458–462.

Marta M., Andersson A., Isaksson M., Kampe O. e Lobell A., “Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis,” 2008. *European Journal of Immunology*, vol. 38, no. 2, pp. 565–575.

Matusevicius D., Kivisa P, Heetal B., “Interleukin-17mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis,” 1999. *Multiple Sclerosis*, vol. 5, no. 2, pp. 101–104.

Medic N., Vita F., Abbateetal R., “Mastcellactivationbymyelin through scavenger receptor,” 2008. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 200, no. 1-2, pp. 27–40.

Mehling M., Brinkmann V., Antel J., Bar-Or A., Goebels N., Vedrine C., ... & Kappos L. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. 2008. *Neurology*, 71(16), 1261-1267.

Miller AE, Macdonell R, Comi G, et al. Teriflunomide reduces relapses with sequelae and relapses leading to hospitalizations: results from the TOWER study. *J Neurol.* 2014;261:1781–1788.

Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, et al. Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:977–986.

Miller D. H. e Leary S. M. Primary-progressive multiple sclerosis. 2007. *Lancet Neurol.* 6:903–912.

Miller S. D., Vanderlugt C. L., Begolka W. S., Pao W., Yauch R. L., Neville K. L., et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. 1997. *Nat. Med.* 3:1133–1136.

Multiple Sclerosis Research. Barts and the London School of Medicine and Dentistry. A blog for people with MS and their families. ClinicSpeak: natalizumab PML update - Q4 2014. Available at: <http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2015/01/clinicspeak-natalizumab-pml-update-q4.html> (accessed February 2015).

Nali L. H. D. S., Moraes L., Fink M. C. D., Callegaro D., Romano C. M. e Oliveira A. C. P. D.. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updates and considerations for safer treatment in JCV positive patients. 2014 *Arquivos de neuro-psiquiatria*, (AHEAD).

Nicholas J.A., Racke M.K., Imitola J., et al., First-line natalizumab in multiple sclerosis: rationale, patient selection, benefits and risks. 2014. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 5, 62–68.

Novartis. Gilenya safety update, www.novartis.com/news/statements/gilenya-safety-update (2015, accesso effettuato il 31/10/2015).

O'Connor K. C., Bar-Or A., and Hafler D. A. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. 2001. *J. Clin. Immunol.* 21:81–92.

Obermeier B., Lovato L., Mentele R., Bruck W., Forne I, Imhof A., Lottspeich F., Turk K.W., Willis S.N., Wekerle H., et al. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. 2011, *J. Neuroimmunol*

233,245–248.

O'Connor P., Goodman A., Kappos L., et al., Long-term safety and effectiveness of natalizumab redosing and treatment in the STRATA MS Study. 2014. *Neurology* 83, 78–86.

Olson J. K. and Miller S. D., “Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs,” 2004. *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 6, pp. 3916–3924.

Orr E. L., “Presence and distribution of nervous system- associated mast cells that may modulate experimental autoim- mune encephalomyelitis,” 1988. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 540, pp. 723–726.

Outteryck O., Zephir H., Salleron J., et al., JC-virus seroconversion in multiple sclerosis patients receiving natalizumab. 2013. *Mult Scler* (Epub ahead of print).

Paolicelli D., Manni A., Drenzo V., D'Onghia M., Tortorella C., Zoccolella S., & Trojano M. Long term cardiac safety and tolerability of Fingolimod in Multiple Sclerosis: A post-marketing study. 2015. *The Journal of Clinical Pharmacology*.

Park H., Li Z., Yang X. O. et al. “A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17,” 2005. *Nature Immunology*, vol. 6, no. 11, pp. 1133–1141.

Planas R., Martin R., Sospedra M., Long-term safety and efficacy of natalizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: impact on quality of life. 2014. *Patient Relat. Outcome Meas.* 5, 25–33.

Plavina T., Subramanyam M., Bloomgren G., Richman S., Pace A., Lee S., ... & Ticho B. Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. 2014. *Annals of neurology*, 76(6), 802-812.

Polman C.H., O'Connor P.W., Havrdova E., et al., A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. 2006. *N. Engl. J. Med.* 354, 899–910.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. 2011. *Ann Neurol* 69(2): 292–302.

Popescu V., Agosta F., Hulst H.E., et al., Brain atrophy and lesion load predict long term disability in multiple sclerosis. 2013. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 1082–1091.

Prinz M., Garbe F., Schmidt H. et al., “Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis,” 2006. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 2, pp. 456–464.

Prosperini L., Borriello G., De Giglio L., et al., Management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis: when an increasing of Interferon beta dose should be effective? *BMC Neurol.* 2011. 11, 26.

Prosperini L., Gianni C., Leonardi L., et al., Escalation to natalizumab or switching among immunomodulators in relapsing multiple sclerosis. 2012. *Mult Scler* 18, 64–71.

Puel S., Ziegler F., Buckley R. H. e Leonard W. J., “Defective IL7R expression in T-B+NK + severe combined immunodeficiency,” *Nature Genetics*, vol. 20, no. 4, pp. 394–397, 1998.

Putzki N, Baranwal MK, Tettenborn B, Limmroth V, Kreuzfelder E. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. 2010 *Eur Neurol*; 63:311–7.

Putzki N., Kollia K., Woods S., et al., Natalizumab is effective as second line therapy in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. 2009. *Eur. J. Neurol.* 16, 424–426.

Putzki N., Yaldizli O., Bühler R., et al., Natalizumab reduces clinical and MRI activity in multiple sclerosis patients with high disease activity: results from a multicenter study in Switzerland. 2010. *Eur. Neurol* 63, 101–106.

Putzki N., Yaldizli O., Mäurer M., et al., Efficacy of natalizumab in second line therapy of relapsing-remitting multiple sclerosis: results from a multi-center study in German speaking countries. 2010. *Eur. J. Neurol.* 17, 31–37.

Reynolds J. M., “Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation,” 2012. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 32, pp. 13064–13069.

Rinaldi F, Seppi D, Calabrese M, Perini P, Gallo P: Switching therapy from natalizumab to fingolimod in relapsing-remitting multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging findings. 2012 *Mult Scler*;18:1640– 21 1643.

Rizzo R., Gentili V., Casetta I. et al., “Altered natural killer cells’ response to herpes virus infection in multiple sclerosis involves KIR2DL2 expression,” 2012. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 251, no. 1-2, pp. 55–64.

Rosenkranz T, Novas M and Terborg C. PML in a patient without severe lymphocytopenia receiving dimethyl fumarate. 2015 *N Engl J Med*; 372: 1474– 1476.

Rozniecki J. J., Hauser S. L., Stein M., Lincoln R. e Theoharides T. C., “Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients,” *Annals of Neurology*, vol. 37, no. 1, pp. 63–66, 1995.

Rudick R. A., Cohen J. A., Weinstock-Guttman B., Kinkel R. P. e Ransohoff R. M. Management of multiple sclerosis. 1997. *N. Engl. J. Med.* 337:1604–1611.

Rudick R.A., Stuart W.H., Calabresi P.A., et al., Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. 2006. *N. Engl. J. Med.* 354, 911–923.

Sawcer S., Hellenthal G., Pirinen M., Spencer C. C., Patsopoulos N. A., Moutsianas L., et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. 2011. *Nature* 476:214–219.

Schlereth S., Lee H. S., Khandelwal P. e Saban D. R., “Blocking CCR7 at the ocular surface impairs the pathogenic contribution of dendritic cells in allergic conjunctivitis,” 2012. *American Journal of Pathology*, vol. 180, no. 6, pp. 2351–2360.

Schrijver H. M., Crusius J. B. A., Uitdehaag B. M. J et al., “Association of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist genes with disease severity in MS,” 1999. *Neurology*, vol. 52, no. 3, pp. 595–599.

Secor V. H., Secor W. E., Gutekunst C.-A. e Brown M. A., “Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis,” 2000. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 5, pp. 813–821.

Selter C. R. e Hemmer B. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. 2013. *Immuno. Targets Therapy* 2:21–30.

Shaw P. J., Lamkanfi M. e Kanneganti T.-D., “NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome,” 2010. *European Journal of Immunology*, vol. 40, no. 3, pp. 624–627.

Shaw P. J., McDermott M. F. e Kanneganti T.-D., “Inflamma- somes and autoimmunity,” 2011. *Trends in Molecular Medicine*, vol. 17, no. 2, pp. 57–64.

Shi F.-D. e Zhou Q., “Natural killer cells as indispensable play- ers and therapeutic targets in autoimmunity,” 2011. *Autoimmunity*, vol. 44, no. 1, pp. 3–10.

Simula S., Laitinen T., Laitinen T. M., Tarkiainen T., Hartikainen J. E., & Hartikainen P.. Effects of three months fingolimod therapy on heart rate. 2015 *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1-4.

Skarica M, Eckstein C, Whartenby KA, Calabresi PA. Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. 2011 *J Neuroimmunol*; 235:70–6.

Sospedra M. e Martin R., “Immunology of multiple sclerosis,” 2005. *Annual Review of Immunology*, vol. 23, pp. 683–747.

Sottini A, Capra R, Zanotti C et al. Pre-existing T- and B-cell defects in one progressive multifocal leukoencephalopathy patient. 2012. *PLOS One*; 7:34493.

Sriram S., “Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination,” 2011. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 239, no. 1-2, pp. 13–20.

Stadelmann C., Ludwin S., Tabira T., Guseo A., Lucchinetti C. F., Leel-Ossy L., et al. Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo’s type of multiple sclerosis. 2005. *Brain* 128:979–987.

Takahashi K., Miyake S., Kondo T. et al., “Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis,” 2001. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 5, pp. R23–R29.
Tanaka M., & Kinoshita M. Daily fingolimod administration may cause lymphopenia but alternate-day administration may be too little to inhibit disease activity. 2015. *Journal of neuroimmunology*, 288, 69.

Tanasescu R., Ionete C., Chou I. J. e Constantinescu C. S. Advances in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. 2014 *Biomedical journal*, 37(2), 41.

Tani K., Murphy W. J., Chertov O., Oppenheim J. J. e Wang J. M., “The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific Ig production in mice,” 2001. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 282, no. 4, pp. 971–976.

Theoharides T. C., “Mast cells: the immune gate to the brain,” 1990. *Life Sciences*, vol. 46, no. 9, pp. 607–617.

Tramacere I., Del Giovane C., Salanti G., D'Amico R., Pacchetti I., & Filippini G. Immunomodulators and immunosuppressants for relapsing–remitting multiple sclerosis: a network meta–analysis. 2014. The Cochrane Library.

Trapp B. D. e Nave K.-A., “Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?” 2008. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 31, pp. 247–269.

Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R. M., Rudick R., Mork S., and Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. 1998. *N. Engl. J. Med.* 338:278–285.

Tzartos, J. S., Friese M. A., Craner M. J., Palace J., Newcombe J., Esiri M. M., et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. 2008. *Am. J. Pathol.* 172:146–155.

Van Schependom J, Gielen J, Laton J, Nagels G. Assessing PML risk under immunotherapy: if all you have is a hammer, everything looks like a nail. *Mult Scler.* 2015 Jul 21 [Epub ahead of print]

Vermersch P, Czonkowska A, Grimaldi LM, et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. *Mult Scler.* 2014;20:705–716.

Vojdani A., Lambert J. e Kellermann G., “The role of th17 in neuroimmune disorders: a target for cam therapy—part III,” 2011. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 548086, 11 pag.

Wallin R. P. A., Lundqvist A., Morè S. H., Von Bonin A., Kiessling R., and Ljunggren H.-G., “Heat-shock proteins as activators of the innate immune system,” 2002. *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 3, pp. 130–135.

Warnke C., Dehmel T., Ramanujam R., Holmen C., Nordin N., Wolfram K., ... & Kieseier, B. C. Initial lymphocyte count and low BMI may affect fingolimod-induced lymphopenia. (201. *Neurology*, 83(23), 2153-2157.

Weiner H. L., “A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis,” 2008. *Journal of Neurology*, vol. 255, no. 1, supplement, pp. 3–11.

Williams R., Rigby A. S., Airey M., Robinson M., and Ford. H. Multiple sclerosis: its epidemiological, genetic, and health care impact. 1995. *J. Epidemiol. Community Health* 49:563–569.

Wingerchuk D. M. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. 2012. *Therapeut. Advan. Neurol. Dis.* 5:13–22.

Wipfler P, Oppermann K, Pilz G et al. Adhesion molecules are promising candidates to establish surrogate markers for natalizumab treatment. 2011. *Mult Scler*; 17:16–23.

Wolf N. A., Amouzegar T. K. e R. H. Swanborg, “Synergistic interaction between Toll-like receptor agonists is required for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats,” 2007. *Journal of Neuroimmunology*, vol. 185, no. 1-2, pp. 115–122.

Yokota S.I., Minota S., e Fujii N., “Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors,” 2006. *International Immunology*, vol. 18, no. 4, pp. 573–580.

Yong V. W., Chabot S., Stuve O. e Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. 1998. *Neurology* 51:682–689.

Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*. 2002;59:802–808.

Yu P., Wang Y., Chin R. K. et al., “B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion,” 2002. *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 10, pp. 5117–5123.

Zaki M., Vogel P., Malireddi R. K. et al., “The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis,” 2011. *Cancer Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 649–660.

Zanotti C, Chiarini M, Serana F et al. Peripheral accumulation of newly produced T and B lymphocytes in natalizumab-treated multiple sclerosis patients. 2012 *Clin Immunol*; 145:19–26.

Zhang X., Jin J., Tang Y., Speer D., Sujkowska D., and Markovic-Plese S., “IFN- β 1a inhibits the secretion of Th17- polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation, 2009. *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 6, pp. 3928– 3936.

Zhang Z.-Y., Zhang Z., and Schluesener H. J., “Toll-like receptor-2, CD14 and heat-shock protein 70 in inflammatory lesions of rat experimental autoimmune neuritis,” 2009. *Neuroscience*, vol. 159, no. 1, pp. 136–142.

Ziemssen T., Diaz-Lorente M., Fuchs A., et al., 24-month interim results of PAN- GAEA: A 5 year registry study evaluating long-term safety, efficacy and pharmacoeconomic data of German multiple sclerosis patients on fingolimod therapy. 2014. *Am. Acad. Neurol.* P3, 152.

